



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis de la dosis génica de la región 22q11 como factor de riesgo para el desarrollo de esquizofrenia.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

José David Abad Flores



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO

VOCAL: Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

SECRETARIO: Profesora: NANCY MONROY JARAMILLO

1er. SUPLENTE: Profesora: MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO

2° SUPLENTE: Profesora: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ**

ASESOR DEL TEMA:

NANCY MONROY JARAMILLO

SUPERVISOR TÉCNICO:

MARÍA ELISA ALONSO VILATELA

SUSTENTANTE:

JOSÉ DAVID ABAD FLORES

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Generalidades de la esquizofrenia	3
1.1.1 Síntomas característicos de la esquizofrenia	5
1.1.2 La paradoja de Darwin	6
1.2 Criterios diagnósticos para la esquizofrenia, trastorno bipolar y trastorno esquizo-afectivo.	6
1.2.1 El acertijo fenotípico	7
1.3 Factores asociados a la esquizofrenia	8
1.3.1 Factores psicosociales	8
1.3.2 Factores ambientales	8
1.3.3 Factores genéticos	9
1.4 Genética de la esquizofrenia	12
1.4.1 Genes candidato para esquizofrenia	14
1.4.1.1 Disbindina (<i>DTNBP1</i>)	14
1.4.1.2 Neuregulina 1 (<i>NRG1</i>)	14
1.4.1.3 Oxidasa de D- aminoácidos (<i>DAO</i>) y activador de la oxidasa de D- aminoácidos (<i>DAOA</i>)	15
1.4.1.4 Regulador de señalización de proteína G 4 (<i>RGS4</i>)	15
1.5 CNV y esquizofrenia	15
1.6 Síndrome de la delección 22q11.2 y esquizofrenia	21
1.6.1 Síntomas Prodrómicos en niños con delección 22q11.2 predictivos de esquizofrenia	24
1.6.2 Cambios neuro-anatómicos en el síndrome de delección 22q11.2	24
1.6.3 Mecanismos de formación de la delección 22q11.2	25
1.6.4 Genes de la región deletada en 22q11.2	27
1.6.4.1 <i>PRODH</i>	28
1.6.4.2 <i>TUPLE1</i>	29
1.6.4.3 <i>COMT</i>	29
1.6.4.4 <i>ZNF74</i>	30
1.6.4.5 <i>PIK4CA</i>	32
1.6.4.6 <i>LZTR1</i>	32
1.6.4.7 <i>CAT 4</i>	32
1.6.4.8 <i>VPREB</i>	32
1.6.4.9 <i>ZDHHC8</i>	32
1.7 Modelos animales del síndrome de la delección 22q11.2	34
1.8 Participación de DGCR8 y miRNA en el síndrome de delección 22q11.2	36

1.9 Contribuciones genéticas a los cambios en la arquitectura neuronal en el síndrome de delección 22q11.2	37
1.10 Vías principales de señalización asociadas con esquizofrenia	37
1.10.1 <i>NRG1</i> gen de la neuregulina 1	38
1.10.2 <i>DISC1</i>	38
1.10.3 Vías de señalización de los neurotransmisores dopamina, glutamato y GABA	39
1.11 Métodos de detección de las CNV	42
1.11.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa	42
1.11.2 Microarreglos	42
1.11.3 Hibridación <i>In situ</i> Fluorescente (FISH)	43
1.11.4 Amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA)	43
2. Planteamiento del problema	46
3. Hipótesis	46
4. Objetivos	47
5. Sujetos y Métodos.	48
5.1 Sujetos de estudio.	48
5.2 Toma de muestra biológica	49
5.3 Separación de células mononucleares y extracción de DNA	49
5.4 Cuantificación y preparación de diluciones de DNA.	50
5.5 Estandarización de la PCR en tiempo real (PCR-TR)	51
5.6 Cuantificación relativa de dosis génica por PCR en tiempo real	53
5.6.1 Cuantificación relativa.	56
5.6.2 Ensayos de PCR empleando <i>SYBR Green</i> .	58
5.7 Validación	59
6. Resultados	62
7. Discusión	72
8. Conclusiones	83
9. Perspectivas	84
10. Bibliografía	85
Anexo 1 Carta de consentimiento informado	100

Resumen

Introducción. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, 6.6% de la población mundial sufre de trastornos psiquiátricos y neurológicos incluidos entre las cinco principales causas que originan discapacidad. La esquizofrenia (ESQ) es un padecimiento neuropsiquiátrico heterogéneo que aparece en la adolescencia tardía o en la edad adulta temprana, con una prevalencia de ~1% a nivel mundial, cuyos síntomas se clasifican en tres categorías: positivos, (alucinaciones y delirios), negativos (aplanamiento afectivo, alogia, abulia) y cognitivos (déficits de memoria, anosognosia). Esta entidad es multifactorial y se han descrito múltiples factores de riesgo genéticos, incluyendo variaciones en el número de copias (CNV) en diferentes regiones cromosómicas. Las microdeleciones de la región 22q11.2 representan el factor de riesgo más importante para desarrollar la ESQ, ya que son el único factor con significancia en los estudios de asociación con el genoma completo, presentan penetrancia alta y no se encuentran en controles sanos. La región 22q11.2 implicada tiene un tamaño de 3Mb e incluye diversos genes, entre ellos: *COMT*, *ZNF74*, *D22S936*, *CAT4*, *D22S181*, *VPREBI*, *TUPLE1*, *PRODH*, *LZTR1*, *PIK4CA*. Es importante desarrollar un panel de marcadores genéticos que puedan predecir la susceptibilidad a desarrollar esquizofrenia y apoyen al diagnóstico clínico de la misma. En este trabajo se realizó un estudio para determinar la dosis de diez genes de la región 22q11.2

Sujetos y Métodos. Se incluyeron 103 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo (TE) o trastorno bipolar (TB) de la consulta externa del INNNMVS. La cuantificación de la dosis génica se realizó mediante PCR en tiempo real en un equipo *Step One* (AB), empleando el método de los $\Delta\Delta C_T$. Para el estudio de la dosis génica cada muestra de DNA se analizó por triplicado y en cada corrida se incluyeron controles positivos y negativos para la deleción, además, las alteraciones encontradas se comprobaron en dos ensayos independientes.

Resultados. Se identificaron siete casos con alteración de dosis en la región 22q11.2, seis de ellos con diagnóstico clínico de ESQ y uno de TB. En relación al tamaño de la alteración, se observó que tres pacientes con diagnóstico de ESQ presentaron deleción de más de un gen, abarcando la región típicamente eliminada en el síndrome de deleción 22q11.2 de aproximadamente 3

Mb. Los 4 casos restantes presentaron delección solo de *ZNF74*. El padre de uno de los pacientes con la delección de 3Mb presentó pérdida de *PRODH* y *TUPLE1*, aunque está asintomático. **Conclusiones.** La delección de 22q11.2 se presentó en el 2.91% de los pacientes estudiados, de manera similar a lo reportado para otras poblaciones mediante la técnica de FISH. Sin embargo, la metodología utilizada aquí permitió identificar cuatro casos con delección de un solo gen en esta región. Los resultados permitieron identificar 2 casos con el síndrome de delección 22q11.2 no diagnosticados previamente y en un tercero se confirmó la sospecha clínica del síndrome. Este trabajo abre un nuevo campo para correlacionar estas variaciones con las manifestaciones fenotípicas de estos padecimientos.

1. Introducción

1.1 Generalidades de la esquizofrenia

La esquizofrenia (ESQ) es un padecimiento neuropsiquiátrico heterogéneo que aparece en la adolescencia tardía o en la edad adulta temprana, con una prevalencia de aproximadamente 1% a nivel mundial, y cuyos síntomas se clasifican en tres categorías: positivos, (alucinaciones y delirios), negativos (aplanamiento afectivo, alogia, abulia) y cognitivos (déficits de memoria, anosognosia) (Merikangas AK et al 2009). Además, el paciente con esquizofrenia se caracteriza por su poca sociabilidad, ensimismamiento, una manera poco común de demostrar su afecto, episodios psicóticos y un deterioro gradual de su persona en el ámbito familiar, escolar y laboral. Aunque la prevalencia es similar para hombres y mujeres a menudo el curso de la enfermedad es más severo en los hombres. Las principales causas de muerte en personas que sufren esta enfermedad son: suicidio en etapas tempranas del desorden y complicaciones cardiovasculares en etapas avanzadas (Frenk Mora 2002).

La esquizofrenia comúnmente tiene un curso crónico con deterioro cognitivo. Su signo patognomónico es la psicosis, además de otros síntomas como sintaxis interrumpida, alteraciones del pensamiento y del comportamiento, modificaciones severas del estado de ánimo (episodios maniaco depresivos). No existen pruebas de laboratorio para diagnosticar la esquizofrenia; en su lugar, el diagnóstico se basa en la observación clínica. La esquizofrenia es un padecimiento que representa grandes pérdidas en la condición humana de quien la padece, su inicio en la adolescencia o en adultos jóvenes y sus características de enfermedad crónica e incurable tienen un fuerte impacto en su nivel de vida y en sus años productivos (Caraveo A et al 1996).

El estudio de la esquizofrenia a lo largo del último siglo ha utilizado el fenotipo clínico para su diagnóstico, pero éste presenta déficits en las reglas de evaluación y de comprobación de la enfermedad, resaltando la importancia de los factores genéticos como marcadores en la evaluación y diferenciación de la esquizofrenia de otros trastornos psiquiátricos (Gejman PV et al 2010).

En la última década, el estudio de las causas de la esquizofrenia como un defecto genético que se traduce en un desorden químico cerebral o como un desorden del neurodesarrollo que se manifiesta con síntomas mentales, ha cobrado relevancia debido al gran número de estudios que se han llevado a cabo y publicado en la literatura científica. En México, un estudio de la Secretaría de Salud del 2002 estimó una cifra de entre 500 mil y 700 mil pacientes esquizofrénicos, cuyos requerimientos son diversos: hospitalización en la fase aguda, uso de medicamentos antipsicóticos de por vida, rehabilitación psicosocial, acciones de reinserción a su entorno y tratamiento familiar complementario, así como eventualmente, la posibilidad de espacios para la estancia prolongada en un importante número de casos (Medina M 2001).

A lo anterior se agregan los costos en materia de investigación, de formación y capacitación de recursos humanos para todo el esquema de intervención, así como de la necesidad de una campaña de desestigmatización intensa y permanente en torno al enfermo, a su familia y al personal involucrado en su atención. La comprensión de este proceso implica entender el alto costo que la enfermedad significa para la familia y la sociedad. En el marco general de las enfermedades mentales, la esquizofrenia constituye el paradigma de éstas ya que afecta el pensamiento, el lenguaje, el afecto, la sensorio-percepción y la vida cotidiana del paciente y sus familiares. Asimismo, existen diversos efectos del padecimiento en la dinámica familiar interna, su economía, y en sus relaciones sociales, principalmente, debido a la necesidad de asistencia de los enfermos (Frenk Mora 2002).

La esquizofrenia es una enfermedad devastadora cuya inatención produce severa incapacidad en la edad más productiva del ser humano. Es una enfermedad crónica, incurable, pero controlable, cuyo pronóstico varía en relación con la asistencia, el tratamiento oportuno, el abordaje multidisciplinario y los esfuerzos que se hagan en el campo de la rehabilitación psicosocial (Eaton W 1974).

El trastorno bipolar (TB) es un desorden severo del humor con una prevalencia del 1%, tanto en hombres como en mujeres (Organización mundial de la Salud, 1993), se

caracteriza por perturbaciones en el humor que van desde una elación extrema hasta una depresión severa, que a menudo se acompaña de características psicóticas y cambios cognitivos. El TB está asociado con una alta morbilidad, utilización de servicios de hospitalización y riesgo de suicidio. Hay evidencia substancial de estudios familiares, de gemelos y de adopción de la importancia de los genes en la susceptibilidad a esquizofrenia y trastorno bipolar (Craddock N et al 2005).

1.1.1 Síntomas característicos de la esquizofrenia

Actualmente, los síntomas observados en la esquizofrenia se han dividido en dos grupos: los síntomas positivos que son los que aparecen principalmente en la fase denominada episodio, y los síntomas negativos que aparecen tanto en la fase aguda como en la crónica (inter-episodio). Ambos síntomas tienen una fisiopatología específica y por lo tanto, la respuesta al tratamiento es diferente. Los síntomas positivos reflejan un exceso o distorsión de las funciones mentales, mientras que los síntomas negativos reflejan una disminución o pérdida de estas mismas funciones (De Lisi L 1999).

a) Síntomas positivos

Los síntomas positivos están presentes en los episodios agudos y desaparecen o disminuyen considerablemente en los períodos interepisódicos del padecimiento. Estos síntomas están relacionados a la hiperfunción dopaminérgica en ganglios basales y sistema mesolímbico. Dentro de los síntomas positivos se encuentran las alucinaciones, las ideas delirantes y la desorganización del pensamiento y/o de la conducta. En la mayoría de los casos, estos síntomas responden satisfactoriamente a los medicamentos antagonistas dopaminérgicos (haloperidol) o bien a los antagonistas dopaminérgicos y serotoninérgicos (risperidona, olanzapina y clozapina) (De Lisi L 1999).

b) Síntomas negativos

Los síntomas negativos se observan tanto en el episodio como en el período inter-episódico, aunque son más notorios en este último y representan el mayor reto de la psiquiatría actual, ya que no se ha demostrado la efectividad de los medicamentos sobre

estos síntomas. Se menciona que la fisiopatología de los síntomas negativos se caracteriza por una hipofunción dopaminérgica a nivel cortical. Dentro de los síntomas negativos se observa la restricción como común denominador; restricción afectiva, restricción del pensamiento y del comportamiento. Si bien existen muchos estudios que refieren que los antipsicóticos atípicos disminuyen los síntomas negativos, no es muy significativa esta reducción, por lo que se ha convertido en una prioridad para la investigación encontrar el tratamiento que reduzca significativamente los síntomas negativos (Tsuang M et al 2000).

1.1.2 La paradoja de Darwin

La esquizofrenia se ha asociado con una disminución de la fertilidad que se explica por las características sociales y de comportamiento de los pacientes con ESQ. Se sabe que en la ESQ, la fertilidad está comprometida en ambos géneros, aunque esto es más marcado en los hombres. La disminución de la fertilidad es prevista que aumente debido al aumento de matrimonios añosos en las sociedades occidentales actuales mientras que la edad de aparición de la esquizofrenia no ha cambiado. Se espera que la selección natural disminuya la frecuencia de trastornos genéticos que reduzcan la fertilidad, sin embargo la prevalencia de la esquizofrenia sigue siendo alta, por lo menos más alta que la frecuencia de los desórdenes mendelianos. Debido a que la esquizofrenia evita el efecto de la selección natural (efecto conocido como la paradoja de Darwin), ésta resulta un enigma y múltiples hipótesis han sido propuestas al respecto (Keller MC et al 2006).

1.2 Criterios diagnósticos para la esquizofrenia, trastorno bipolar y trastorno esquizoafectivo.

Existen dos guías principales que delinear los criterios diagnósticos de los desórdenes psiquiátricos: el manual estadístico y diagnóstico de los desórdenes mentales, actualmente en su cuarta edición (DSM IV), que es publicada por la Asociación Americana de Psiquiatría, y da criterios diagnósticos para los trastornos mentales y también nomenclatura común para dichos trastornos y detalla los criterios específicos para el diagnóstico, la segunda guía más usada para los criterios diagnósticos de desórdenes psiquiátricos es la clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas

relacionados de la salud (ICD), publicada por la organización mundial de la salud, para realizar un seguimiento de procedimientos diagnósticos a nivel mundial actualmente está en su décima revisión. El DSM describe 5 subtipos de esquizofrenia, que se clasifican por sus diferentes síntomas, incluyendo: paranoide, desorganizada, catatónica, indiferenciada y residual. El paciente debe tener uno o más de los síntomas característicos, y en la mayoría de los casos debe presentar los síntomas al menos por un mes (alucinaciones, delirios, discurso desorganizado, comportamiento desorganizado, síntomas negativos), también debe haber una disfunción social y ocupacional, y estos factores deben estar presentes persistentemente por lo menos 6 meses. El ICD 10 también incluye 2 tipos adicionales de esquizofrenia: depresión post-esquizofrénica y esquizofrenia simple (Merikangas AK et al 2009).

La esquizofrenia y el autismo también comparten ciertas características clínicas como discapacidad de lenguaje y aislamiento social entre otros síntomas negativos de la esquizofrenia. Sin embargo, el autismo permanece como un criterio de exclusión para la esquizofrenia en el DSMIV a menos que se presenten alucinaciones y delirios prominentes con duración mínima de un mes (Franco JG et al 2012)

1.2.1 El acertijo fenotípico

El trastorno bipolar, el trastorno esquizoafectivo (TE) y la esquizofrenia tienen aspectos fenotípicos en común, tanto en términos de síntomas como en terapéutica, ya que los tres trastornos responden ante fármacos antipsicóticos. Emil Kraepelin definió la demencia precoz como un grupo de condiciones psicóticas con mal pronóstico y agrupó bajo el término psicosis maniaco-depresiva a un conjunto de condiciones que incluían la locura periódica, la manía simple y la melancolía, que pensaba no provocaba un deterioro. Kraepelin creía que la demencia precoz y la psicosis maniaco-depresiva tenían causas específicas y separadas. Sin embargo, la realidad muestra ser más compleja y en 1933 Kasanin acuñó el término psicosis esquizoafectiva para referirse a un trastorno con una mezcla de rasgos de la ESQ y del TE. Comparado con la población en general, los estudios familiares indican que el diagnóstico clínico intermedio de TE es más común en familias en las cuales se ha probado la existencia de sujetos con ESQ así como con TB. De hecho, el

diagnóstico diferencial entre esquizofrenia, trastorno bipolar y trastorno esquizoafectivo no es fehaciente ya que los criterios no están bien definidos y varían en las diferentes clasificaciones modernas (Kasanin J. 1933).

La pleiotropía se refiere al fenómeno en donde variaciones en un gen simultáneamente afectan diferentes sistemas. Aunque la esquizofrenia y el trastorno bipolar se clasifican como trastornos mentales diferentes en la mayoría de las clasificaciones modernas, comparten ciertas similitudes como síntomas psicóticos, el mismo tratamiento para la psicosis, incremento en el riesgo de suicidio y dificultad para diferenciarlos del trastorno esquizoafectivo. Se ha postulado el traslape de genes de susceptibilidad, especialmente para los síntomas positivos como las alucinaciones y delirios.

1.3 Factores asociados a la esquizofrenia

La investigación del último medio siglo acerca del origen de la enfermedad coincide en señalar diversos factores genéticos, ambientales, biológicos y sociales, asociados a la esquizofrenia como posibles responsables.

1.3.1 Factores psicosociales

La mayoría de los estudios al respecto coinciden en que si bien el estrés social puede desencadenar un episodio psicótico, el ambiente social ha sido descartado como etiología de la esquizofrenia. Los estudios de adopción han sido uno de los modelos que han respaldado esta tesis. Los factores sociales no se han asociado como causa de esquizofrenia, pero sí como desencadenante de un primer episodio y de las recaídas (Frenk Mora 2002).

1.3.2 Factores ambientales

De los diversos estudios que se han realizado al respecto, se sabe que existen factores biológico-ambientales observados con más frecuencia en los pacientes con esquizofrenia que en las personas normales (controles). En primer lugar se propone el traumatismo obstétrico (TO) como uno de estos factores, de hecho el que un niño presente TO eleva el riesgo de presentar esquizofrenia de 4 a 6 veces más. El TO conlleva en la mayoría de los

casos a la hipoxia neonatal, lo que ocasiona un daño en la formación del tálamo y el hipocampo, que años más tarde se manifestará con sintomatología característica de la esquizofrenia. Otro factor ambiental que se ha relacionado con la esquizofrenia son las infecciones virales prenatales. Los virus implicados son el de la influenza y el citomegalovirus; diversos estudios han señalado que estas infecciones en etapa prenatal aumentan el riesgo de esquizofrenia al doble de lo que se observa en la población en general (Karayiourgu M et al 2010).

Otros factores ambientales asociados aunque menos estudiados y determinados son la desnutrición prenatal, la incompatibilidad de RH o a grupo sanguíneo y la exposición a sustancias tóxicas en la etapa perinatal (Frenk Mora 2002).

Algunos factores que se encuentran bajo investigación, son citocinas, sensibilidad al gluten, y el uso de *Cannabis* (Karayiourgu M et al 2010).

Aunque las conexiones fisiopatológicas específicas entre los factores de riesgo ambientales y la esquizofrenia permanecen tentativas, los resultados epidemiológicos pueden proporcionar una guía para realizar experimentos genéticos moleculares. Por ejemplo, analizando genes específicos involucrados en el desarrollo y nutrición prenatal, así como implementando ensayos serológicos en muestras epidemiológicas. Es probable que más factores ambientales asociados con un riesgo alto para desarrollar esquizofrenia estén por descubrirse y que el conocimiento de las interacciones genes-ambiente será necesario para entender la biología de la esquizofrenia (Byrne M et al 2007).

1.3.3 Factores genéticos

Los familiares de pacientes esquizofrénicos tienen más riesgo de sufrirla. El riesgo es progresivamente mayor entre más cercano es el parentesco. El riesgo aumenta desde el 1% esperado en la población general hasta el 35-48% en el caso de tener un hermano gemelo monocigoto o ser hijo de ambos padres esquizofrénicos. En estudios familiares se ha mostrado que el trastorno esquizoafectivo es más común en las familias donde se han

diagnosticado individuos con esquizofrenia o con trastorno bipolar que en la población en general (Karayiourgu M et al 2010).

Los estudios modernos de adopción y gemelos fueron el instrumento para rechazar las hipótesis psicológicas de la esquizofrenia y se convirtieron en el principal fundamento para buscar factores de riesgo genéticos.

- 1) Estudios en gemelos: diferencias entre gemelos monocigóticos (genéticamente idénticos) se atribuyen a factores ambientales y diferencias entre gemelos dicigóticos (hermanos) se le atribuye tanto a factores genéticos como a factores ambientales. La tasa de concordancia, la probabilidad de que un segundo hermano desarrolle la enfermedad si se ha demostrado que el primer hermano estudiado la tiene es comúnmente usada. La heredabilidad es la proporción de la varianza del fenotipo explicada por factores genéticos. La esquizofrenia ha estado sujeta a una investigación epidemiológica detallada. Existen cinco estudios comprobados sistemáticamente con criterios diagnósticos modernos que reportan una concordancia en gemelos monocigotos de 41-65%, comparada con la concordancia en dicigotos, 0-28%, resultando en una heredabilidad aproximada de 80% (Cardno AG et al 2009). El riesgo para desarrollar esquizofrenia y trastornos relacionados es similar tanto en la progeñe del gemelo afectado como en la progeñe del no afectado, lo que sugiere que el gemelo no afectado es portador de factores de riesgo genéticos para esquizofrenia pero que no desarrolla la enfermedad (apoyando tanto la hipótesis de la existencia de mecanismos epigenéticos como factores ambientales no compartidos entre los hermanos). Recientemente se ha propuesto que las diferencias en la metilación del DNA pueden ser la causa de la discordancia entre gemelos monocigóticos (Mill J et al 2008) y también pueden proporcionar un mecanismo para una variedad de factores de riesgo ambientales en la esquizofrenia (Kringlen E, et al 1989).
- 2) Estudios de adopción: Estos estudios evalúan el riesgo que tienen los individuos adoptados que fueron alejados de padres esquizofrénicos para desarrollar la

esquizofrenia (a menudo también se estudian otros desórdenes del espectro de la esquizofrenia). Dichos estudios han encontrado un riesgo elevado para desarrollar esquizofrenia en esa progenie tanto si los padres desarrollaron la enfermedad antes o después de la adopción y tanto si fueron adoptados por otra pareja o por una institución. Los estudios de adopción pueden dar una idea de las interacciones genes-ambiente (Ingraham LJ, et al. 2000).

Mientras que los estudios en gemelos y de adopción no dejan duda de la importancia de los genes, también señalan la importancia de los factores ambientales dado que la concordancia para esquizofrenia en gemelos monocigóticos es típicamente de alrededor de 50% y los estimados de heredabilidad son menores de 100%. De la epidemiología genética está claro que el modo de transmisión es complejo, el número de *loci* de susceptibilidad (**Figura 1**), el riesgo conferido por cada *locus* y el grado de interacción entre los *loci* permanece desconocido (Craddock N et al 2005).

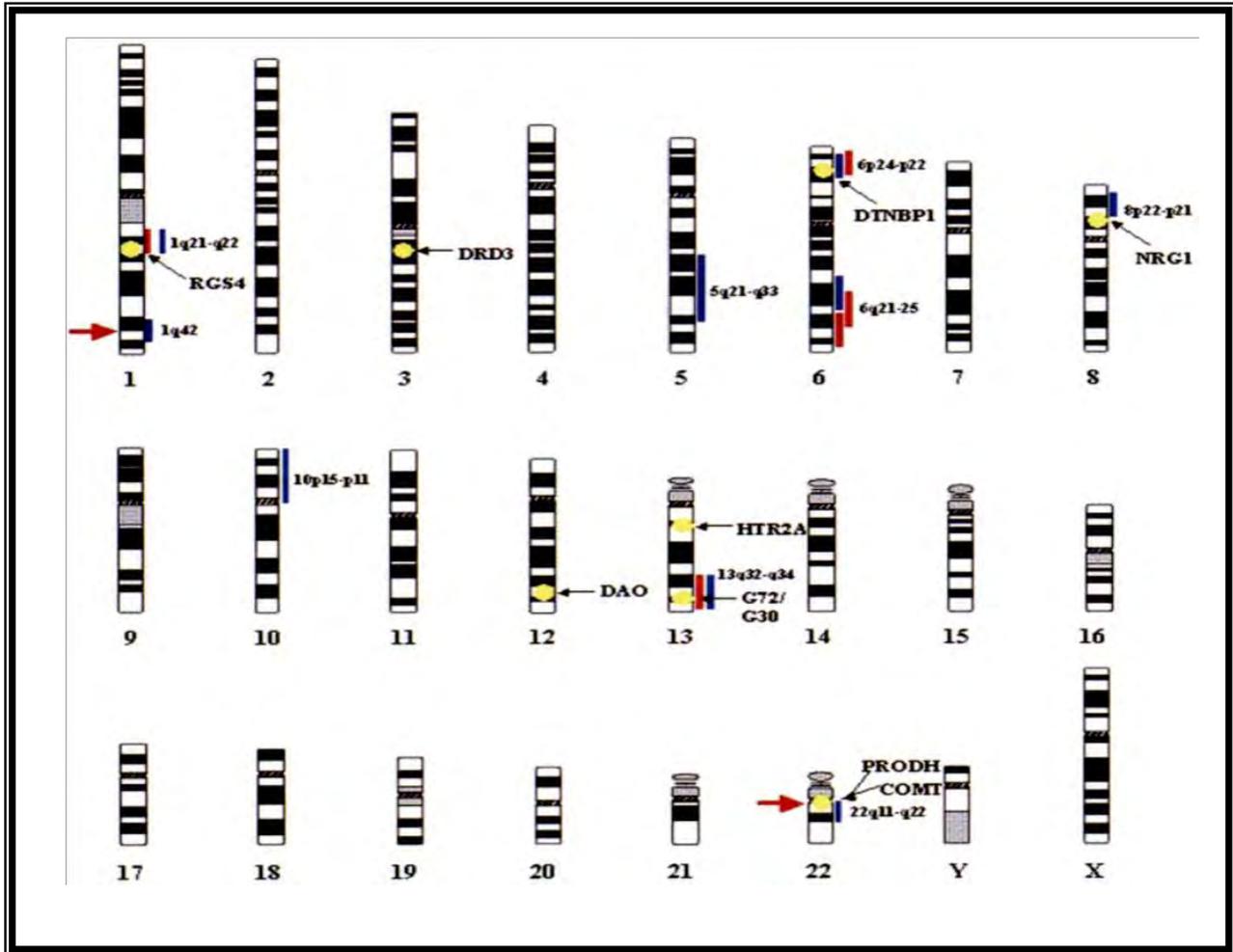


Figura 1. Ideograma que muestra las principales regiones cromosómicas implicadas por estudios de ligamiento con esquizofrenia. Las líneas azules indican las áreas en las cuales se ha encontrado evidencia sugestiva de ligamiento, en más de un conjunto de datos. Las líneas rojas indican las regiones donde la evidencia de ligamiento ha cobrado significancia del genoma completo. Las flechas rojas indican las anomalías cromosómicas asociadas con esquizofrenia. Los círculos amarillos indican la ubicación de genes implicados como posibles *loci* de susceptibilidad esquizofrenia (modificada de Craddock N et al 2005).

1.4 Genética de la esquizofrenia

El conocimiento acerca de los mecanismos fisiopatológicos moleculares de la esquizofrenia permanece incompleto y la complejidad biológica de la esquizofrenia es mucho mayor de lo esperado. Esta complejidad también aplica para desórdenes mendelianos que aunque son más fáciles de analizar con los estudios de las genealogías, a veces pueden presentar procesos biológicos intrincados, sin embargo la arquitectura de la esquizofrenia es inmensurable y más grande que la de los desórdenes genéticos simples o

mendelianos. Que la esquizofrenia sea un trastorno complejo no es sorprendente, en primera instancia el cerebro es el órgano más complejo del cuerpo humano, además el número de interconexiones neuronales en el cerebro humano es enorme ($\sim 2 \times 10^{10}$ neuronas corticales y $\sim 10^{14}$ sinapsis) y el conocimiento de las bases fisiológicas de las funciones mentales superiores está bastante incompleto (Sporns O et al 2005). La esquizofrenia pertenece a un grupo de patologías conocidas como enfermedades genéticas complejas. El conocimiento de los desórdenes complejos está evolucionando al mismo tiempo que los experimentos encuentran nuevos mecanismos biológicos que conducen a la enfermedad. Se piensa que varios genes están involucrados en cada uno de los desórdenes mentales y cada gen confiere solo un pequeño efecto sobre el fenotipo y por lo tanto, las variantes de riesgo individuales carecen de valor diagnóstico predictivo. El conocimiento está cambiando de un modelo oligogénico a uno poligénico en la esquizofrenia, pero mucha de su arquitectura genética permanece desconocida, la evidencia actual sugiere que el espectro compromete una mezcla de varias mutaciones tanto frecuentes como raras. La idea de que las enfermedades complejas son el resultado de la disfunción de redes moleculares completas cada día cobra mayor importancia en la literatura científica (Gejman PV et al 2010).

Tradicionalmente se asume que los cambios en la secuencia del DNA son los únicos responsables de la transmisión genética de la esquizofrenia, sin embargo diversos estudios en gemelos demostraron que también es posible la existencia de un mecanismo epigenético (Roth TL et al 2009). La posibilidad de la participación de un mecanismo epigenético (cambios en la expresión de los genes que no se explican por alteraciones en la secuencia del DNA) surgió como una explicación de la concordancia incompleta de la esquizofrenia en gemelos monocigóticos, pero pocas pruebas se han hecho al respecto debido a dificultades metodológicas (Petronis A 2004).

Antes de la disponibilidad de los estudios de asociación con el genoma completo (GWAS), la mayoría de los estudios consistían en analizar genes candidatos, y cerca de 800 genes fueron analizados con este fin. De hecho, la esquizofrenia es uno de los trastornos más

estudiados a través de este enfoque. En estos estudios, los genes más citados son: *DISC1*, *DTNBP1*, *NRG1*, *DRD2*, *HTR2A* y *COMT*, por mencionar algunos. Otros datos recientes de GWAS para polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) respaldan el traslape genético entre la esquizofrenia y el trastorno bipolar, ya que comparten variantes poligénicas con efecto mínimo. Un análisis genómico identificó a los genes *ZNF804A* (proteína con dedo de zinc 804A) y *CACNA1C* (canal de calcio dependiente de voltaje) con asociación en ambos trastornos (Allen NC et al 2008).

1.4.1 Genes candidato para esquizofrenia

Gracias a los estudios de ligamiento y de asociación, se han descrito diversos *loci* de susceptibilidad para el desarrollo de la ESQ, algunos de los cuales se describirán brevemente a continuación (**Figura 1**).

1.4.1.1 Disbindina (*DTNBP1*)

Los estudios de Straub et al. apoyan la participación de la proteína de unión a distrobrevina 1 (*DNTBP1*), también conocida como disbindina en la esquizofrenia. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 6p22.3, aunque sus funciones son desconocidas, probablemente sean variadas, existe evidencia de que variaciones en *DTNBP1* pueden influenciar el riesgo a esquizofrenia, a través de efectos del glutamato en la función pre-sináptica (Straub RE et al 2002).

1.4.1.2 Neuregulina 1 (*NRG1*)

En estudios de asociación, han vinculado a *NRG1* ubicado en el cromosoma 8 con esquizofrenia (Stefansson H et al 2002). *NRG1* se hipotetiza codifica para alrededor de 15 isoformas proteicas, con un rango diverso de funciones en el cerebro, incluyendo comunicación intercelular, interacciones con el receptor ERBB, sinaptogénesis, diferenciación glial, mielinización y neurotransmisión, cualquiera de éstos procesos puede potencializar la susceptibilidad a esquizofrenia.

1.4.1.3 Oxidasa de D- aminoácidos (*DAO*) y activador de la oxidasa de D- aminoácidos (*DAOA*)

El gen de la oxidasa de D-amino ácidos (12q24) se expresa en el cerebro humano donde oxida D-serina, un potente activador de los receptores tipo NMDA de glutamato. En un estudio *in vitro* de la co-incubación de G72 y DAO se reveló una interacción funcional con G72, potenciando la actividad de DAO. Por consiguiente G72, ahora es llamado activador de la oxidasa de D-aminoácidos (*DAOA* en 13q33.2), y en los mismos estudios se observó que los polimorfismos en *DAO*, se asociaban con esquizofrenia en una de las muestras. Al analizar las variantes de *DAOA* y *DAO* revelaron una evidencia modesta de interacción entre estos *loci* como riesgo para desarrollar esquizofrenia (Chumakov I et al 2002).

1.4.1.4 Regulador de señalización de proteína G 4 (*RGS4*)

El gen *RGS4* se encuentra en el cromosoma 1q22. *RGS4* es un regulador negativo de los receptores acoplados a proteína G. Existe evidencia que *RGS4* modula la actividad de ciertos receptores serotoninérgicos y receptores metabotrópicos glutamatérgicos, mientras que su propia expresión es modulada por la transmisión dopaminérgica, además *RGS4* interactúa con *ERBB3*, que puede ser relevante ya que *ERBB3* es receptor de neuregulina 1, y su expresión está disminuida en cerebros con esquizofrenia (Chowdari KV et al 2002).

1.5 CNV y esquizofrenia

Las variantes estructurales, principalmente variaciones en el número de copias (CNV) que incluyen pérdida (deleciones) o ganancia (duplicaciones) de varios millones de pares de nucleótidos conforman hasta un 5% del genoma humano. Las CNV pueden alterar la dosis génica y abarcar genes múltiples o regiones regulatorias. En general, las deleciones muestran una mayor penetrancia (fenotipo más severo) que las duplicaciones, y las CNV grandes a menudo presentan mayor penetrancia o más características clínicas que las CNV pequeñas. Estas variantes estructurales contribuyen a la variabilidad normal, riesgo para desarrollar enfermedades, anomalías del desarrollo, y son consideradas uno de los principales mecanismos mutacionales en la evolución. Las CNV pueden ser *de novo* o

familiares y pueden contribuir a la formación de desórdenes genómicos esporádicos. El proceso de duplicación o deleción puede interrumpir uno o varios genes, resultando en productos génicos alterados o cambios en la expresión alélica, además la interrupción de regiones reguladoras en el genoma puede conducir a una función alterada del gen (McCarroll SA et al 2008).

La región 22q11.2, se caracteriza por la presencia de repetidos en bajo número de copias (LCR, por sus siglas en inglés *low copy repeats*) muchas de estas LCR flanquean las CNV. En varios estudios de asociación del genoma completo se ha demostrado que se encuentran CNV *de novo* y/o raras con una frecuencia elevada en enfermedades neuropsiquiátricas. Casi todas las regiones genómicas que presentan CNV asociadas con esquizofrenia también se relacionan con otros desórdenes neuropsiquiátricos, incluyendo desórdenes del espectro autista y retraso mental. Las CNV en varias regiones parecen tener la capacidad de modular toda una gama de fenotipos, desde portadores asintomáticos hasta diferentes trastornos neuropsiquiátricos (Van Den Bossche MJ et al. 2012). La longitud de las CNV puede ir de 1Kb hasta varias Mb (**Figura 2**), y por lo tanto es más probable que tengan un mayor efecto sobre el fenotipo que los SNP. Evidencias recientes sugieren que algunas CNV específicas para ESQ se localizan en las regiones 1q21.1, 2p13.3 (*NRXN1*), 15q11.2, 15q13.2, 16p11.2 y 22q11.21 (**Figura 3**). La deleción de 3 Mb en la región 22q11.21 causa el síndrome de la deleción 22q11.2 (22q11.2 DS) e incrementa 20 veces el riesgo para desarrollar esquizofrenia. Un estudio epidemiológico encontró que 30% de los portadores 22q11.2 DS desarrolla psicosis y cerca de 80% de estos portadores la manifiesta como esquizofrenia, lo que representa el mayor factor de riesgo individual para desarrollar el trastorno. La CNV de la región 22q11.2 fue la única que alcanzó significancia en algunos GWAS para esquizofrenia y la única CNV que no se encontró en individuos control. La deleción de la región 22q11.2 tiene la mayor penetrancia, de 0.553 (95% CI 0.18-0.97). La penetrancia para otras CNV por ejemplo, la deleción 15q13.3 y la duplicación 16p11.2 son: 0.074 (95% CI 0.03-0.16) y 0.069 (95% CI 0.03-0.14), respectivamente. Por todo lo anterior, las CNV de la región 22q11.2 representan el factor

de riesgo más importante para desarrollar la ESQ (Vassos E et al 2010). Otras CNV inicialmente identificadas en casos con ESQ más adelante también se encontraron en controles sanos, sugiriendo que la penetrancia de estas CNV puede ser relativamente baja (Bassett AS et al 2010).

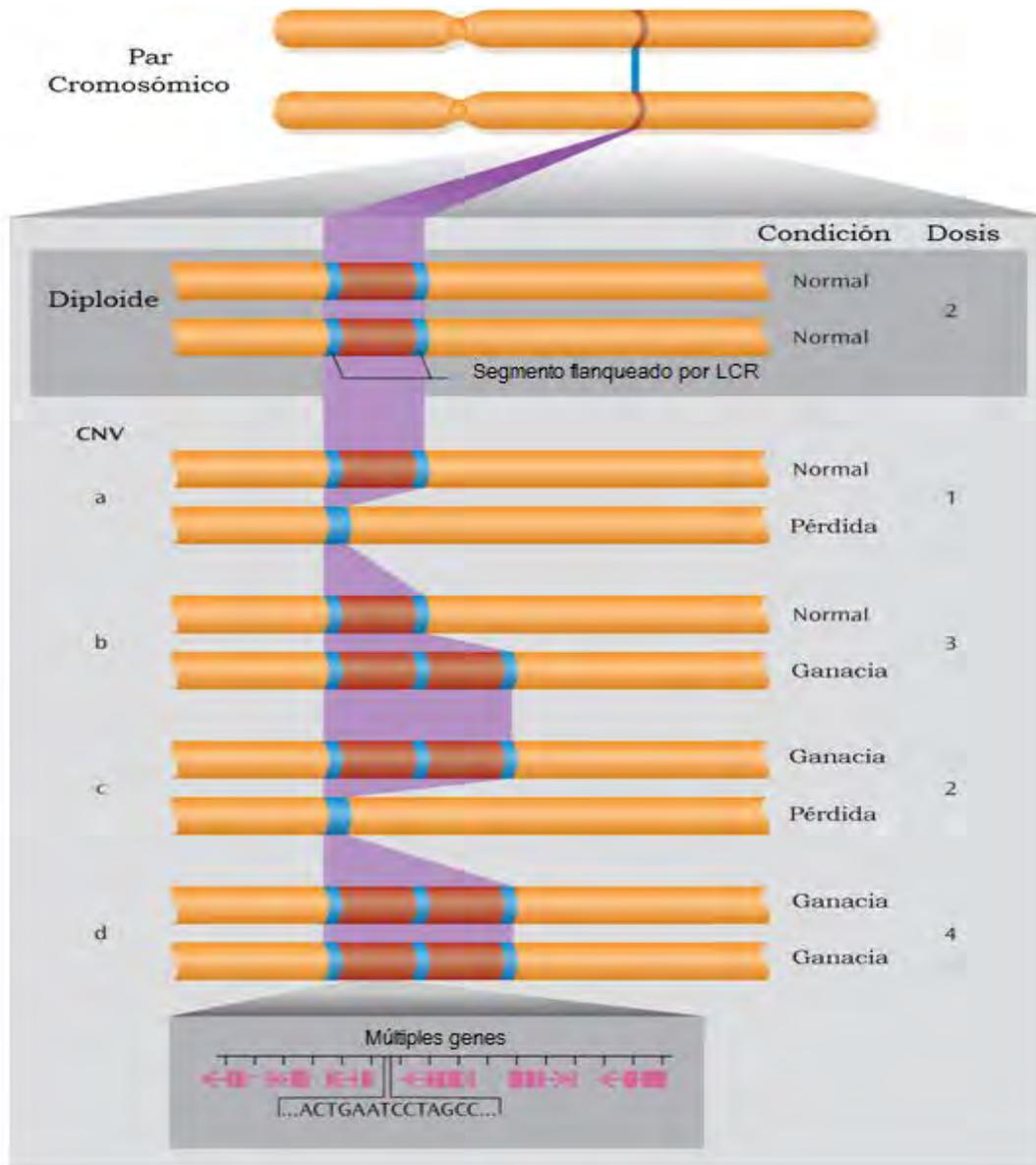


Figura 2. Ejemplo de una región cromosómica diploide normal y con CNV.

Los repetidos de bajo número de copia (LCR) incrementan el riesgo de rearrreglos cromosómicos, en el ejemplo de arriba se muestra un *status* normal, abajo se muestran los ejemplos de CNV, y se muestran los cambios en el número de copia en varias configuraciones. Una pérdida (ejemplo a) se denomina microdelección y una ganancia (ejemplo b) se denomina microduplicación (modificada de Bassett AS et al 2010).

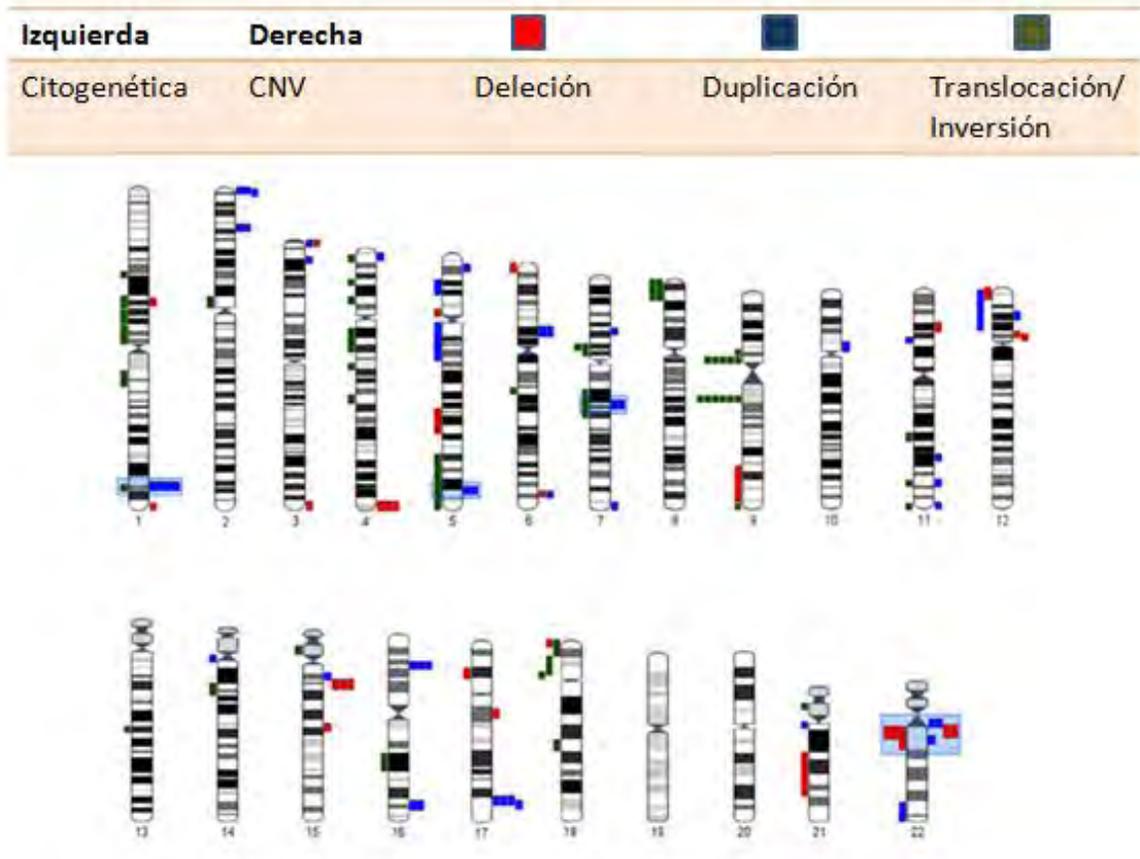


Figura 3. CNV en 834 casos con esquizofrenia, comparadas con aberraciones citogenéticas reportadas en la literatura. Del lado derecho de cada cromosoma se indican las CNV encontradas de los 834 casos de esquizofrenia, del lado izquierdo las aberraciones cromosómicas reportadas en la literatura, las barras azules representan duplicaciones o ganancias, las barras rojas indican pérdidas o deleciones y las barras verdes representan translocaciones o inversiones. Las cajas azules indican regiones donde al menos una aberración cromosómica y 2 CNV se traslapan, las regiones 1q42.3-q43 y 22q11.2 fueron reportados anteriormente por estudios de ligamiento (Badner J et al 2002) o por estudios de asociación (modificada de Allen N et al 2008).

Las CNV ya se han descrito en un amplio espectro de enfermedades que afectan múltiples sistemas del cuerpo humano (Zhang F et al 2009), incluyendo desórdenes del neurodesarrollo como enfermedades del espectro autista (Bucan M et al 2009), trastorno bipolar (Zhang D et al 2009) y esquizofrenia (Wilson GM et al 2006) (**Figura 4**).

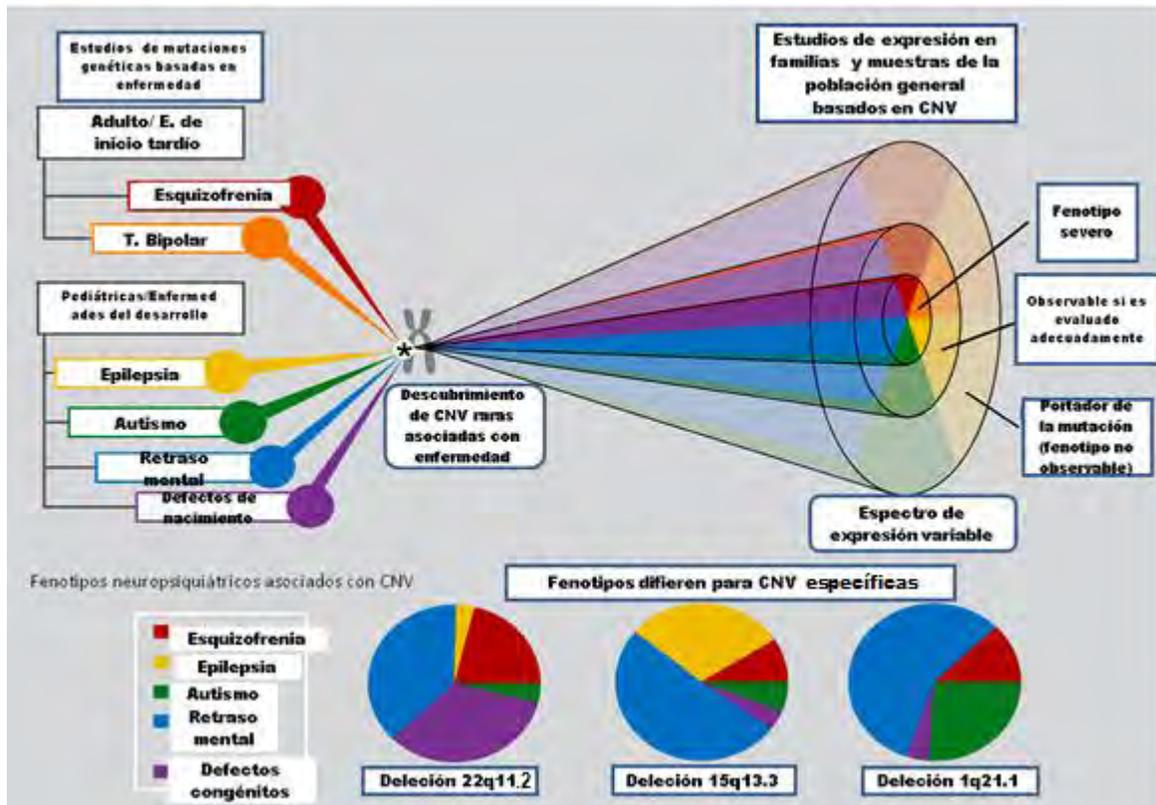


Figura 4. Fenotipos Neuropsiquiátricos asociados con CNV. El diagrama de arriba ilustra el descubrimiento de CNV raras, que fueron halladas tanto en estudios de trastornos de inicio en edad adulta, como en trastornos del desarrollo, estudiando las CNV individuales se puede delinear un espectro de su respectiva expresión fenotípica. Los gráficos de la parte inferior representan 3 CNV con alta prevalencia en esquizofrenia. Esto indica el fenotipo más común evaluado con el conocimiento actual (modificada de Bassett AS et al 2010).

Las CNV de gran tamaño pueden ejercer efectos en la estructura de la cromatina. Estas variaciones pueden ejercer efecto en la expresión de genes de regiones cromosómicas vecinas, a 1Mb de la variante estructural (Feuk L et al 2006).

Además de ser directamente relevante en la práctica clínica los hallazgos de estas CNV prometen nuevas estrategias de investigación. Mientras que ha habido una gran

aceptación de la relación genética esquizofrenia y trastorno bipolar, puede haber resistencia para aceptar que la expresión de CNV individuales también puede incluir el autismo y otros trastornos del desarrollo (**Figura 4**). Hay poca evidencia en medicina para un diagnóstico puro asociado con cambios genéticos individuales debido a la presencia de heterogeneidad genética (diferentes variantes genéticas dan el mismo fenotipo), baja penetrancia (la presencia de la variante genética no siempre se expresa como la enfermedad) y expresividad variable (la misma variante genética se expresa como un espectro fenotípico). En estudios familiares con conexión entre esquizofrenia y retraso mental (Greenwood CMT et al 2004) y estudios de esquizofrenia de inicio temprano, un subtipo clínico en el cual hay comorbilidad con desórdenes del espectro autista, también apoyan un espectro neuropsiquiátrico que incluye estas condiciones. Por otra parte, los datos sugieren que a pesar de que existe un traslape, el patrón asociado a CNV puede diferir entre esquizofrenia y autismo (**Figura 4**). Por ejemplo, mientras que las características autistas son comúnmente reportadas en niños con delección 22q11.2 que reciben seguimiento psiquiátrico, la delección 22q11.2 es raramente reportada en sujetos que son tratados por autismo (Cook EH Jr et al 2008). En contraste, los datos sugieren que la duplicación en 1q21.1 es más frecuente que la delección en personas con autismo (Marshall CR et al 2008).

El traslape genético entre la esquizofrenia y el autismo ha recibido especial interés desde que un número relevante de casos de esquizofrenia con CNV específicas presentan comorbilidades relacionadas con autismo (problemas de aprendizaje, retraso mental, comportamiento autista y epilepsia) (Franco JG et al 2012).

Reportes sugieren que las CNV contribuyen a los mecanismos genéticos de susceptibilidad a enfermedades y pueden otorgar un mejor entendimiento de la etiología, principalmente de enfermedades con un patrón de herencia complejo (Estivill X et al 2007). Se sostiene que pueden jugar un papel importante como modificadores de la penetrancia de enfermedades mendelianas y poligénicas y la expresión fenotípica de rasgos esporádicos (*de novo*, debido a rearreglos estructurales) (Lupski JR et al 2006).

Mucho queda por descubrir acerca de los mecanismos que dan lugar a las CNV y las rutas de las CNV a la expresión fenotípica reconocida como enfermedad (Stranger BE et al 2007).

1.6 Síndrome de la delección 22q11.2 y esquizofrenia

Estudios han detallado un cuadro consistente de los defectos psicológicos y deficiencias cognitivas que están asociadas con la microdelección de la región 22q11.2. Estos estudios han remarcado una fuerte asociación entre esta lesión genética y la esquizofrenia. Estudios paralelos en humanos y modelos animales están empezando a desentrañar la genética compleja y sustratos neurales alterados por la microdelección, estos hallazgos pueden guiar el análisis de otras CNV asociadas con disfunciones cognitivas y desórdenes psiquiátricos (Karayiourgu M et al 2010).

El 22q11.2 DS también conocido como síndrome velocardiofacial o síndrome de DiGeorge, es causado por una microdelección en el cromosoma 22, y tiene una incidencia de 1 en 2000-4000 nacidos vivos. Aunque se han descrito microdeleciones atípicas (Urban AE et al 2006), la mayoría de las delecciones son de 3 Mb e incluyen aproximadamente 60 genes conocidos (**Figura 5**) (Shaikh TH et al 2000), o de 1.5 Mb (incluyendo 35 genes), donde la mayoría de los genes afectados se expresan en cerebro (Maynard TM et al 2003). Cerca del 93% de los pacientes presentan delección 22q11.2 *de novo* y 7% son delecciones heredadas de alguno de los padres de manera autosómica dominante. La descendencia de individuos afectados tiene 50% de probabilidad de heredar la delección 22q11.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1523/>).

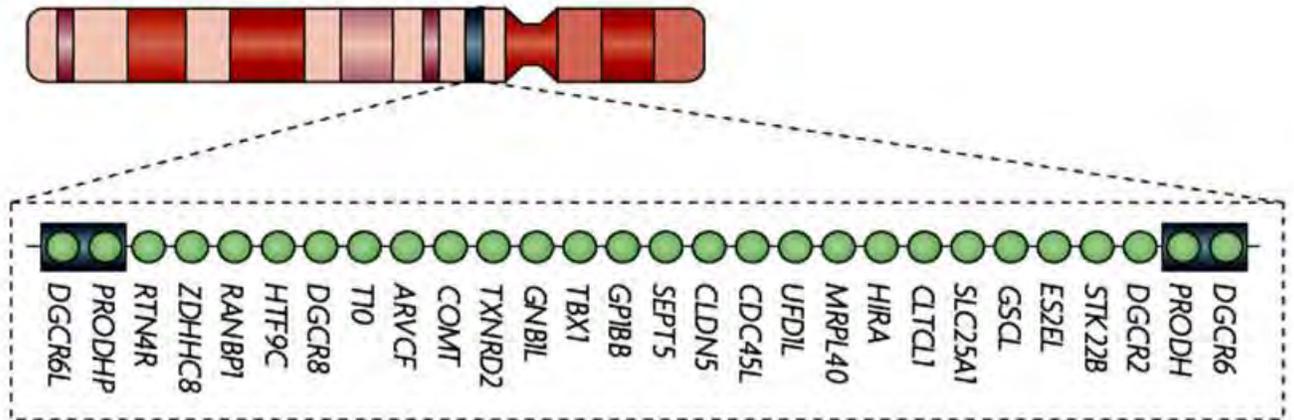


Figura 5. Localización cromosómica y organización génica del *locus* 22q11.2 en el humano (tomada de Karayiourgu M et al 2010).

El fenotipo del desorden es muy variable y puede afectar múltiples órganos y tejidos (Ryan AK et al 1997). La variabilidad fenotípica puede ser debida a otros factores genéticos y ambientales. Las manifestaciones físicas comunes del desorden incluyen anomalías craneo-faciales, cardiovasculares, inmunodeficiencia, estatura baja e hipocalcemia (Robin NH et al 2005).

Actualmente existen técnicas de alta resolución como los microarreglos para detectar CNV acoplados a hibridación genómica comparativa (CGH), que permiten refinar de manera más precisa la relación genotipo-fenotipo asociados con síndromes genómicos (Bittel DC et al 2009).

Los individuos con 22q11.2 DS también tienen alteraciones cognitivas y del comportamiento y un alto riesgo de desarrollar ESQ. La atención médica a largo plazo y el tamizaje prenatal se dirigen hacia el tratamiento y reconocimiento de estos síntomas. Además existe evidencia creciente del papel de las CNV como factor determinante de la susceptibilidad a desórdenes cognitivos y esquizofrenia (Cook EH Jr et al 2008).

Los desórdenes psiquiátricos son de naturaleza multifactorial y de etiología genética compleja. La arquitectura genética que describe la susceptibilidad a la enfermedad es caracterizada tanto por la frecuencia como por la penetrancia de los alelos de riesgo (Bodmer W et al 2008). La frecuencia se define como la proporción de cromosomas que portan el alelo de riesgo, la penetrancia se define como la proporción de individuos portadores del alelo de riesgo que presentan los síntomas de la enfermedad. La hipótesis de “alelo común – enfermedad común” enfatiza la importancia de alelos relativamente comunes, cada uno de ellos de baja penetrancia actuando en conjunto para aumentar el riesgo de la enfermedad. Contrariamente la hipótesis de “alelo raro – enfermedad común” enfatiza el impacto individual de alelos raros pero altamente penetrantes. La observación reproducible de mutaciones estructurales *de novo* raras, altamente penetrantes en 22q11.2 en casos de esquizofrenia esporádica provee la primera evidencia en apoyar la importancia de mutaciones raras recurrentes en la vulnerabilidad a desarrollar esquizofrenia (Karayiourgu M et al 1995).

Se reconoce que las mutaciones estructurales raras (tanto *de novo* como heredadas) en conjunto contribuyen con una función etiológica importante y explican una porción considerable de los casos esporádicos y familiares de las enfermedades psiquiátricas. Es de notar que las mutaciones *de novo* como la microdelección de 22q11.2 explican en parte como la ESQ persiste en la población a pesar de la baja fecundidad de los individuos afectados (Xu B et al 2008).

Existen por lo menos 3 maneras por las cuales la eliminación de genes de la región 22q11.2 puede causar el fenotipo cognitivo y psiquiátrico del desorden. Primero la microdelección puede enmascarar una o más mutaciones recesivas, segundo, un solo gen sensible a dosis puede ejercer un efecto mayor, y por último, la sub-expresión de un número de genes sensibles a dosis puede tener un efecto acumulativo. De acuerdo al modelo de sub-expresión acumulativa, aunque algunos genes puedan tener un gran impacto en el fenotipo, el desequilibrio de varios genes deletados determina el fenotipo

total. La presencia adicional de modificadores genéticos actuando en *cis* o *trans* (incluyendo variaciones de DNA en genes del cromosoma intacto) puede también contribuir a la variabilidad del fenotipo cognitivo y psiquiátrico (Taddei I et al 2001).

El 22q11.2 DS es un modelo heurístico del cual se puede aprender, la dosis baja de genes en el desarrollo y función cerebral y consecuentemente en el desarrollo de déficits cognitivos y desórdenes neuropsiquiátricos, genes dentro de la región 22q11.2 en sinergismo con otros genes fuera de la región 22q11.2 y junto con factores ambientales aún por ser identificados, determinan la estructura y función anormales del cerebro, características del 22q11.2 DS (Gothelf D et al 2008).

1.6.1 Síntomas Prodrómicos en niños con deleción 22q11.2 predictivos de esquizofrenia

Se ha documentado que los niños con microdeleción de 22q11.2 exhiben dificultades en funciones cognitivas que también se aprecian en los sujetos con esquizofrenia (Karayiourgu M et al 2010). Es poco probable que exista una relación simple entre disfunciones cognitivas individuales o en conjunto y el alto riesgo de esquizofrenia. Varios estudios han identificado patrones de síntomas prodrómicos y psicóticos en pacientes jóvenes con microdeleción 22q11.2, los síntomas más comunes parecen ser déficit de atención, ansiedad, desórdenes del humor e impedimentos en las habilidades para socializar (Feinstein C et al 2002).

1.6.2 Cambios neuro-anatómicos en el síndrome de deleción 22q11.2

Dada la bien establecida relación entre regiones o circuitos específicos del cerebro y las funciones cognitivas que están alteradas en 22q11.2 DS, es razonable sugerir que pueden existir cambios neuronales específicos en individuos con 22q11.2 DS (Johnson MH et al 2002). Como en otros desórdenes del neurodesarrollo, se ha documentado una reducción en el volumen del cerebro en niños con 22q11.2 DS, con una reducción ligeramente mayor en la región posterior comparada con la anterior y en la materia blanca en relación con la materia gris; esto al comparar con el cerebro de controles con desarrollo normal (Campbell LE et al 2006). Las estructuras aumentadas incluyen: los ventrículos laterales, la

ínsula y el caudado. Sin embargo, tanto el hipocampo, como el cerebelo medio (incluyendo el vérmix, el lóbulo anterior y el neocerebelo) están reducidos en relación con los controles (Karayiourgu M et al 2010) (**Figura 6**).

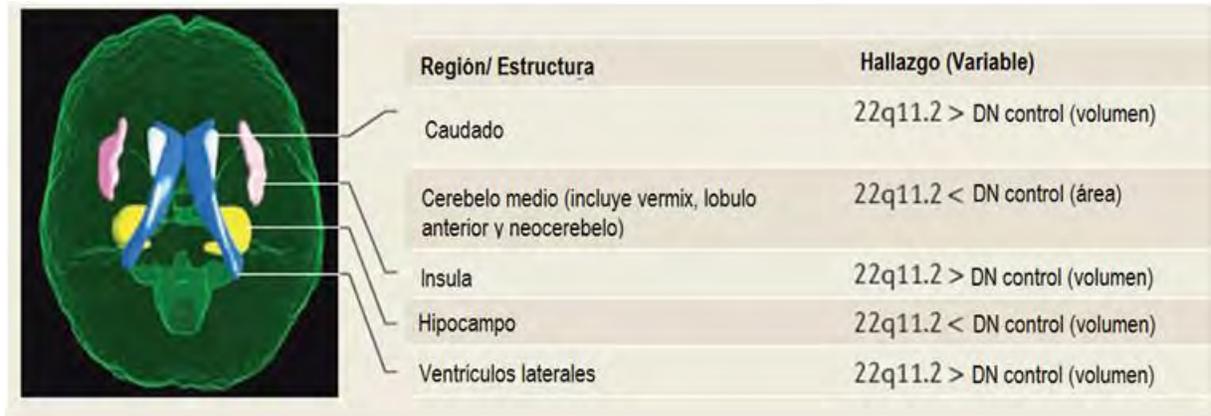


Figura 6. Neuroanatomía de regiones cerebrales de niños con síndrome de la deleción 22q11.2. Se describen los hallazgos neuro-anatómicos encontrados en ciertas regiones del cerebro de pacientes con deleción 22q11.2 comparándolos con controles sanos de desarrollo normal (DN) (modificada de Karayiourgu M et al 2010).

Los hallazgos descritos, indican un patrón de disfunción cognitiva, caracterizado por discapacidad de las funciones que involucran atención, acompañado por un alto riesgo de desarrollar esquizofrenia. Estos síntomas parecen correlacionarse con una estructura, conectividad o actividad en varias áreas corticales y subcorticales aberrantes. Dado que un gran número de genes son afectados por la microdeleción 22q11.2 estas aberraciones son probablemente debidas a anomalías combinadas en el desarrollo neuronal, en la conectividad y en la plasticidad sináptica (Karayiourgu M et al 2010).

1.6.3 Mecanismos de formación de la deleción 22q11.2

La región 22q11.2, se caracteriza por la presencia de LCR específicos de cromosoma, o duplicaciones segmentadas, muchas de estas duplicaciones flanquean las regiones genómicas asociadas con los síndromes conocidos por deleción y duplicación, y son la base de los desórdenes genómicos (Emanuel BS et al 2008).

Los LCR comparten un alto nivel de homología en sus secuencias predisponiendo a las regiones que ocupan a la recombinación homóloga no alélica (NAHR). El resultado de la

NAHR puede ser duplicación, delección o inversión de la región localizada entre ellos (Shaffer et al 2000; Feuk L et al 2006).

Dichos LCR permiten el apareamiento incompleto de bases y un entrecruzamiento no equitativo entre cromosomas homólogos (intercromosómico) o permite eventos de recombinación intracromosómica entre cromátides hermanas o intracromátida (Bumer A et al 1998; Saitta SC et al 2004).

La mayoría de los casos con del 22q11.2 (90%) son delecciones de 3Mb (abarcando hasta ~60 genes) y ocurren entre los LCR A y LCR D (**Figura 7**), ésto se conoce como la región típicamente deletada; mientras que el 8% de los casos son delecciones de 1.5Mb de tamaño (abarcando ~28 genes) entre LCR A-B. Algunos casos que se han descrito presentan delecciones atípicas de menor tamaño y de localizaciones variables (Aubry M et al 2012). Aunque los bloques de secuencias duplicadas difieren en contenido y organización de módulos compartidos (LCR A-D), estos módulos que son comunes entre los bloques comparten del 97-98% la secuencia (**Figura 7**) (Edelmann L et al., 1999; Shaikh TH et al 2000; 2001).

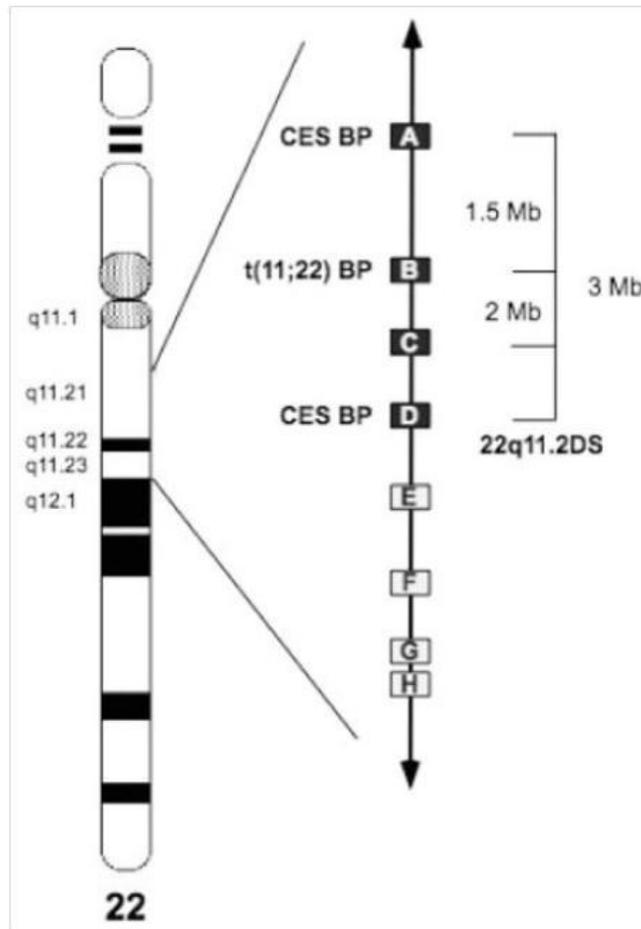


Figura 7. Ideograma del cromosoma 22 donde se indica la posición de los LCR en 22q11.2. Las cajas indican la posición de los LCR. Las cajas llenas LCR (hasta D) son aquellas que participan en numerosos rearrreglos, en corchetes se indican las deleciones más recurrentes de 22q11.2. Las cajas LCR vacías (de E a H) indican los LCR que raramente han sido involucrados en rearrreglos. También se notan los sitios de ruptura distal y proximales asociados al síndrome "ojo de gato" (CES, por sus siglas en inglés) y el sitio de ruptura de la t(11;22) asociada al síndrome de Emanuel (tomada de Aubry M et al 2012).

1.6.4 Genes de la región deletada en 22q11.2

Aunque los genes que predisponen a esquizofrenia son desconocidos, se han propuesto diversos candidatos funcionales dentro de la región perdida en 22q11.2, incluyendo a los genes de la catecol-o-metil transferasa (*COMT*), prolina deshidrogenasa (*PRODH*), gen procesador de micro RNA de la región crítica del síndrome de DiGeorge 8 (*DGCR8*), y gen

de la palmitoiltransferasa expresada en cerebro (*ZDHHC8*) (Tam GW et al 2009). A continuación se describen las características de algunos de ellos que pudieran estar implicados en el desarrollo de esquizofrenia:

1.6.4.1 *PRODH*

El gen *PRODH* localizado en el *locus* 22q11.2 ha sido implicado en el desarrollo de esquizofrenia en pacientes con la delección 22q11.2 (Liu H et al 2002). Este gen codifica para la deshidrogenasa de prolina. Esta proteína mitocondrial, cataliza el primer paso de la degradación de la prolina y en varios estudios de diferentes poblaciones, se ha propuesto a *PRODH* en la patogénesis de la esquizofrenia (Li T et al 2004).

Hay por lo menos dos mecanismos por los cuales la disminución de la actividad de *PRODH* puede perturbar la función neuronal y afectar la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. En primer lugar, la L-prolina funciona como un modulador directo de la transmisión glutamatérgica en el cerebro; en segundo lugar, varias líneas de investigación independientes han implicado a *PRODH* con el inicio de la apoptosis (Donald SP et al 2001), ya que la oxidación de prolina favorece la generación de especies reactivas de oxígeno al donar potencial reductor a una cadena transportadora de electrones. Los ratones deficientes de *Prodh* presentan alteraciones de GABA, glutamato y dopamina (Paterlini M et al 2005), además la cuantificación de los niveles de L-prolina en suero y cerebro revelan un incremento de estos valores en los ratones homocigotos para esta mutación. Este aumento de los niveles de prolina es comparable con lo observado en algunos pacientes con la delección 22q11.2 (Gogos JA et al 1999).

Las mutaciones en este gen se relacionan con hiperprolinemia de tipo 1 y susceptibilidad a esquizofrenia de tipo IV. De manera interesante, se han encontrado transcritos alternativos por corte y empalme que codifican para diferentes isoformas de este gen (Liu H et al 2002).

Aproximadamente la mitad de los individuos con 22q11.2 DS tienen niveles séricos altos de L-prolina, que puede predisponer a déficits en el aprendizaje, epilepsia (Jacquet H et al 2003), o trastorno esquizoafectivo (Jacquet H et al 2005). Adicionalmente, los ratones portadores de mutaciones de sentido equivocado en *Prodh* tienen niveles séricos altos de

L-prolina que son comparables con los observados en el 22q11.2 DS (Gogos JA et al 2006). Aunque no se detectaron anomalías en los niveles de dopamina cortical en el ratón, los ensayos de microdiálisis *in vivo* revelaron una liberación incrementada de dopamina en la corteza prefrontal, después de la administración del psicoestimulante anfetamina, los ratones deficientes del gen *Prodh*, también mostraron hipersensibilidad a los efectos locomotores de la anfetamina (Paterlini M et al 2005).

1.6.4.2 *TUPLE1*

También conocido como *HIRA* (regulador de histona del ciclo celular), *TUP1* o *DGCR1*. Este gen codifica para una chaperona de histona que coloca a la variante de histona H3.3 en el nucleosoma. Los ortólogos de este gen en levadura, mosca y plantas son necesarios para la transición de la heterocromatina en cromatina transcripcionalmente activa. *TUPLE1* es considerado uno de los principales genes candidato en algunos síndromes por haploinsuficiencia como el síndrome de DiGeorge, ya que la producción insuficiente de proteína de este gen puede alterar el desarrollo embrionario normal (Llavadot R et al 1996).

1.6.4.3 *COMT*

Este gen codifica para la catecol orto metil transferasa, enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S adenosil metionina a las catecolaminas, incluyendo a los neurotransmisores dopamina, adrenalina y noradrenalina. Esta metilación resulta en una de las principales rutas de degradación de los transmisores tipo catecolamina. Además de su papel en el metabolismo endógeno de sustancias, es importante en el metabolismo de drogas utilizadas en el tratamiento de hipertensión, asma y enfermedad de Parkinson, se encuentra de 2 formas en los tejidos una forma soluble (S-COMT) y una unida a la membrana (MB-COMT) (Shifman S et al 2002).

Las variaciones en la actividad de COMT pueden tener efectos específicos en la corteza prefrontal. La contribución de COMT en el desarrollo de esquizofrenia no está clara. La baja o alta actividad de la enzima puede contribuir a la susceptibilidad de esquizofrenia

dependiendo del contexto genético (Karayiorgou M et al 2004). Además COMT parece tener una arquitectura alélica funcional compleja con ciertos alelos. La sustitución Val158Met afecta la estabilidad de la proteína, mientras que otros alelos determinan los niveles de expresión de COMT (Bray NJ et al 2003).

El análisis de los perfiles de transcripción y manipulaciones farmacológicas revelaron una interacción transcripcional entre *PRODH* y *COMT* que modula el riesgo o la expresión de fenotipos psiquiátricos relacionados con 22q11.2. Existe la hipótesis de que la regulación positiva de *COMT* es uno de los mecanismos compensadores por el aumento de la señalización dopaminérgica provocada por la deficiencia de *PRODH* en la corteza frontal. Entonces los individuos con esquizofrenia con la delección 22q11.2 tienen desventaja ya que son hemicígotos para ambos genes y por ende incapaces de compensar la desregulación dopaminérgica cortical inducida por la deficiencia de *PRODH* (Karayiorgou M et al 2010).

1.6.4.4 *ZNF74*

Este gen codifica para una proteína de 74kDa con dominios de dedos de zinc, también conocido como: *COS52*, *hZNF7*, *ZFP520*, *ZNF520*. El gen *ZNF74* es un miembro de los genes con dedos de zinc asociados a la caja Kruppel, (KRAB, por sus siglas en inglés) y su expresión es regulada en el desarrollo del cerebro. Las proteínas con dedos de zinc del tipo TFIIIA/Kruppel pertenecen a la familia de factores de transcripción más grande en humanos. KRAB es un dominio altamente conservado presente en todos los eucariotes, desde la levadura hasta el humano, este dominio confiere una fuerte represión transcripcional de la RNA polimerasa basal y activada. El gen *ZNF74* se expresa en diferentes formas por corte y empalme alternativo de la región codificante generando 4 isoformas (**Figura 8**) (Grondin et al 1996).

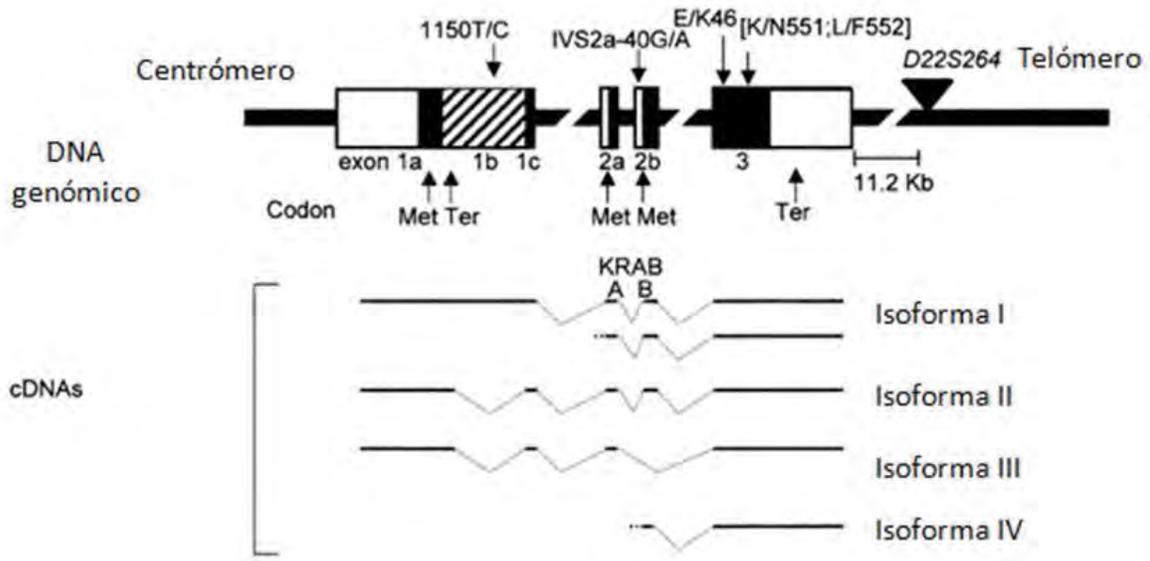


Figura 8. Organización del gen *ZNF74* y polimorfismos encontrados. Las cajas blancas indican los extremos 5' y 3' UTR, las cajas negras indican los exones, la caja rayada indica el exón 1b que tiene corte y empalme alternativo para codificar los mRNA de la isoforma II y III (modificada de Takase K et al 2001).

Estudios han sugerido que *ZNF74* participa en el control de la expresión génica como regulador transcripcional y post-transcripcional (Ravassard P et al 1999).

ZNF74 codifica una proteína de unión a RNA asociada a la matriz nuclear y pertenece a una gran subfamilia de proteínas con dedos de zinc que presentan motivos de Cisteína-Histidina (Cys_2-His_2), frecuentemente repetidos en tándem y que rodean iones de zinc y que funcionan como dominios de unión a ácidos nucleicos.

Dado que codifica para un motivo de represión y un dominio de unión a DNA, se piensa que los miembros de la familia KRAB/ Cys_2-His_2 funcionan como reguladores de la expresión génica. Aunque la presencia de un motivo KRAB y de dominios de dedos de zinc Cys_2-His_2 sugiere que *ZNF74* funciona como un factor de transcripción, también se ha demostrado que los dominios de dedos de zinc tienen actividad de unión a RNA *in vitro*. Estos resultados sugieren que *ZNF74* además de su función como regulador

transcripcional, también puede estar involucrado en el metabolismo de RNA (Grondin B et al 1997).

1.6.4.5 *PIK4CA*

Este gen, también conocido como: *PIK4CA*, *pi4K230*, *PI4K-ALPHA*, codifica para la cinasa de fosfatidil inositol 4. Esta enzima cataliza el primer paso en la biosíntesis de fosfatidil inositol 3, 4 bifosfato, estas cinasas se han clasificado en dos tipos: II y III de acuerdo a su peso molecular y su modulación por adenosina y detergente. La proteína codificada por este gen es una enzima tipo III que no es inhibida por adenosina (Szentpetery Z et al 2011).

1.6.4.6 *LZTR1*

Este gen codifica para el regulador transcripcional tipo ZL1, también conocido como *BTBD29*. El producto de este gen se ha encontrado únicamente en el complejo de Golgi ayudando a su estabilización (Kurahashi H et al 1995).

1.6.4.7 *CAT 4*

Este gen codifica para el transportador de aminoácidos catiónicos tipo 4, también conocido como *F20H23.25* o *F20H23_25*. CAT4 es un miembro de la subfamilia de los transportadores catiónicos (CAT), o transportadores de aminoácido poliamina colina (Sperandeo MP et al 1998).

1.6.4.8 *VPREB*

La proteína codificada por este gen pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa selectivamente en las primeras etapas del desarrollo de las células B, principalmente en células pro-B y pre-B. También conocido como: *IGI* o *IGVPB* (Bornemann KD et al 1997).

1.6.4.9 *ZDHHC8*

ZDHHC8 es otro gen candidato para esquizofrenia, se localiza en el *locus* 22q11.2 (**Figura 9**) codifica para la enzima palmitoil transferasa. La modificación post-traducciona de la palmitoilación proteica involucra la unión reversible de un ácido graso saturado de 16

carbonos (palmitato) a residuos específicos de cisteína y es crítico para el anclaje de proteínas a la membrana (el-Husseini Ael-D et al 2002) (**Figura 9**). Además de los pacientes con deleción 22q11.2 se encontraron variantes genéticas de *ZDHHC8* en otras poblaciones con esquizofrenia (Mukai J et al 2004). Mukai et al demostraron que la re-introducción de una proteína enzimáticamente activa *ZDHHC8* al modelo de ratón 22q11 previene los defectos dendríticos causados por la deleción. Los ratones deficientes de *Zdhhc8* tienen alteraciones similares en las neuronas del hipocampo así como déficits cognitivos y del comportamiento (Mukai J et al 2008).

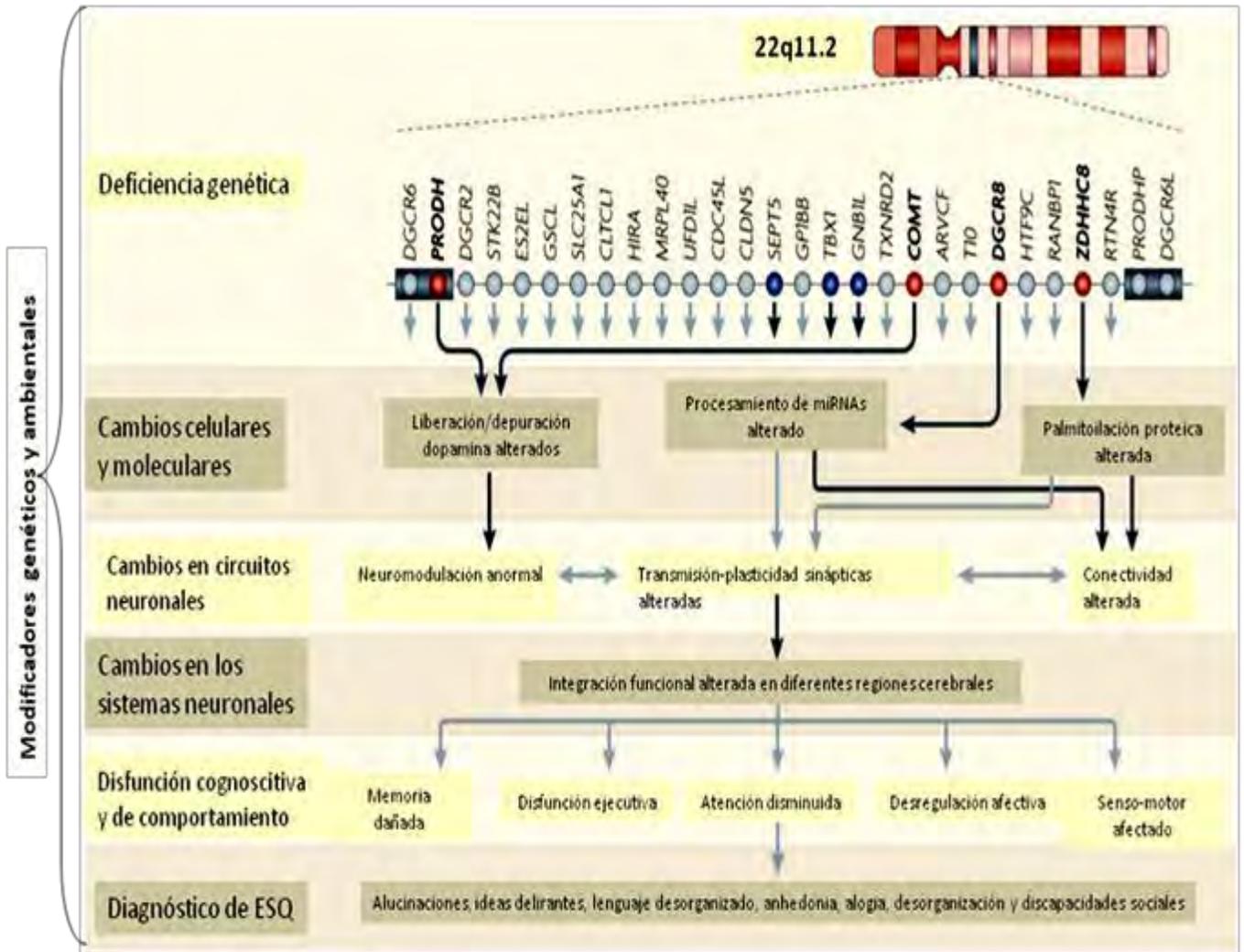


Figura 9. Modificadores genéticos (de la región 22q11.2) y ambientales que participan en el desarrollo de la esquizofrenia. Esquema que ilustra algunos genes de la región 22q11, y los mecanismos por los cuales puede llegar a la expresión del fenotipo de la esquizofrenia (modificada de Karayiorgou M et al 2010).

1.7 Modelos animales del síndrome de la delección 22q11.2

Los desórdenes psiquiátricos y cognitivos, pueden ser desestructurados en componentes fenotípicos individuales, que básicamente pueden ser analizados en modelos animales. El equivalente en ratón de la delección 22q11.2 en humanos, alberga ortólogos de todos los genes funcionales humanos excepto *CLTCL1*. Otra diferencia es que en los humanos, pero no en los ratones, alberga dos genes funcionales de la región crítica del síndrome de DiGeorge 6 *DGCR6* y *DGCR6L*, en el *locus* deletado, como resultado de una duplicación *intra locus*. A pesar de todo lo mencionado, existe un alto grado de conservación de la

región 22q11.2 que da la oportunidad de crear un modelo animal mutante válido para la etiología. De hecho, varios estudios han reportado la presencia de anomalías neuronales y del comportamiento como resultado de la delección de este *locus*. Además varios grupos han inactivado genes ortólogos individuales de la región 22q11.2 y evaluado los ratones mutantes para anomalías neuronales y del comportamiento (Arguello PA et al 2006).

El análisis de los modelos en ratón del síndrome de la delección 22q11.2 se ha enfocado principalmente en los circuitos hipocámpales y frontales porque muchas discapacidades cognitivas presentes en individuos con 22q11.2 DS probablemente dependan de estas áreas. Otros estudios sugieren que la conectividad funcional entre la corteza prefrontal y el lóbulo temporal es anormal en individuos con esquizofrenia (Ford JM et al 2002). Se han identificado rutas genéticas específicas que afectan la conectividad y neuromodulación y que pueden ser cruciales para la disfunción cognitiva y en el alto riesgo para desarrollar esquizofrenia de los individuos con 22q11.2 DS (Karayiourgu M et al 2010)

Las medidas macroscópicas de la estructura y actividad del cerebro de individuos con 22q11.2 DS sugieren que la estructura y función de la conectividad a largo alcance entre las diferentes áreas del cerebro están alteradas, anomalías que también pueden estar relacionadas con el comienzo de psicosis. Los trabajos recientes que se han centrado en la observación de las dificultades en el rendimiento de la memoria en modelos animales han ayudado a proporcionar ideas nuevas acerca de la naturaleza de la conectividad cerebral alterada, que surge como resultado de la microdelección 22q11.2. El ritmo coordinado de la actividad de poblaciones neuronales da lugar a oscilaciones en un amplio rango de frecuencias (Singer W 1992), que son usadas para sincronizar el disparo neural de células interconectadas dentro y entre diferentes áreas del cerebro. Por ejemplo, en ratones silvestres esta sincronía se incrementa durante la prueba de memoria de trabajo, mientras que los ratones *Del (Dgcr2-Hira)2Aam* muestran una reducción dramática de la sincronía HPC-CPF (Sigurdsson T et al 2010). Los resultados muestran que la microdelección 22q11.2

puede interrumpir la conectividad funcional y la sincronía entre las áreas del cerebro. Se han observado uniones anormales del HPC-CPF en pacientes con esquizofrenia, así como en individuos sanos portadores de variantes que confieren riesgo para desarrollar esquizofrenia y que pueden afectar no solo la cognición, sino también aspectos del diagnóstico clínico. Por lo tanto, el resultado sugiere que la delección 22q11.2 puede contribuir al desarrollo de esquizofrenia alterando la conectividad prefrontal (Meyer-Lindenberg AS et al 2005).

1.8 Participación de DGCR8 y miRNA en el síndrome de delección 22q11.2

Recientemente el estudio de la cepa de ratón *Del(Dgcr2-Hira)2Aam*, ha proporcionado evidencia de que la microdelección 22q11.2 resulta en un procesamiento anormal de micro RNA (miRNA) en el cerebro (**Figura 9**), una clase de RNA pequeño, no codificante que regula la estabilidad y transcripción de mRNA (Ambros V 2004). Un gen interrumpido por la delección 22q11.2 es *DGCR8*, un componente del complejo microprocesador esencial para la producción de miRNA. La haploinsuficiencia de *DGCR8*, resulta en una regulación a la baja de aproximadamente (20-70%) de un conjunto específico de miRNA maduros. Dos genes adicionales de miRNA (*miR-185* y *miR-649*) son eliminados por la microdelección 22q11.2. Un decremento sincrónico de varios miRNA puede tener un impacto considerable en la estabilidad del transcrito blanco (Stark KL et al 2008). Los blancos específicos de estos microRNA no se han reportado hasta el momento; sin embargo, el potencial de los miRNA en la regulación epigenética de la expresión de múltiples genes en el cerebro, puede ser un componente importante de la arquitectura compleja de los fenotipos psiquiátricos y cognitivos asociados con el 22q11.2 DS y también pueden contribuir con la variabilidad fenotípica observada. Este descubrimiento resalta la nueva conexión entre miRNA y los desórdenes psiquiátricos y del desarrollo neurológico (Hornstein E et al 2006).

1.9 Contribuciones genéticas a los cambios en la arquitectura neuronal en el síndrome de delección 22q11.2

Para entender las anomalías en la estructura neuronal en los modelos animales del 22q11.2 DS es importante considerar la contribución de genes individuales y rutas genéticas. La haploinsuficiencia de *DGCR8*, y los cambios consecuentes en la abundancia de miRNA pueden contribuir a los déficits del desarrollo sináptico (Kosik KS et al 2006). Otros genes localizados en la delección de 3Mb en el *locus* 22q11.2 también contribuyen a las manifestaciones neuronales del 22q11.2 DS, una proteína de unión a sintaxina (proteína 29 asociada a sinaptosoma, SNAP29) modula la función de la maquinaria de fusión membranal, un paso crucial en el reciclaje de vesículas sinápticas. Los niveles bajos de SNAP29 en neuronas primarias, afectan la transmisión sináptica (Su Q et al 2001). Las deficiencias de otro gen CRK-like (*CRKL*) (semejante al homólogo del oncogén *CT10* del virus del sarcoma aviar (v-crk) pueden afectar el señalamiento mediado por la reelina, proteína de la matriz extracelular que es crucial para el posicionamiento celular y la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro (Park TJ et al 2008). La evidencia sugiere que *COMT* juega un papel en la transmisión anormal de la dopamina (**Figura 9**). La eliminación de dopamina del espacio extracelular seguida de su liberación inducida fue 2 veces más lenta en ratones *knock out* homocigotos para *COMT*, también conocidos como (*Comt1*) (Huotari M et al 2002).

1.10 Vías principales de señalización asociadas con esquizofrenia

A la fecha se han caracterizado distintas vías de señalización involucradas en la fisiopatología de la esquizofrenia, la más conocida es la vía de la dopamina, ya que fue una de las primeras teorías en tratar de explicar los síntomas positivos de la enfermedad. A continuación se explican brevemente las vías de señalización más importantes involucradas en la patología de la esquizofrenia.

1.10.1 *NRG1* gen de la neuregulina 1

Las NRG son una familia de moléculas de señalización con un dominio extracelular de factor de crecimiento epidérmico que se une a los receptores ERBB y modulan la migración y diferenciación neuronal. Dos miembros de las NRG, *NRG1* y *NRG3* se asocian con esquizofrenia y comparten el receptor *ERBB4*. Los estudios de *NRG1* han descrito que una vez sintetizado se inserta en la membrana celular donde puede señalizar únicamente a las células adyacentes o ser liberado a través de una beta-secretasa. Después de la unión del dominio del factor de crecimiento epidérmico de *NRG1*, *ERBB4* se autofosforila o transfosforila (señalización canónica hacia adelante) o es separada por gama-secretasa para liberar el dominio intracelular C-terminal, migrando hacia el núcleo en una señalización canónica hacia atrás. La relación de los principales componentes de la ruta de señalización de NRG se muestra en la **(Figura 10)**.

En 2002, se asoció al gen *NRG1* con el desarrollo de esquizofrenia. La evidencia se ha expandido para incluir otros genes involucrados en la vía de señalización de la neuregulina. Se ha reportado que las variaciones en *NRG3* (neuregulina 3) parálogo de *NRG1*, se asocian con el desarrollo de la sintomatología delirante en pacientes con esquizofrenia. Otros estudios de asociación han descrito a *ERBB4*, el gen que codifica para el receptor de neuregulina 1 y 3 y se ha reportado que las variaciones en *ERBB4* interactúan con variaciones de *NRG1* incrementando la susceptibilidad a esquizofrenia **(Figura 10)** (Norton N et al 2006).

1.10.2 *DISC1*

DISC1 es un *locus* génico ubicado en 1q42.1 originalmente identificado en una familia escocesa, en la cual muchos de sus miembros eran portadores de una traslocación balanceada entre los cromosomas 1 y 11 (St Clair D et al 1990). De 37 individuos con la traslocación, 29 tenían diagnósticos psiquiátricos incluyendo esquizofrenia (7), trastorno bipolar (1) y depresión mayor (10). Los estudios de ligamiento y de asociación han apoyado el papel del *locus DISC1* en esquizofrenia (Chubb JE et al 2007), además otros estudios recientes han mostrado anormalidades en la expresión de variantes por corte y empalme de *DISC1* en esquizofrenia (Nakata K et al 2009). La alteración o la supresión de

DISC1 en células en cultivo y en ratón causan crecimiento, migración y orientación anormales de neuronas piramidales, así como desarrollo anormal de la corteza cerebral; cambios similares a los observados en la patología de la esquizofrenia (Kamiya A et al 2005).

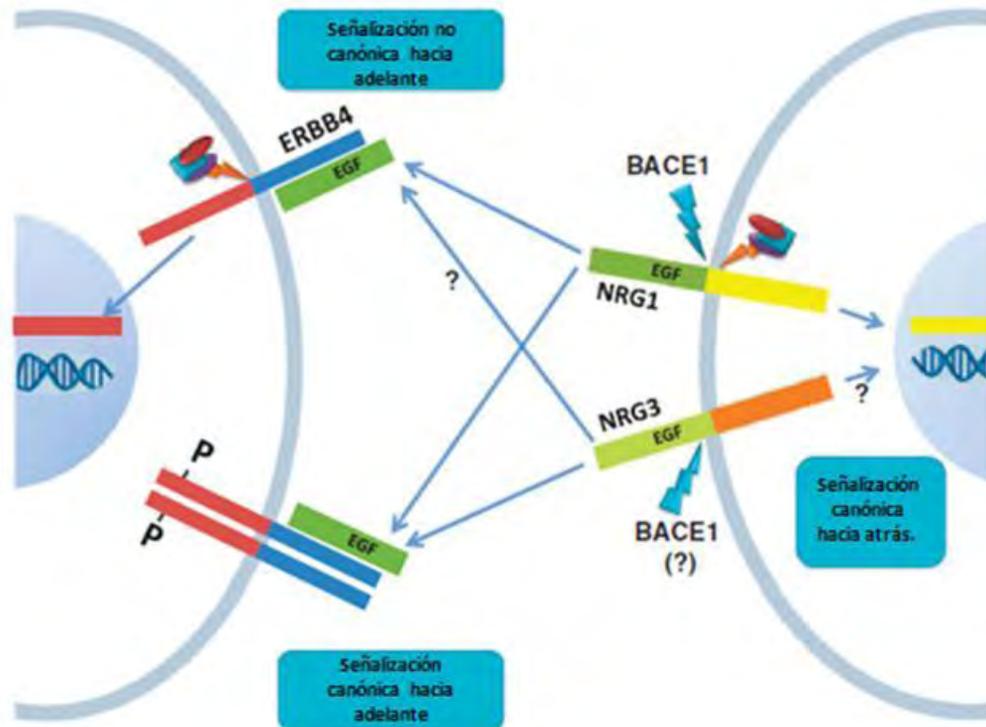


Figura 10. Esquema de señalización por Neuregulina-ERBB4. La γ -secretasa es un complejo multiproteico formado por los productos de los genes: *PSEN1*, *PSEN2*, *APH1A*, *APH1B*, *PSENEN* y *NCSTN*. La separación de NRG3 por BACE1 es hipotética y no ha sido demostrada experimentalmente (modificada de Hatzimanolis A et al 2013).

1.10.3 Vías de señalización de los neurotransmisores dopamina, glutamato y GABA

El advenimiento de los medicamentos antipsicóticos que actúan a nivel de los receptores de dopamina D2 (**Figura 11**) revolucionó el tratamiento de la esquizofrenia, principalmente aliviando los síntomas positivos. Basándose en las propiedades anti-

dopaminérgicas de estas drogas, se propuso la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, donde los síntomas positivos de la esquizofrenia son debidos a un exceso de dopamina en el estriado o área mesolímbica del cerebro (Carlsson A. 1998). En contraste los síntomas negativos están relacionados con déficits de dopamina en el área prefrontal-cortical del cerebro, probablemente a través de receptores D1 (Steinpreis RE 1996). Sin embargo, el mecanismo por el cual los bloqueadores del receptor D2 ejercen su efecto terapéutico es desconocido y las moléculas que se encuentran abajo en la cascada de señalización por dopamina y que son blancos para la eficacia terapéutica de la esquizofrenia, están por descubrirse. Esta información puede ser de utilidad para la investigación de blancos terapéuticos que puedan minimizar los efectos de la insuficiencia de la enzima COMT (**Figura 11**). La ineficacia de los medicamentos antagonistas dopaminérgicos para aliviar los síntomas cognitivos y negativos de la esquizofrenia, así como la prevalencia de enfermedades psiquiátricas en pacientes con deleción 22q11.2, ha dirigido la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en rutas diferentes a la dopamina como la ruta glutamatérgica y la gabaérgica (**Figura 12**). Así mismo es también promisorio encontrar dichos blancos terapéuticos en las rutas que implican a los genes de la región 22q11.2 que confieren susceptibilidad a padecer trastornos psiquiátricos.

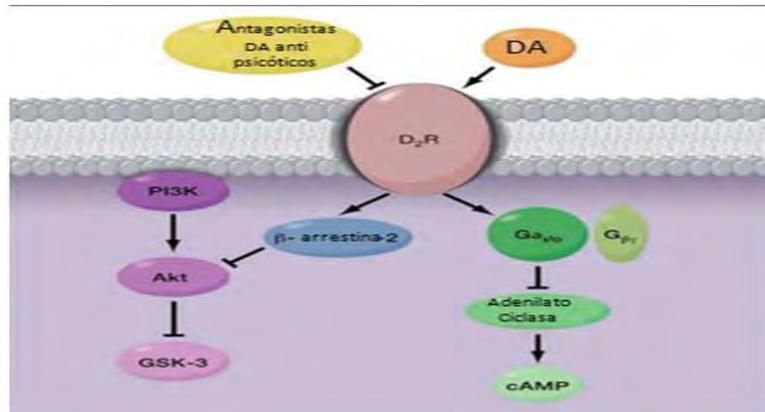


Figura 11. Señalización de dopamina. Antagonismo de los receptores dopaminérgicos D2 como propiedad unificadora de todas las drogas antipsicóticas de uso clínico. Las drogas anti-psicóticas alivian los síntomas bloqueando los receptores D2. La unión de la dopamina con su receptor D2 resulta en una vía de señalización proteína G dependiente y una vía proteína G independiente. El receptor D2 se acopla a una proteína G_i/o que modula los canales de calcio y potasio dependientes de voltaje. La unión de la dopamina también inhibe la actividad Akt (proteína cinasa B) de manera independiente a la proteína G, reclutando a la β -arrestina 2, que a su vez recluta a Akt y a la fosfatasa PP2A. PP2A defosforila Akt lo que conduce a su inactivación y aumenta la actividad de la cinasa GSK-3 (glucógeno sintasa cinasa 3) (modificada de Karam CS et al 2010).

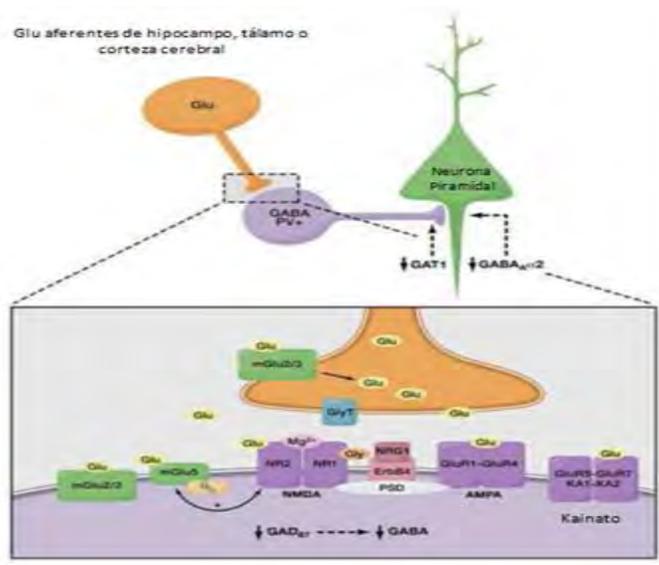


Figura 12. Señalización de glutamato y GABA. Los receptores GABA modulan la actividad en la corteza prefrontal-dorsolateral y juega un papel importante en la memoria de trabajo. La producción de GABA es controlada por GAD67 cuya expresión disminuye en pacientes con esquizofrenia, también se han observado patrones de expresión alterada del transportador de GABA (GAT1) y del receptor GABA_A subunidad 2 α . Deficits de la señalización glutamatérgica también se han implicado con esquizofrenia (modificada de Karam CS et al 2010).

1.11 Métodos de detección de las CNV

Existen varios métodos para la detección de CNV. A continuación se describen brevemente los métodos más comunes para el estudio de rearrreglos cromosómicos, incluyendo la técnica de PCR cuantitativa, utilizada en la determinación de la dosis de los diez genes estudiados en este trabajo.

1.11.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa

La PCR, es una técnica de biología molecular que utiliza secuencias específicas de DNA como templado y que puede ser copiado o amplificado miles o millones de veces, usando secuencias específicas de oligonucleótidos, una enzima DNA polimerasa y un equipo termociclador, en la PCR tradicional o de punto final, la detección y cuantificación de la secuencia amplificada se realiza después del último ciclo de la PCR e incluye un análisis post PCR que involucra una electroforesis en gel y un análisis de la imagen. En la PCR cuantitativa en tiempo real, el producto de la PCR se cuantifica en cada ciclo porque se incorpora fluorescencia. Monitoreando la reacción durante la fase exponencial de la amplificación, el usuario puede determinar la cantidad inicial del DNA blanco con gran precisión.

1.11.2 Microarreglos

Los microarreglos basados en los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y arreglos de hibridación comparativa del genoma son los métodos analíticos más usados actualmente para la detección de CNV. Ambos métodos están basados en el incremento de la intensidad de la señal de salida, cuando hay más de dos copias de un alelo específico, contrariamente una intensidad de señal más baja surge cuando hay menos de dos copias. Estos datos de intensidad son transformados vía un enfoque matemático y comparados con una muestra de referencia para determinar los CNV (Merikangas AK et al 2009).

1.11.3 Hibridación *In situ* Fluorescente (FISH)

La técnica de FISH consiste en la detección de secuencias de DNA específicas con sondas marcadas con fluorescencia sobre cromosomas o núcleos celulares fijados sobre un portaobjetos, usando para ello un microscopio de fluorescencia y un sistema de captura y procesamiento de imágenes (**Figura 13**). Tras la hibridación de las sondas con núcleos en interfase o cromosomas en metafase es posible observar la presencia de ganancias, pérdidas o fusiones entre genes (Shprintzen RJ et al 2008).

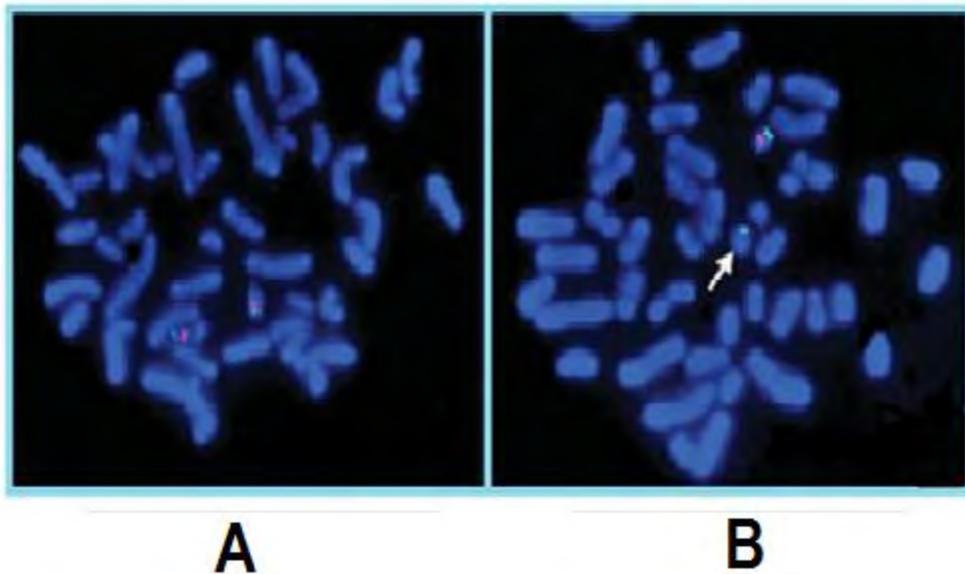


Figura 13. Hibridación *in Situ* Fluorescente. Ejemplo de un resultado de FISH positivo para la delección heterocigota de 22q11.2 empleando la sonda para *TUPLE1* (Imagen B). En un cromosoma solo se observa una señal fluorescente que corresponde a la sonda control. La imagen A muestra el FISH de una persona sin la delección 22q11.2 y por lo tanto se observan las 2 señales en cada cromosoma 22, la de la sonda control y la específica de 22q11.2 (tomada de Shprintzen RJ et al 2008).

1.11.4 Amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA)

Multiplex Ligation –Dependent Probe Amplification por sus siglas en inglés. Es una técnica de biología molecular y un procedimiento de cuantificación relativa basado en reacción de PCR, puede detectar variación en el número de copias de secuencias múltiples de DNA en

una única reacción (más de 50 secuencias génicas o genes), permite la detección de deleciones o inserciones que afectan a un solo gen o a varios genes.

Se basa en la hibridación de parejas de sondas de oligonucleótidos con secuencias específicas de DNA, una vez que las sondas hayan hibridado correctamente, se lleva a cabo la ligación de las mismas, posteriormente se amplifican las sondas por PCR, cada sonda genera un producto de amplificación marcado con fluorescencia de longitud única, el análisis de los productos se realiza por electroforesis capilar (Shouten JP et al 2002).

2. Planteamiento del problema

En el departamento de genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez (INNNMVS) se estudian diversas enfermedades neuropsiquiátricas (ENP), incluyendo trastornos del espectro de la esquizofrenia. A la fecha, no existen pruebas diagnósticas certeras del TE, TB y la ESQ. Además el espectro clínico traslapante en estas entidades hace que el diagnóstico clínico sea difícil. Por lo anterior, es necesario desarrollar pruebas moleculares o genéticas que apoyen el diagnóstico clínico de estas entidades. La deleción 22q11.2 se considera el principal factor de riesgo genético para desarrollar esquizofrenia. En nuestra población se desconoce su prevalencia, por lo que se decidió estudiar la frecuencia de esta alteración en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno bipolar o trastorno esquizoafectivo.

3. Hipótesis

La deleción de la región 22q11.2 puede explicar algunos casos con diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno bipolar o trastorno esquizoafectivo.

4. Objetivos

- Determinar la dosis de diez genes de la región 22q11.2 en pacientes con diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno bipolar o trastorno esquizoafectivo.

4.1 Objetivos secundarios

- Estandarizar la técnica de PCR cuantitativa para determinar la dosis de 10 genes de la región 22q11.2
- Identificar a pacientes con el síndrome de delección 22q11.2 no diagnosticados previamente
- Hacer una aproximación del tamaño de la delección en aquellos casos que resultaran positivos para esta CNV.
- Establecer una correlación genotipo –fenotipo de aquellos casos con CNV.

5. Sujetos y Métodos.

5.1 Sujetos de estudio.

Se incluyeron 103 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo o trastorno bipolar, a través de la consulta externa del INNNMVS. Edad promedio: 35.5 años rango (17-68 años). Todos los pacientes que se incluyeron en el protocolo firmaron una carta de consentimiento informado (anexo 1). El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Instituto. El diagnóstico clínico lo estableció un psiquiatra del Instituto. Adicionalmente se incluyeron las muestras de los progenitores del caso índice ESQ 222.

Tabla 1. Distribución por patología y por género de la muestra estudiada n=103.

Característica	Número	Porcentaje (%)
Mujeres	51	49.5
Hombres	52	50.5
EA	5	4.8
ESQ	70	68.9
TB	27	26.2
Antecedentes Heredo-familiares	15	14.5

Criterios de inclusión

- Que el paciente acepte participar en el estudio
- Que el paciente firme carta de consentimiento informado
- Que el paciente sea mestizo mexicano (MM)

De acuerdo con la definición antropológica un MM es aquel individuo con tres generaciones nacidas en México; es decir, de padres y abuelos nacidos en México. Puede aceptarse solo un abuelo español.

Criterios de exclusión

- Que el paciente no acepte participar en el estudio

- Que el paciente no firme carta de consentimiento informado
- Que el paciente sea extranjero

5.2 Toma de muestra biológica

La toma de muestra sanguínea de 10 mL de sangre periférica se realizó por venopunción con tubos *Vacutainer*[™] con citrato de sodio (22mg/mL) como anticoagulante. La muestra sanguínea se dividió en 2 alícuotas para la separación de células mononucleares (CMN) y la extracción del DNA genómico.

5.3 Separación de células mononucleares y extracción de DNA

A un volumen de la sangre obtenida se le agregaron 3 volúmenes de una solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR) [cloruro de amonio 0.155M, bicarbonato de potasio 10mM, EDTA 0.1mM] en un tubo para centrífuga. Esta mezcla se homogenizó por inversión y se centrifugó a 3000 rpm/6min. Los componentes del BLGR generan un choque osmótico a las membranas de los eritrocitos y contiene ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) como quelante iónico. Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y se trabajó con el botón o *pellet* de las CMN. Las células se resuspendieron con 1 mL de solución de BLGR y se centrifugaron a 3000 rpm/2min. Este paso se repitió hasta obtener un botón blanco. Después de decantar el sobrenadante, se agregaron 570µL de una solución de cloruro de sodio, NaCl [5mM], al botón de CMN y se dejó en agitación por 2 min. A esta reacción se adicionaron 40µL del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) [10% v/v], se homogenizó la reacción y después se le agregaron 200µL de una solución de cloruro de sodio 7M. La mezcla anterior se centrifugó a 11500 rpm/20min a 4°C. La primera solución de NaCl genera un cambio en las proteínas de la membrana citoplasmática atrapando a las moléculas de agua que rodean a éstas, para que posteriormente puedan precipitar. El SDS al ser un tensoactivo, ocasiona la formación de micelas para disolver las membranas lipídicas del núcleo celular. Finalmente el NaCl saturado favorece la precipitación de las proteínas nucleares. Después de centrifugar se obtiene un precipitado salino y proteico en el fondo del tubo y un sobrenadante viscoso.

El sobrenadante que contiene el DNA se transfiere a un tubo limpio. Se realizó partición orgánica del sobrenadante, donde la fase orgánica son 600 μ L de una mezcla de alcohol isoamílico-cloroformo en una proporción 49:1 (v/v), se agitó y se centrifugó a 14000rpm/15min. La partición orgánica separa el DNA que es soluble en agua (fase superior) de los lípidos de la membrana. Después de centrifugar se retiró cuidadosamente la fase acuosa y ésta se traspasó a otro tubo que contenía 600 μ L de etanol absoluto.

Se mezcló por inversión el sobrenadante con el alcohol para precipitar el DNA. La reacción se centrifugó a 14000 rpm/15min y se descartó el sobrenadante para quedarse con el botón de DNA. El botón se lavó con etanol al 70% (v/v) y se volvió a centrifugar de la misma forma. Se decantó el etanol y el botón de DNA se secó al vacío con temperatura baja (30-50°C). El DNA seco se resuspendió en 150 μ L de agua estéril y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche para homogenizar la solución.

5.4 Cuantificación y preparación de diluciones de DNA.

Se realizó la cuantificación de las muestras en un espectrofotómetro *Nanodrop*[®] (**Figura 14**) y se realizaron las diluciones de las muestras hasta una concentración final de 20-50ng/ μ L. En la cuantificación consideramos DNA de alta calidad a las soluciones con factor de 260/280nm>1.75 y 260/230nm>1.8, lo que nos habla de un DNA libre de proteínas y carbohidratos, respectivamente (**Figura 15**).



Figura 14. Espectrofotómetro. Equipo Nanodrop[®] utilizado para cuantificación de las muestras de DNA.



Figura 15. Cuantificación de muestras de DNA. Resultados de cuantificación de una muestra diluida de DNA con esquizofrenia, donde también aparecen los valores de los cocientes de absorbancia 260/280 y 260/230.

5.5 Estandarización de la PCR en tiempo real (PCR-TR)

Las secuencias de cada par de oligonucleótidos empleados (Tabla 2) se verificaron con la herramienta *Primer Blast* para especificidad de la región de interés y para verificar que los valores de complementariedad hacia el extremo 3' fueran valores menores a cinco. (Figura 16) Estos valores de complementariedad bajos hablan de estructuras poco estables entre los oligonucleótidos. Adicionalmente se realizaron pruebas de PCR de punto final para cada par de cebadores. Esto se hizo con la finalidad de ajustar cantidades de oligonucleótidos y evitar formación de productos inespecíficos por exceso de oligonucleótidos (Figura 16a). Las cantidades finales empleadas en la amplificación de los genes de interés y los genes de referencia se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente.

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCAAGTGCAATATTCATGTGGT	23	60.12	43.48	6.00	2.00
Reverse primer	TCCTACACGCCTGACAAAGCT	21	61.71	52.38	4.00	4.00

Products on target templates

>[NT_011519.10](#) Homo sapiens chromosome 22 genomic contig, GRCh37.p10 Primary Assembly

product length = 101

Features associated with this product:

[protein HIRA](#)

```
Forward primer 1      GGCAAGTGCAATATTCATGTGGT 23
Template       2540846 ..... 2540824

Reverse primer 1      TCCTACACGCCTGACAAAGCT 21
Template       2540746 ..... 2540766
```

>[NT_011669.17](#) Homo sapiens chromosome X genomic contig, GRCh37.p10 Primary Assembly

product length = 4673

Features flanking this product:

[612010 bp at 5' side: melanoma-associated antigen E1](#)

```
Forward primer 1      GGCAAGTGCAATATTCATGTGGT 23
Template       14585866 ....TC....T.C.....A.. 14585844

Reverse primer 1      TCCTACACGCCTGACAAAGCT 21
Template       14581194 AA.....A.T.....G. 14581214
```

Figura 16. Análisis de los pares de oligonucleótidos con la herramienta *Primer Blast*.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Se verificó la especificidad de cada par de oligonucleótidos, la complementaridad y formación de dímeros. Se muestra ejemplo de resultados para el par de oligonucleótidos que amplifica al gen *TUPLE1* o *HIRA*. Los oligonucleótidos son cien por ciento específicos para el gen de interés (no hay bases mal pareadas) y los valores de complementaridad son bajos (<5.0).

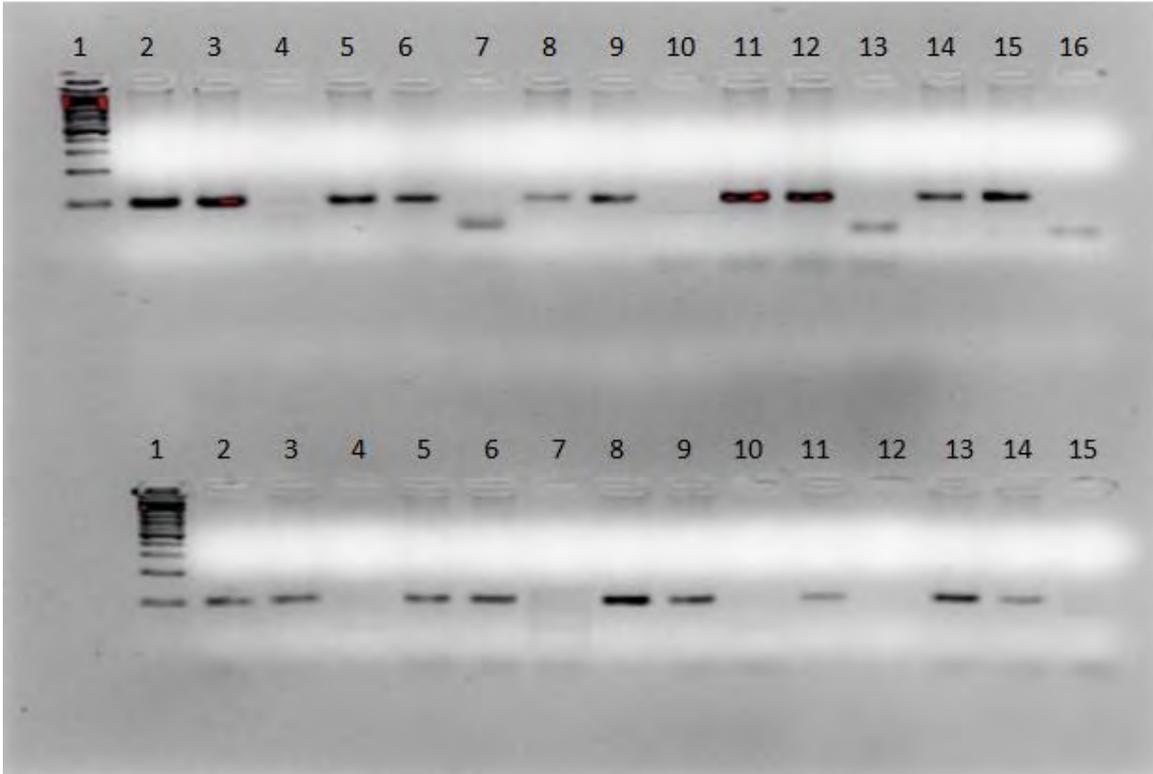


Figura 16a. Electroforesis de los productos de PCR punto final. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. Usando como amortiguador TBE al 1X. En la parte superior en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 100 a 300pb de *Axygen*. De izquierda a derecha se encuentran los carriles: 2-4 producto de PCR de *D22S181* / 5-7 *PRODHD* / 8-10 *TUPLE1* / 11-12 *COMT* / 14-16 *ZNF74* y en los carriles 4, 7, 10, 13 y 16 están los blancos respectivos. En la parte inferior, el carril uno es el mismo marcador de peso molecular y de izquierda a derecha se encuentran: carriles 2-4 producto de PCR de *PIK4CA* / 5-7 *LZTR1* / 8-10 *CAT4* / 11-12 *D22S936* / 13-15 *VPREB* y en los carriles 4, 7, 10, 12 y 15 están los blancos respectivos.

5.6 Cuantificación relativa de dosis génica por PCR en tiempo real

En este trabajo se cuantificó la dosis de 10 genes incluidos en la región 22q11.2 entre los marcadores *D22S181* y *D22S93*. La selección de los genes se basó en su relevancia funcional, su asociación con el fenotipo y en una revisión de la literatura. Se incluyeron 2 genes cuyos productos codifican para enzimas metabolizadoras de neurotransmisores (*COMT* y *PRODHD*); 3 genes, cuyos productos son factores de transcripción que participan en el neurodesarrollo (*ZNF74*, *TUPLE1* y *LZTR1*) y cuya disfunción puede ser relevante en el

fenotipo de los trastornos psiquiátricos; además se incluyeron a los genes *PIK4CA*, *CAT4* y *VPREB*, cuyos productos codifican para una cinasa de fosfatidil inositol, un transportador de aminoácidos catiónicos y un receptor de células B de estadios tempranos, respectivamente.

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos empleados para la PCR en tiempo real.

Oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)	Tamaño (pb)	Tm (°C)
<i>D22S181 F</i>	CAGCTCCCAAGTCTTTCCAGC	101	61.22
<i>D22S181 R</i>	CCAGGGTAGGAAACAGGTCGA		61.17
<i>PRODH F</i>	GGGAAAGGAGAGTTCAGGCAG	101	60.34
<i>PRODH R</i>	GCTTGTTGAATAGCCTCTGTCCTAG		61.20
<i>TUPLE1 F</i>	GGCAAGTGCAATATTCATGTGGT	101	60.12
<i>TUPLE1 R</i>	TCCTACACGCCTGACAAAGCT		61.71
<i>COMT F</i>	GTGCTACTGGCTGACAACGTGAT	100	63.26
<i>COMT R</i>	GGAACGATTGGTAGTGTGTGCA		61.13
<i>ZNF74 F</i>	TGGCCTCCTGCTTCTTTCTTC	101	60.27
<i>ZNF74 R</i>	CAGACACTCCAATTCATGACGAA		59.00
<i>PIK4CA F</i>	ATGCTTGTGCGACGCAGAC	101	61.67
<i>PIK4CA R</i>	CCTCAGCCATGTTGACTCAGC		61.28
<i>LZTR1 F</i>	TCATCATGGATGTGTACAAACTGG	103	59.06
<i>LZTR1 R</i>	AGCACGTTCTGCAGGTCCAC		63.00
<i>CAT4 F</i>	TACCTGGGCTTCTTGATGG	101	59.08
<i>CAT4 R</i>	AAGACAAGCACGCAGCCTATG		61.28
<i>D22S936 F</i>	TGGCAGCCAGTTTAGTATTCTGC	101	61.18
<i>D22S936 R</i>	TTGTAATCAAGTCCCGCCACT		59.65
<i>VPREB F</i>	CGACCATGACATCGGTGTGT	103	60.39
<i>VPREB R</i>	CTGGCTCTTGTCTGATTGTGAGA		60.31

El cambio de fluorescencia en el transcurso de la reacción se mide con un instrumento que contiene un termociclador y un detector de fluorescencia. Graficando fluorescencia vs número de ciclos. El instrumento de PCR en tiempo real genera una gráfica de amplificación que representa la acumulación del producto en el transcurso de toda la reacción de PCR.

Tabla 3. Cantidades de cada reactivo para la PCR en tiempo real de los diez genes de interés.

Para cada gen de interés	
Reactivo	Cantidad (μL)
<i>SYBR green master mix</i>	5
Oligonucleótido sentido (10 μM)	0.4
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	0.4
Agua cbp 10 μL	3.2

Pasos de la PCR en tiempo real:

1. Desnaturalización. Se usan temperaturas altas de incubación para separar la molécula de DNA de doble cadena, en cadenas sencillas. La temperatura más alta que puede soportar la polimerasa usualmente es 95°C.
2. Alineamiento. Durante esta etapa, las secuencias complementarias tienen la oportunidad de hibridar, así que una temperatura apropiada es usada en base a la temperatura de disociación (T_m) de los oligonucleótidos.
3. Extensión. De 70°C a 72°C la actividad de la DNA polimerasa es óptima y la extensión de los oligonucleótidos ocurre a una tasa de 100 bases por segundo.

Para la reacción de PCR TR de los genes de referencia, se utilizaron los siguientes reactivos:

Tabla 4. Cantidades de cada reactivo para la PCR en tiempo real de los genes de referencia.

Para el gen endógeno (<i>GAPDH</i> , <i>ASH</i> , <i>RNAse P</i>)	
Reactivo	Cantidad (μL)
<i>SYBR green master mix</i>	5
Oligonucleótido sentido (10 μM)	0.3
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	0.3
Agua cbp 10 μL	3.4

Los oligonucleótidos utilizados fueron descritos anteriormente por (Weksberg et al 2005), y son los contenidos en la Tabla 2. El programa empleado para la PCR-TR para todos los genes de la región 22q11.2 analizados y los genes de referencia se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de ciclaje para la amplificación de los genes de interés mediante PCR-TR en un equipo *STEP ONE (AB)*.

Paso	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95 °C	10 min
2. Desnaturalización	95 °C	3 seg
3. Alineamiento/elongación	60 °C	30 seg
4. Se repiten pasos 2-3 por 40 ciclos		

5.6.1 Cuantificación relativa.

En este tipo de cuantificación, es necesario incluir una referencia activa de amplificación, la cual se refiere a la amplificación de un blanco diferente de expresión constitutiva (constante), monocopia a partir de la misma muestra de DNA, bajo las mismas condiciones experimentales. El valor obtenido del gen de interés, se divide entre el valor obtenido para la referencia activa para normalizar los resultados y asegurar que las variaciones observadas, sean en realidad debidas a cambios en el genotipo y no a cantidad

variable de muestra añadida entre dos ensayos. Los genes de referencia utilizados fueron el gen que codifica para la gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y el gen de la albúmina sérica humana (*ASH*). Una vez normalizado el resultado con respecto a la referencia activa, este valor se divide entre el valor de otro ensayo elegido como calibrador (control sano) lo que resulta en un orden de magnitud con respecto al calibrador.

Se utilizó el método de cuantificación de $\Delta\Delta C_T$, (C_T = ciclo umbral: el número de ciclo en el cuál la fluorescencia alcanza el umbral de detección), en donde es necesario construir una curva de rango dinámico para el gen blanco y el control endógeno y obtener el ΔC_T (C_T gen de interés – C_T control endógeno) para cada uno de los puntos. Este ΔC_T se gráfica vs la concentración de cada uno de los puntos, y la línea obtenida debe tener una pendiente menor o igual a 0.1, la cual valida la utilización del método de ΔC_T que requiere que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y blanco) sea la misma.

Una vez validado este método ya no es necesario efectuar curvas patrón para ensayos posteriores, directamente se aplica la formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen endógeno}$$

Gen de interés: es el gen que nos interesa cuantificar (*COMT*, *PRODH*, *TUPLE* etcétera)

Gen endógeno: es el gen de expresión constitutiva cuyos niveles no cambian en las condiciones experimentales usadas (*GAPDH*, *ASH*) y necesariamente copia única en el genoma diploide para el análisis de dosis génica.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra interés} - \Delta C_T \text{ calibrador}$$

ΔC_T calibrador: muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales deseamos comparar (Control sano).

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

5.6.2 Ensayos de PCR empleando *SYBR Green*.

Durante la reacción de PCR. Al generarse una nueva molécula de DNA, ésta inmediatamente incorpora *SYBR green*, que al intercalarse y ser excitado mediante una fuente luminosa (diodo de emisión de luz o LED), genera fluorescencia, misma que será detectada por el equipo *Step One* (AB). El *SYBR green* es un compuesto intercalante inespecífico que se incorpora a cualquier molécula de DNA de doble cadena, de tal forma que si la reacción no está adecuadamente optimizada, y existen productos inespecíficos de amplificación, éstos también serán capaces de incorporar *SYBR green* y afectar la interpretación de resultados en la cuantificación.

El proceso de validación para trabajar con *SYBR* consiste en probar que un solo producto de amplificación sea generado en la reacción y que la fluorescencia registrada corresponda a ese producto en particular y no a productos inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos, para lo cual se efectúa un ensayo de disociación, en el cual la temperatura se aumenta gradualmente hasta 96°C, registrando la intensidad de fluorescencia durante este proceso. Al incrementar la temperatura, las cadenas de DNA se desnaturalizan gradualmente, disminuyendo la intensidad de fluorescencia registrada, al llegar a la temperatura de desnaturalización (*melting temperature*, T_m) del amplicón, la velocidad de disociación se incrementa drásticamente dado que el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado, la curva de amplificación presentará un punto de inflexión a esta temperatura. La derivada negativa dF/dT resulta en un pico el cuál muestra la temperatura de desnaturalización del producto de amplificación presente en la reacción. De esta forma una reacción de PCR en tiempo real en la cual se utiliza *SYBR green* debe validarse mediante este análisis que debe presentar un solo pico en la gráfica de disociación para garantizar su especificidad.

En este trabajo para el análisis de dosis génica, cada muestra de DNA se analizó por triplicado y en cada corrida se incluyeron controles positivos y negativos para la detección.

Las muestras que se emplearon como controles positivos fueron pacientes con diagnóstico clínico y molecular confirmado de síndrome de delección de 22q11 del Instituto Nacional de Pediatría y del Hospital Infantil de México, Federico Gómez. La dosis de estos controles se determinó con FISH empleando una sonda complementaria a la secuencia del gen *TUPLE1*. El análisis de estos controles positivos mediante PCR-TR confirmó la delección heterocigota de los diez genes estudiados en la muestra de referencia del INP y 8 genes deletados en la muestra del HIMFG. Las muestras que empleamos como control negativo para la delección, inicialmente fue un DNA comercial masculino del Centro de Estudios de Polimorfismos Humanos de Paris, Francia (CEPH1347-02, AB) cuyo cariotipo es normal, según especificaciones del proveedor. Una vez validado el método, incluimos dos muestras de DNA del banco de controles del departamento, de quienes se conoce su genealogía, lugar de origen, antecedentes heredofamiliares (negativos para esquizofrenia, enfermedades psiquiátricas o neurodegenerativas). Adicionalmente, incluimos un pozo de reacción negativo para templado, sin DNA. En este pozo se incluía la reacción y en lugar de añadir DNA, se agregaba el volumen equivalente de agua, para verificar que no hubiera contaminación en nuestras reacciones.

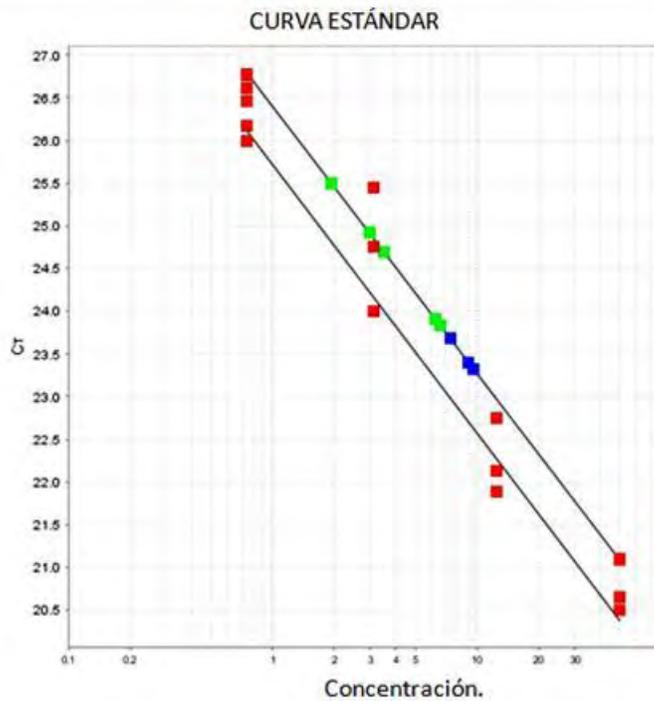
Las muestras con resultados alterados de dosis se repitieron al menos dos veces en ensayos independientes.

5.7 Validación

Se estandarizaron las condiciones de PCR-TR para los 10 genes de interés y los genes de referencia, ajustando cantidades de oligonucleótidos y evitando la formación de dímeros entre éstos (Tabla 3 y Tabla 4). Se realizaron diluciones seriadas y se ajustó el rango dinámico de concentraciones de 20-50ng de DNA. En las curvas estándar de cada región amplificada se ajustó la eficiencia de amplificación a valores cercanos al 100% (95-110%).

En la Gráfica 1 se muestra una imagen representativa de una curva estándar para determinar la eficiencia de amplificación del gen *COMT* y del gen endógeno *GAPDH*, como parte de la validación del método comparativo $\Delta\Delta C_T$. Las curvas estándar para cada gen de interés y de los genes de referencia mostraron pendientes cercanas a -3.3. En la Tabla 6

y en la Gráfica 2 se muestran los resultados de la validación de la eficiencia relativa *COMT* vs *GAPDH*. La pendiente de la gráfica del logaritmo de la concentración de DNA vs ΔC_T fue menor a 0.1 lo que es indicativo de que la eficiencia para ambos genes fue similar y se puede emplear el método comparativo de $\Delta\Delta C_T$ para su cuantificación.

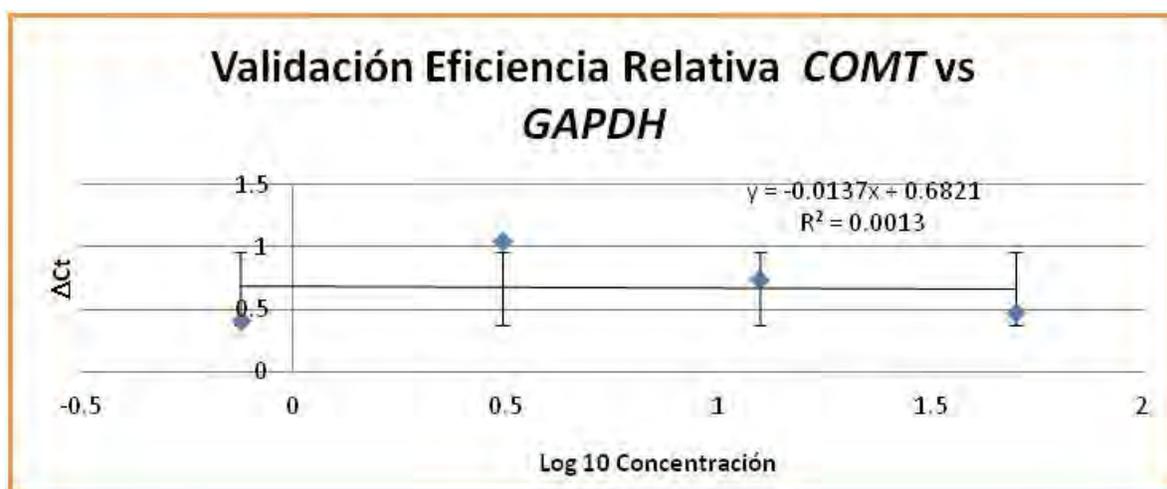


GEN	<i>COMT</i>	<i>GAPDH</i>
m	-3.10	-3.14
b	26.5	26.0
R²	0.99	0.98
Eficiencia	109	108

Gráfica 1. Gráfica representativa de una curva estándar Curva para determinar la eficiencia de amplificación del gen *COMT*, y del gen endógeno *GAPDH*, como parte de la validación del método comparativo $\Delta\Delta C_t$, en el cual se requiere de una pendiente cercana a -3.3 que corresponde a una eficiencia del 100%

Tabla 6. Datos obtenidos de la curva estándar de *COMT* y *GAPDH* para validar la eficiencia de amplificación de *COMT* vs *GAPDH*.

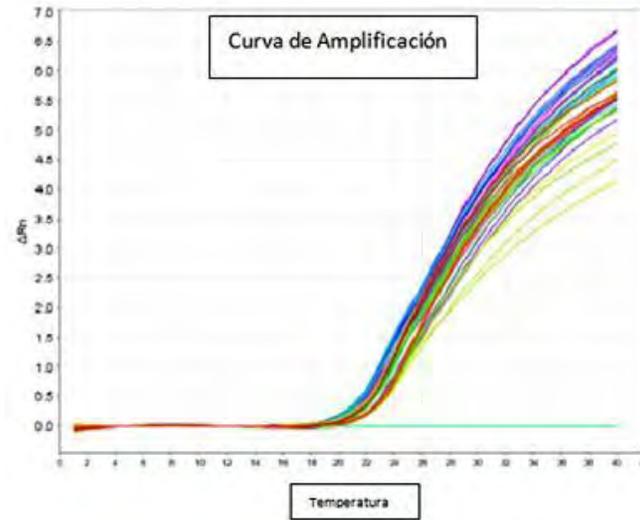
Concentración DNA (ng/ μ L)	Log ₁₀ Concentración	Δ Ct Promedio
50	1.69	0.47
12.5	1.09	0.74
3.1	0.49	1.05
0.75	-0.12	0.40



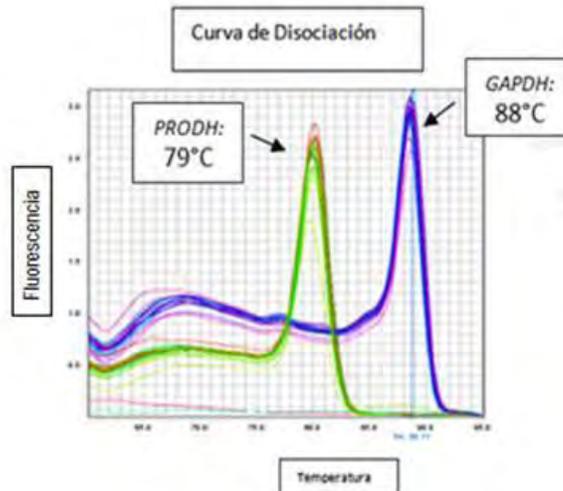
Gráfica 2. Gráfica de validación Eficiencia relativa *COMT* vs *GAPDH*. Gráfica comparativa entre el gen de interés y el gen endógeno. Se busca que la pendiente sea menor a 0.1 lo que indica que la eficiencia de ambos genes son lo suficientemente parecidas para utilizar el método comparativo de $\Delta\Delta C_T$.

Adicionalmente, en cada corrida se observaron las curvas de amplificación (Gráficas 3 y 6), se evaluaron los valores de promedio y desviación estándar de las tres réplicas de cada muestra, buscando valores de desviación menores al 10%. Asimismo, se analizaron las curvas de disociación y se observó un solo pico de T_m por gen amplificado. Las condiciones de disociación empleadas fueron con rampa de temperatura de 60°C a 95°C a una velocidad de 0.3°C/seg para liberar lentamente el agente intercalante y se detectó la temperatura del pico de máxima emisión de fluorescencia (Gráficas 4 y 7).

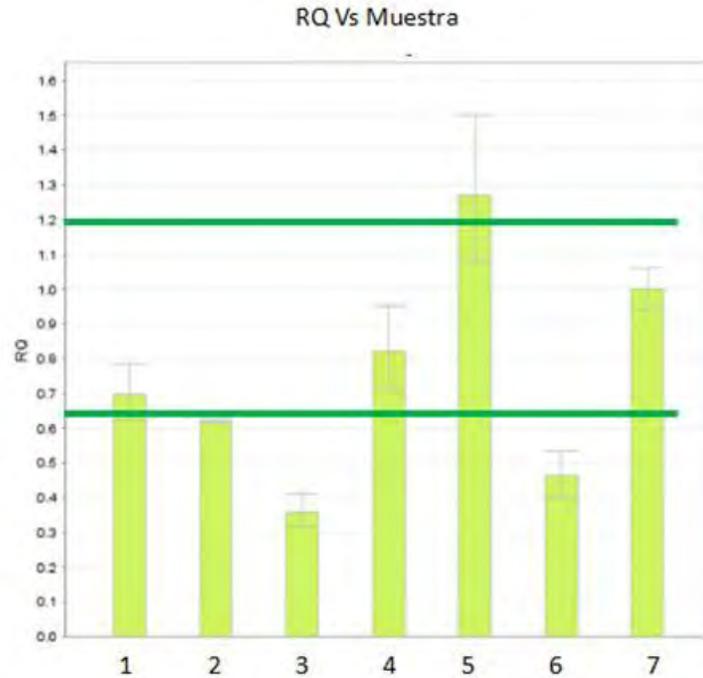
6. Resultados



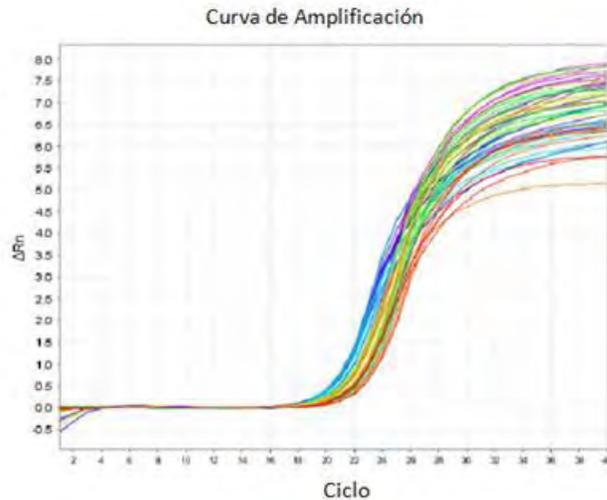
Gráfica 3. Curva de amplificación. Curva representativa de muestras de ESQ, donde se estudió el gen *PRODH*, en el eje X se grafica el número de ciclos, en el eje Y se grafica la emisión de fluorescencia.



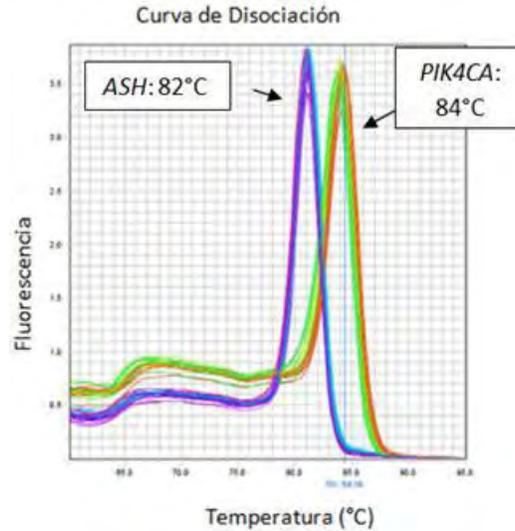
Gráfica 4. Curvas de disociación. Curvas representativas de muestras de ESQ, donde se estudió el gen *PRODH* vs *GAPDH*. Se graficó la temperatura vs la emisión de fluorescencia, el primer pico representa la T_m del producto amplificado *PRODH*, el segundo pico representa la T_m del producto amplificado para *GAPDH*.



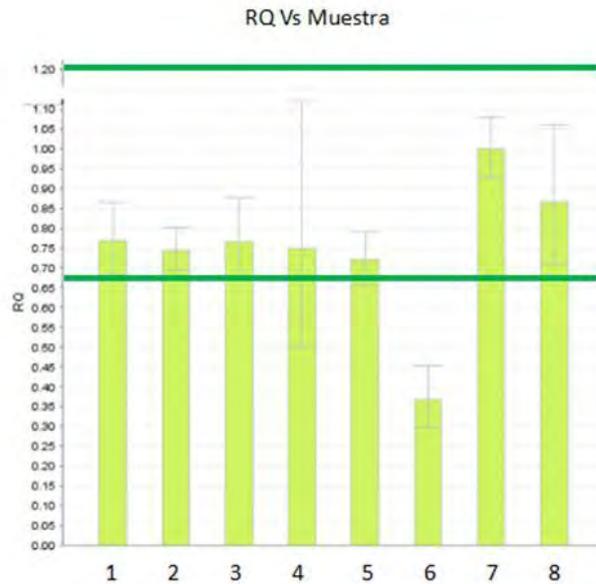
Gráfica 5. Gráfica de cuantificación relativa (RQ). Gráfica representativa de muestras de ESQ donde se estudió el gen *PRODH*, donde se utilizó *GAPDH* como gen endógeno para normalizar la dosis. Muestra 1 ESQ156, Muestra 2 ESQ167, Muestra 3 ESQ175, Muestra 4 ESQ178, Muestra 5 ESQ190, Muestra 6 ESQ 216, Muestra 7 CT209 (control). Las muestras 3 y 6 presentan delección del gen *PRODH*. Entre las líneas verdes se encuentra el rango de dosis normal (0.66-1.2).



Gráfica 6. Curva de amplificación. Curva representativa de muestras de ESQ, donde se estudió el gen *PIK4CA*, en el eje X se grafica el número de ciclos, en el eje Y se grafica la emisión de fluorescencia.



Gráfica 7. Curvas de disociación. Curva representativa de muestras de ESQ, donde se estudió el gen *PIK4CA*, donde el pico verde representa el producto amplificado *PIK4CA* y el pico azul representa el gen endógeno *ASH*.



Gráfica 8. Gráfica de cuantificación relativa. Gráfica representativa de muestras de ESQ donde se estudió el gen *PIK4CA*, donde se utilizó como gen endógeno para normalizar la dosis *ASH*. Muestra 1 ESQ 181, Muestra 2 ESQ 180, Muestra 3 ESQ 179, Muestra 4 ESQ 178, Muestra 5 ESQ 176, Muestra 6 ESQ 175, Muestra 7 ESQ 50-96, Muestra 8 ESQ 174. La muestra 6 presenta delección heterocigota del gen *PIK4CA*. Entre las líneas verdes se encuentra el rango de dosis normal (0.66-1.2)

Se identificaron las temperaturas de disociación para cada gen amplificado, en las Gráficas 4 y 7 se muestran las gráficas representativas de las curvas de disociación, donde se grafica la temperatura vs la emisión de fluorescencia, en ambas gráficas se observan 2 picos, los cuales indican la T_m del gen problema y la del gen de referencia respectivamente, al no presentarse otros picos (productos inespecíficos) se comprobó la especificidad de nuestro ensayo.

La T_m de los genes estudiados, en algunos casos se presentaba separada de la T_m del gen endógeno y era posible observar los picos de ambas, como es el caso de *GAPDH* y *PRODH*, con 79 y 88°C respectivamente (Gráfica 4). Sin embargo, en otros casos la T_m del gen de interés y del gen endógeno fueron tan cercanas que no era posible distinguir la separación de los picos, como el caso de *D22S936* y *ASH*, donde la T_m de ambos genes fue cercana a los 82°C.

En las Gráficas 5 y 8 se aprecian las gráficas de barras que muestran la cuantificación relativa de algunas muestras utilizando el método de los $\Delta\Delta C_T$, y en ellas se observa el intervalo de dosis normal marcado entre líneas verdes (0.66-1.2). En ambas gráficas el control de dosis fue la muestra número 7.

En la (**Figura 17**) se muestran los datos obtenidos para la cuantificación relativa realizada por el programa del equipo *Step One* de AB para siete muestras y un control.

Se identificaron siete casos con alteración de dosis en la región 22q11.2, seis de ellos con diagnóstico clínico de ESQ y uno de TB (Tabla 7). En relación al tamaño de la alteración, se observó que tres de los casos con diagnóstico de ESQ presentaron delección de más de un gen, abarcando la región típicamente deletada en el síndrome de delección 22q11.2 de aproximadamente 3 Mb. Estos tres casos fueron identificados como: ESQ 175, ESQ 216 y ESQ 222 (Tabla 9). El individuo ESQ 175 presentó delección de siete de los diez genes estudiados (*PRODH*, *TUPLE*, *COMT*, *ZNF74*, *PIK4CA*, *LZTR1* y *CAT4*); mientras que el paciente ESQ 216 presentó delección en ocho de los diez genes estudiados (*PRODH*, *TUPLE*, *COMT*, *ZNF74*, *PIK4CA*, *LZTR1*, *CAT4*, y *D22S936*) y el sujeto ESQ222 presentó delección de

nueve de los diez genes estudiados: *PRODH*, *TUPLE*, *COMT*, *ZNF74*, *PIK4CA*, *LZTR1*, *CAT4*, *D22S936*, y *VPREB*. En la (**Figura 18**) se aprecia un esquema con la localización de los 10 genes estudiados de la región 22q11.2 y marcado con líneas rojas se muestran las deleciones de varios genes contiguos en los tres casos identificados en este trabajo. En la misma figura, en color verde se muestra la deleción del control positivo donado por el HIMFG, en color azul diferentes deleciones descritas en la literatura y en color naranja, la deleción de cuatro casos que incluyó al gen *ZNF74*. Los tres casos con deleción aproximada de 3Mb fueron del género femenino y presentaron los cuadros clínicos más severos y con mayor número de manifestaciones clínicas del síndrome de deleción 22q11.2.

Tabla 7. Casos positivos para la delección 22q11.2 y la frecuencia.

Delección	Casos (n=103)	DX	AHF	Frecuencia (%)
7-9 genes (~3Mb)	3	ESQ	(-)	2.91
ZNF74	4	ESQ ESQ ESQ TB	(-) (-) (+) (+)	3.92

Dx: Diagnóstico, AHF: antecedentes heredo-familiares, ESQ: esquizofrenia, TB: trastorno bipolar.

#	Omit	Sample	Target	CT Mean	Δ CT Mean	Δ CT SE	$\Delta\Delta$ CT	RQ	RQ Min	RQ Max
1	<input type="checkbox"/>	Sample 1	PIK4CA	22.844	1.032	0.063	0.381	0.768	0.681	0.867
2	<input type="checkbox"/>	Sample 2	PIK4CA	22.031	1.077	0.038	0.426	0.744	0.693	0.8
3	<input type="checkbox"/>	Sample 3	PIK4CA	21.814	1.037	0.071	0.386	0.766	0.668	0.877
4	<input type="checkbox"/>	Sample 4	PIK4CA	23.267	1.069	0.208	0.418	0.748	0.501	1.118
5	<input type="checkbox"/>	Sample 5	PIK4CA	22.266	1.123	0.048	0.472	0.721	0.658	0.79
6	<input type="checkbox"/>	Sample 6	PIK4CA	22.894	2.095	0.108	1.444	0.368	0.299	0.452
7	<input type="checkbox"/>	Sample 7	PIK4CA	21.707	0.651	0.039	0	1	0.927	1.079
8	<input type="checkbox"/>	Sample 8	PIK4CA	21.485	0.858	0.067	0.207	0.867	0.709	1.059
9	<input type="checkbox"/>	Sample 1	ASH	21.812						
10	<input type="checkbox"/>	Sample 2	ASH	20.954						
11	<input type="checkbox"/>	Sample 3	ASH	20.777						
12	<input type="checkbox"/>	Sample 4	ASH	22.197						
13	<input type="checkbox"/>	Sample 5	ASH	21.143						
14	<input type="checkbox"/>	Sample 6	ASH	20.798						
15	<input type="checkbox"/>	Sample 7	ASH	21.056						
16	<input type="checkbox"/>	Sample 8	ASH	20.627						

Figura 17. Imagen representativa de los resultados obtenidos por el programa del equipo Step One de AB. Se muestra la cuantificación relativa de 7 muestras, las mismas que se muestran en la gráfica 8.

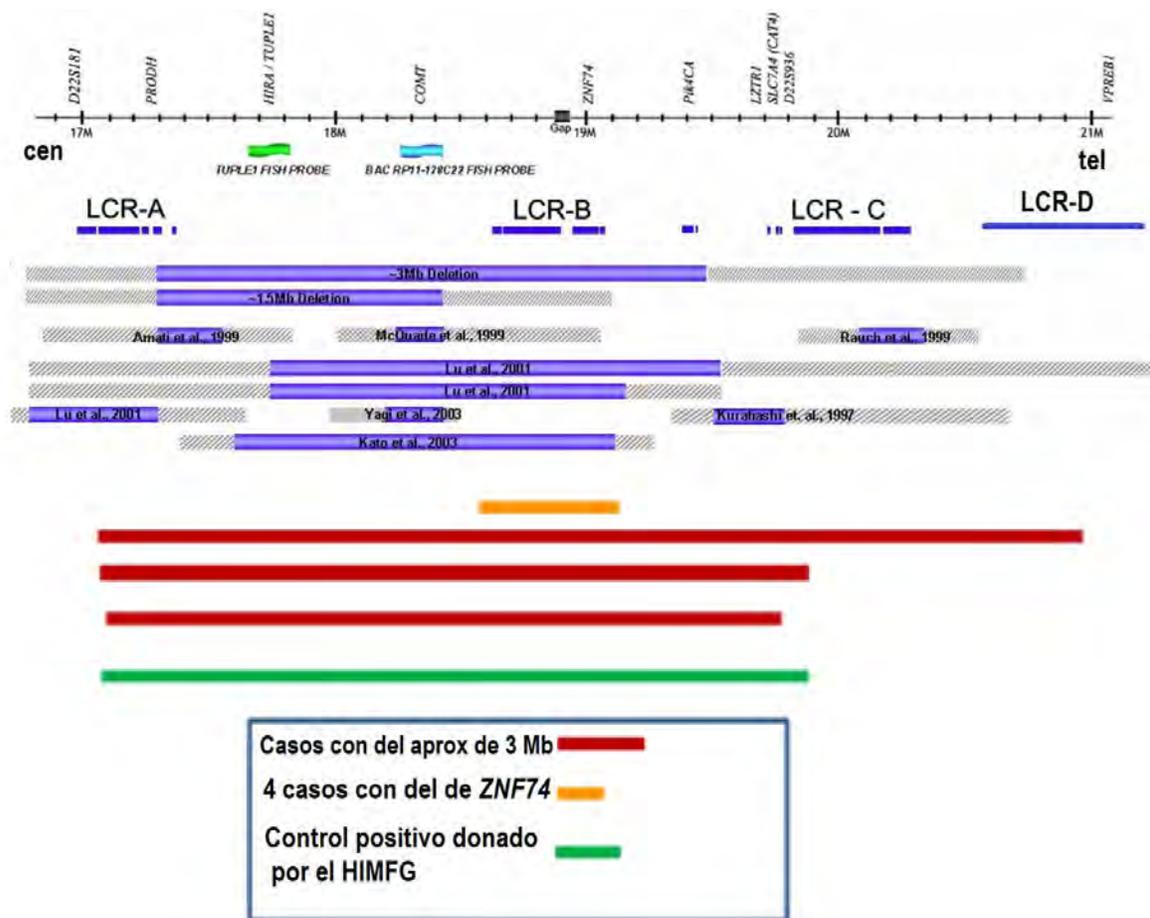


Figura 18. Esquema de la región 22q11.2. En esta imagen las tres líneas rojas y la línea naranja representan los resultados obtenidos en este estudio, la línea verde representa un control, lo reportado en la literatura se muestra en líneas azules, y se puede observar un aproximado del tamaño de la delección, además se observan los LCR de la región 22q11.2, los 10 genes estudiados se encuentran entre el LCR-A y el LCR-D. (Modificado de Weksberg R et al 2005)

Se determinó la frecuencia de la delección 22q11.2 en la muestra de pacientes mestizo-mexicanos con ESQ, TE, TB estudiada (Tabla 7). Para ello, se tomó en cuenta a los tres casos con delección de varios genes contiguos como delección mayor aproximada a 3 MB y se obtuvo una frecuencia de 2.91%. De manera independiente se obtuvo la frecuencia de la delección de *ZNF74* dando un valor de 3.92% (Tabla 7).

El paciente ESQ 175 además de los síntomas psiquiátricos, presentó hipertrofia del ventrículo derecho, estenosis de válvula pulmonar y retraso mental leve. El paciente ESQ 216 presentó, una fascies alargada, estrabismo, paladar hendido, adicionalmente a las

características clínicas de la deleción 22q11.2, presentó fascioplastías por dedos en garra, entre otras. El individuo ESQ 222 presentó hipocalcemia (5.84mg/dL; [8.6-10.2mg/dL]), linfocitopenia, hipoparatiroidismo (PTH 8.8pg/mL; [12-88pg/mL]), paladar hendido submucoso, coeficiente intelectual de 62 entre otras (Tabla 9). Estos tres casos probablemente son *de novo*, debido a que ninguno presentó antecedentes heredofamiliares de trastornos psiquiátricos al interrogatorio. Sin embargo para tener la certeza se debe realizar el estudio molecular a los padres. En los cuatro casos restantes con deleción, se observó la pérdida de un solo gen, *ZNF74* (Tabla 7); tres presentaron diagnóstico clínico de ESQ (ESQ139, ESQ 176 y ESQ 190) y uno con TB (ESQ 183). Tres de ellos fueron del género masculino y uno femenino (Tabla 9). El sujeto ESQ 190 no presentó antecedentes heredo familiares, por lo que se trata aparentemente de un caso esporádico; mientras que los otros dos individuos si tuvieron antecedentes familiares de enfermedades psiquiátricas (ESQ 176, ESQ 183), y adicionalmente en uno había antecedentes de agresividad (ESQ 139). Las genealogías de los dos casos con antecedentes de trastornos psiquiátricos se muestran en las (**Figuras 19 y 20**). La paciente femenina ESQ 176 con diagnóstico clínico de ESQ, fue hija de un matrimonio consanguíneo, presentó antecedentes de una tía por rama materna con delirios y una hermana con dos internamientos psiquiátricos, además por vía paterna presentó antecedentes de otros trastornos como anorexia, drogadicción y alteraciones del sueño y del estado de ánimo. El caso ESQ 183 fue un paciente masculino con diagnóstico clínico de TB y antecedentes de un bisabuelo materno con exhibicionismo.

Adicionalmente se logró obtener la muestra de los padres del caso ESQ 222 con deleción de 9 genes, y se analizó la dosis génica por el método ya descrito. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

La madre presentó dosis normal para los diez genes estudiados. El padre presentó deleción de dos de los diez genes estudiados (*PRODH* y *TUPLE1*). Aparentemente ninguno de los progenitores presentó rasgos fenotípicos de enfermedades psiquiátricas, de acuerdo al médico tratante.

Tabla 1. Resumen de las características clínicas de los casos con alteración de dosis de la región cromosómica 22q11.2.

Paciente (ESQ)	Edad (años)	Número de genes deletados	Sexo	Diagnóstico	Antecedentes familiares de trastornos mentales	Tratamiento	Síntomas y otras características
139	42	1/10 (ZNF74)	M	ESQ	Antecedentes de agresividad por vía paterna.	Clozapina	Retrognatia, puente nasal prominente, alucinaciones, torpeza, paranoia.
176	48	1/10 (ZNF74)	F	ESQ	Tía materna con delirios. Una hermana con dos internamientos por motivos psiquiátricos.	Haloperidol	Microcefalia leve, retrognatia, nariz bulbosa, ideas delirantes y alucinaciones.
183	27	1/10 (ZNF74)	M	TB	Posible antecedente, bisabuelo materno con TB (exhibicionismo).	Litio Clonazepam Olanzapina	Cursa con ciclos de manía alternados con depresión endógena. El episodio maniaco se expresa elevado en humor y con aumento de cantidad y velocidad del habla y de todas las actividades psicomotoras, el pensamiento se torna incoherente.
190	20	1/10 (ZNF74)	M	ESQ	Sin antecedentes.	Olanzapina Fluoxetina Clonazepam	Facies alargada, asimetría facial estructural, puente nasal prominente, hipoplasia malar, manos y dedos largos. Alucinaciones auditivas (voces de mujeres), exhibicionismo, ideas delirantes, alucinaciones, lenguaje y comportamiento desorganizado, afectividad aplanada o inapropiada.
175	30	7/10 *	F	ESQ	Sin antecedentes.	Fluoxetina Haloperidol Clonazepam	Retraso mental leve, hipertrofia del ventrículo derecho, estenosis de válvula pulmonar, microadenoma hipofisiario, trastorno depresivo, alucinaciones visuales y auditivas, ideas delirantes interpretadas como fantasmas o duendes debajo de la cama, soliloquios, des-realización (fantasmas que le hacen daño).
216	23	8/10 *	F	ESQ+TDM	Sin antecedentes.	Milnacipram Mirtazapina Clonazepam Risperidona Clozapina	Trastorno depresivo mayor con intento suicida, trastorno limítrofe de la personalidad. Probable enfermedad velo-cardio-facial. Fascioplastías por dedos en garra post-operatoria de poliposis nasal. Fascies alargada, nariz piriforme, estrabismo de ojo derecho, paladar hendido submucoso. Estudios cardiológicos normales. Ideas de minusvalía e ideas de muerte con alucinaciones auditivas peyorativas y de comando con conducta autolesiva.
222	17	9/10 *	F	ESQ + TDM	Sin antecedentes.	Fluoxetina, Clonazepam	Crisis convulsivas que iniciaron a los 3 meses de edad por hipocalcemia, reinicio de crisis convulsivas a los 9 años por hipocalcemia. Retardo en el desarrollo de algunas funciones psicológicas superiores lo que condiciona una deficiencia mental leve CI=62. Niveles bajos de hormona paratiroidea, hiperfosfatemia, linfocitopenia y sospecha de paladar hendido submucoso.

*Genes deletados: 7/10 (*PRODH, TUPLE, COMT, ZNF74, PIK4CA, LZTR1* y *CAT4*), 8/10 (*PRODH, TUPLE, COMT, ZNF74, PIK4CA, LZTR1, CAT4, D22S936*), 9/10 (*PRODH, TUPLE, COMT, ZNF74, PIK4CA, LZTR1, CAT4, D22S936, y VPREB*). TDM (trastorno depresivo mayor)

7. Discusión

Las alteraciones de la región cromosómica 22q11.2 incrementan de manera substancial el riesgo de desarrollar esquizofrenia. Aunque las micro-deleciones en esta región han sido estudiadas extensamente en diferentes poblaciones alrededor del mundo, poco se conoce de su prevalencia en sujetos mexicanos con esquizofrenia. Este es el primer estudio de prevalencia de la deleción 22q11.2 en pacientes Mestizo Mexicanos con ESQ, TE, y TB. Se identificaron siete casos (7/103, 6.8%) con alteración de dosis de la región 22q11.2, cuyo tamaño varió desde un solo gen eliminado (4/103, 3.9%) a 7-9 genes deletados (3/103, 2.9%) dentro de la región típicamente deletada en el del22q11.2 DS. Estos resultados se compararon con la frecuencia reportada para otras poblaciones. En la Tabla 9 observamos que la frecuencia de esta deleción asociada a ESQ, puede ir de 0% en pacientes holandeses (Hoogendoorn et al 2008) hasta un 2.35% en pacientes sudafricanos (Wiehahn et al 2004).

Si únicamente, se toman en cuenta los casos con deleciones grandes de la región, entonces la frecuencia de la deleción 22q11.2 en este estudio fue ligeramente superior (3/103; 2.91%) a lo reportado para otras poblaciones (\approx 2.35%) (Tabla 9). Las diferencias observadas en la frecuencia de esta alteración entre las diferentes publicaciones y nuestros resultados pueden deberse a varios factores: al tamaño de la muestra de los estudios, en parte también a la variabilidad genética interpoblacional, a los diagnósticos clínicos incluidos en cada estudio (si incluyen o no trastornos esquizoafectivo y bipolar), y de manera muy importante a la metodología empleada para detectar la deleción. En la Tabla 9 se aprecian técnicas con diferentes sensibilidades y especificidades (FISH, marcadores polimórficos y PCR semi y cuantitativa). Resulta interesante observar que en el estudio con mayor frecuencia de la deleción se emplearon FISH y SNP como metodología combinada. En el presente trabajo utilizamos PCR cuantitativa de diez genes blanco que se distribuyen a lo largo de la región típicamente deletada. La sensibilidad de esta técnica es de 10^{-6} , mayor que la del FISH (10^{-2} a 10^{-5}) (Chiang P et al 1996; Kasprzyk A et al 1997)

Tabla 9. Frecuencia de la delección 22q11.2 en pacientes con esquizofrenia de diferentes poblaciones.

Población *	Frecuencia de la delección 22q11.2 (%)	n	Método	Referencia
Norteamericana	2	100	FISH	Karayiorgou et al., 1995
Japonesa	0.3	300	FISH	Arinami et al., 2001
Inglesa	0.3	329	PCR semi-cuantitativa	Ivanov et al., 2003
Sudafricana	2.35	85	FISH y SNP	Wiehahn et al., 2004
Judía Ashkenazi	0.95	634	microsatélites y SNP	Horowitz et al., 2005
Holandesa	0	311	MLPA	Hoogendoorn et al., 2008
Canadiense	1	234	FISH	Bassett et al., 2010
Brasileña	0.6	158	MLPA	Christofolini et al., 2011
Mexicana	2.91	103	PCR cuantitativa	Presente estudio

*En los estudios se incluyeron pacientes con características del 22q11.2 DS

En el análisis cromosómico acoplado a FISH se emplea una sonda única que abarca la secuencia de un solo gen, generalmente las sondas comerciales van dirigidas contra *TUPLE1* (Vysis) o la secuencia N25. Estas secuencias vecinas se localizan en la parte proximal de la región típicamente deletada, entre los LCR A y B. El único inconveniente de estas sondas es que no son lo suficientemente sensibles como para detectar delecciones pequeñas (<40 kb) en 22q11.2. La técnica de FISH es de uso rutinario en la mayoría de los laboratorios para establecer el diagnóstico del 22q11.2 DS. En los individuos que cubren los criterios clínicos del síndrome, la técnica tiene una sensibilidad del 98-99%, pero es incapaz de detectar alteraciones proximales o distales a la sonda de FISH empleada. Dichas alteraciones distales a la sonda y de menor tamaño pueden presentarse en pacientes con trastornos psiquiátricos que no presenten otros síntomas relacionados con

el 22q11.2DS. En este estudio, aunque los tres casos con deleción mayor (ESQ175, ESQ216 y ESQ222) si abarcan al gen *TUPLE1*, la técnica de FISH habría sido incapaz de detectar los casos con deleción exclusiva del gen *ZNF74* (ESQ139, ESQ176, ESQ183 y ESQ190) y los resultados habrían sido falsos negativos. De tal manera que probablemente, la frecuencia de las deleciones pequeñas o distales a la ubicación de la sonda en esta región puede estar subestimada (Michaelovsky E et al 2012).

Adicionalmente las técnicas de FISH y MLPA son más laboriosas y requieren más tiempo que la técnica de PCR-TR. Por ejemplo, la técnica de MLPA podría ser más costosa ya que sólo es de tamizaje y requiere PCR-TR u otra técnica para confirmar los resultados. En las técnicas con microsatélites y SNP se requiere mayor densidad de marcadores genéticos (Bittel DC et al 2009).

La técnica de PCR-TR cuantitativa empleada en el presente trabajo mostró alta sensibilidad y especificidad. Inicialmente, en el control positivo donado por el HIMFG se utilizó FISH empleando como sonda el gen *TUPLE1*, al realizar la cuantificación con la técnica de PCR-TR para los diez genes estudiados en este trabajo, se pudo determinar qué genes adicionales a *TUPLE1* se encontraban deletados. El resultado de dosis mostró deleción heterocigota de ocho de los diez genes analizados (*PRODH, TUPLE, COMT, ZNF74, PIK4CA, LZTR1, CAT4, y D22S936*), lo que confiere a la técnica de PCR-TR utilizada una mayor especificidad que la técnica de FISH.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados con TB, TE o ESQ por un neuropsiquiatra del Instituto, y no se investigaron datos del síndrome de 22q11.2 DS de manera dirigida. En el protocolo de investigación tampoco se consideró la presencia de datos clínicos del síndrome de deleción 22q11.2 como criterio de exclusión. Este sesgo en nuestro estudio podría explicar la frecuencia de deleción en la región 22q11.2 en pacientes con ESQ, TB o TE mayor a la descrita en la literatura (7.21%). Si consideramos solamente a los tres casos con deleción de más de siete genes, la prevalencia de la deleción en pacientes mestizos mexicanos fue de 2.91%, ligeramente mayor que lo observado para otras poblaciones, que como se observa en la Tabla 9 oscila de 0 a 2.35%.

En la revisión de la bibliografía, observamos que en las muestras de los estudios contenidos en la Tabla 9 no se buscaron intencionadamente pacientes con esquizofrenia y con rasgos característicos de 22q11.2 DS, solo tenían que cumplir criterios diagnósticos de ESQ, independientemente del síndrome de delección 22q11.2. En contraste, en la literatura existen estudios que evaluaron la prevalencia de la delección 22q11.2 exclusivamente en pacientes con ESQ y con características indicativas de 22q11.2 DS. De manera lógica, en estos estudios se documentaron prevalencias mayores de la delección que van de 14% a 53% (Bassett AS et al 1998; Gothelf D et al 1997; Usiskin SI et al 1999). La metodología empleada nos permitió identificar dos casos con 22q11.2DS (ESQ175 y ESQ222) y confirmar la sospecha clínica en un tercer paciente (ESQ216). De tal manera que se cumplió con el objetivo particular de identificar a pacientes con el síndrome, no diagnosticados previamente. Los resultados de la prueba molecular fueron informados al psiquiatra tratante para el adecuado seguimiento médico de estos tres pacientes. De igual forma se le informó al genetista para que diera el asesoramiento genético correspondiente.

Los cuatro individuos con alteraciones de dosis de *ZNF74* no mostraron características clínicas del fenotipo del 22q11.2 DS. Por ello, se sugiere que esta alteración puede estar relacionada solo con los trastornos psiquiátricos de ESQ y TB, o ser un modificador de los mismos. Sería interesante estudiar a los familiares de estos pacientes y confirmar esta hipótesis en estudios futuros con muestras de mayor tamaño.

En los casos positivos para las delecciones, se revisaron los expedientes clínicos para tratar de establecer una correlación fenotipo-genotipo. En los tres pacientes con delección de más de siete genes (ESQ 175, ESQ 216 y ESQ 222), además de los trastornos psiquiátricos, se encontraron signos o síntomas concordantes con el síndrome de la delección 22q11.2. Sin embargo, estos síntomas no fueron homogéneos ni constantes en los tres casos: el sujeto ESQ 175 presentó afecciones cardíacas y un retraso mental leve, mientras que el paciente ESQ 216 no presentó afecciones cardíacas, pero presentó estrabismo, fascioplastías, paladar hendido submucoso, y el individuo ESQ 222 no presentó afecciones

cardiacas ni estrabismo, solo se sospechaba de paladar hendido submucoso, presentaba hipocalcemia a consecuencia del hipoparatiroidismo y linfocitopenia, manifestaciones típicas del síndrome (Tabla 8). Estas manifestaciones ponen en evidencia la gran complejidad y expresividad variable del síndrome de delección 22q11.2, como ha sido ampliamente documentado en la literatura (Leana-Cox et al 1996).

Aunque se sabe que el 93% de los casos con delección 22q11.2 son eventos *de novo*, varios grupos de investigación han encontrado que entre el 6 y 25% de éstos son heredados de manera autosómica dominante (Ryan et al 1997; Matsuoka et al 1998). La mayoría de los casos heredados provienen de madres con fenotipos neuropsiquiátricos leves. Adicionalmente, se han identificado padres de hijos afectados, portadores de la delección con un fenotipo clínico mínimo o asintomático. Esta última situación parece explicar el fenotipo asintomático en el padre de la paciente ESQ 222, portador de una delección atípica en relación al síndrome. Al aceptar participar en el protocolo, los progenitores de la paciente ESQ 222, fueron interrogados y revisados; ninguno mencionó antecedentes familiares de ESQ u otro trastorno psiquiátrico. De acuerdo al médico tratante ninguno de los padres presentó algún fenotipo característico del síndrome de la delección 22q11.2 o algún trastorno psiquiátrico. Al realizar el estudio de dosis génica, identificamos dosis normal de los 10 genes estudiados en la madre de la paciente, mientras que el padre presentó delección sólo de los genes *PRODH* y *TUPLE1*.

La delección de solo dos genes en el padre podría explicarse como un primer evento de delección de un caso familiar, que en un segundo evento de recombinación desigual haya ocasionado la delección de los diez genes que presenta su hija ESQ 222. En el padre, la delección de solo dos genes no fue lo suficientemente penetrante para presentar alguna característica clínica del síndrome o de la ESQ. Este resultado contrastaría con lo que se documenta en la literatura, donde la mayoría de los casos heredados son por vía materna (García Miñaur S et al 2002; Costain G et al 2011). Sin embargo, para saber con certeza si la delección fue heredada del padre se debe comprobar que se trata del mismo

cromosoma paterno con delección. Para ello, deben utilizarse marcadores microsatélite de la región y analizarlos en ambos progenitores y la paciente.

En la literatura también se han descrito casos de mosaicismo para la delección 22q11.2 (Halder A et al 2008), aunque han sido pocos y muy raros, las manifestaciones clínicas son variables desde muerte prematura hasta portadores asintomáticos (Mc Donald-Mc Ginn et al 1997; 2001). Si el padre es portador de mosaicismo queda por ser evaluado en estudios futuros.

El síndrome de la delección 22q11.2 es uno de los desórdenes genómicos más frecuentes. A nivel molecular la delección 22q11.2 es de tamaño variable y puede ir desde deleciones pequeñas (el tamaño mínimo aún es desconocido), hasta deleciones de aproximadamente 3Mb como los 3 casos con delección de varios genes contiguos. En el caso de los pacientes con 22q11.2DS, se ha reportado que hasta el 87% de las deleciones tiene un tamaño aproximado de 3Mb (Karayiourgu M et al 2010).

Cuatro pacientes presentaron delección de *ZNF74* (ESQ 139, ESQ 176, ESQ 183 y ESQ 190). Interesantemente, en la revisión bibliográfica del tema se observó que la mayoría de los casos con ESQ y deleciones diferentes de la región 2q11.2 incluyeron al gen *ZNF74* (Michaelovsky et al 2012; Bassett et al 2010). En el estudio de Michaelovsky, también se describió un caso con una delección rara entre *ZNF74* y *HIC2*, distal a los LCR B-D. Los diferentes tamaños de delección que involucran a *ZNF74*, quizás podrían explicarse por la recombinación de los diferentes LCR de la región.

Existe un trabajo previo donde observaron al gen *ZNF74* consistentemente deletado en el síndrome de delección 22q11.2. (Aubry M *et al* 1993) reportaron que este gen estaba deletado en 23 de 24 pacientes con 22q11.2 DS de manera heterocigota. En otro trabajo identificaron polimorfismos de *ZNF74* asociados con edad de inicio de la ESQ y más tarde otro grupo de investigadores propuso a este gen como modificador del trastorno (Takase K et al 2001). El gen *ZNF74* es importante en la transcripción de genes involucrados en el

desarrollo neuronal y en el procesamiento de RNA, por lo que se sugiere como un gen candidato en la etiopatogénesis de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Aubry M et al 1993).

De las características clínicas que presentan en común tres de los cuatro pacientes con deleción de *ZNF74* son la retrognatia y el puente nasal prominente, si estas características se deben al gen *ZNF74* o a otro cercano que no se estudió en el presente trabajo, queda aún por ser dilucidado. Probablemente a medida que se descubran los blancos específicos de *ZNF74* (DNA, RNA, proteínas) y sus funciones como regulador transcripcional y post transcripcional, este gen adquiera relevancia como candidato en los fenotipos de enfermedades psiquiátricas y se pueda estudiar con mayor detenimiento. De manera interesante, la proteína *ZNF74* interacciona con los productos de algunos genes (*TUPLE1*, *DGCR6*, *TBX1*) de la región 22q11.2 (Takase K et al 2001).

El caso diagnosticado con trastorno bipolar, presentó deleción de *ZNF74*, sin embargo la región 22q11.2 tiene alta densidad génica, y otros genes cercanos a *ZNF74*, como *ZDHH8*, entre otros que escaparon al análisis de nuestro ensayo, pueden estar deletados y contribuir al fenotipo de los trastornos psiquiátricos que abarcan un espectro que incluye al TB. Adicionalmente, este paciente no presentó los síntomas característicos de la ESQ como delirios, alucinaciones o aplanamiento afectivo.

En la literatura se ha propuesto a *ZDHH8* como gen candidato en los fenotipos psiquiátricos (incluyendo TB) del síndrome de deleción 22q11, cuyo producto se involucra en el anclaje de proteínas a la membrana celular (Karayiorgou M et al 2010). Sería interesante analizar la dosis de este gen u otros vecinos a *ZNF74* para delimitar la región deletada en estos casos. Debido a la gran diversidad de síntomas en los trastornos psiquiátricos y al traslape de algunos síntomas entre ellos, fue difícil llevar a cabo una correlación fenotipo-genotipo utilizando como criterio los diagnósticos clínicos. Además la revisión de los expedientes clínicos de los pacientes fue posterior al estudio genético y dado que los pacientes fueron valorados por diferentes médicos, los datos no fueron homogéneos y esto dificultó correlacionar ciertos parámetros. Sin embargo, lo que sí se

pudo observar fue que los casos con delección de varios genes (7-9) si presentaron mayor número de características clínicas del síndrome de delección 22q11.2 en contraste con aquellos casos que presentaron delección exclusiva de *ZNF74*, quienes solo presentaron síntomas neuropsiquiátricos.

Dos de los cuatro casos positivos para la delección de *ZNF74* (ESQ176 y ESQ 183) presentaron antecedentes familiares de enfermedades psiquiátricas. Si bien no tienen antecedentes de esquizofrenia *per se*, presentaron trastornos psiquiátricos relacionados, como: delirios, internamientos psiquiátricos no especificados, alteraciones del sueño y del ánimo, anorexia, drogadicción y exhibicionismo (**Figuras 19 y 20**). A pesar de observar los antecedentes familiares positivos en ambas genealogías, es indispensable estudiar a los progenitores y a los familiares afectados para demostrar la segregación y determinar un patrón de herencia. Lamentablemente, en este trabajo no se pudieron obtener las muestras de los familiares debido a que algunas muestras se tomaron desde hace varios años, por lo que no fue posible localizarlos y a que algunos de los casos ya no se atienden en el INNN.

En el árbol genealógico del paciente ESQ-176, se observa que hay una unión consanguínea, hecho que aumenta la probabilidad de presentar rasgos recesivos, aunque en el caso de la delección 22q11.2, ésta es dominante. El hecho de que existan antecedentes psiquiátricos en ambas ramas, es un factor que aumenta el riesgo de padecer trastornos psiquiátricos en su descendencia.

Estos dos casos (ESQ176 y ESQ 183) ilustran la herencia multifactorial de los trastornos psiquiátricos, en donde al tener familiares afectados con dichos trastornos, aumenta el riesgo de recurrencia.

Algunos de los efectos de estos genes sensibles a dosis se presentan desde edades muy tempranas de la vida. En esta muestra, la edad promedio de los casos con alteración de dosis en 22q11.2 fue de 29.6 años; es decir, se encuentran en la etapa reproductiva. Por ello, es recomendable dar asesoramiento genético a estos pacientes para toma de

decisiones reproductivas y también informarles que tienen un riesgo de recurrencia de 50% para su descendencia, dado por la probabilidad de que sus hijos reciban el cromosoma con la deleción 22q11.2, por lo que en los casos familiares sigue un patrón de herencia autosómico dominante (Costain G et al 2011).

Los tres casos con deleción de varios genes contiguos presentaron dicha deleción entre los LCR A y LCR D lo que concuerda con lo reportado en la literatura, estos LCR confieren inestabilidad a la región 22q11.2 al promover la NAHR y generar en ellos los puntos de ruptura de dichos rearrreglos. En nuestro estudio identificamos cuatro casos con deleción única del gen *ZNF74* entre los LCR B y C, de estos casos atípicos son pocos los que se han documentado en la literatura para documentar más detalladamente este evento hace falta estudiar más genes entre estos LCR. Aunque si identificamos la retrognatia en tres de los cuatro casos, las deleciones atípicas son minoría por lo que carecen de significancia estadística para establecer una relación genotipo-fenotipo (Michaelowsky E et al 2012).

La mayoría de las deleciones en 22q11.2 son *de novo* debido a la inestabilidad genómica de la región (Edelmann L et al 1999). Nuestro estudio mostró 5/7 casos aparentemente esporádicos y solo dos casos con antecedentes familiares de ESQ, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Shaikh TH et al 2000; 2001).

Las variaciones en los sitios de corte de la deleción pueden ser de utilidad para explicar las diferencias en los mecanismos que conllevan al rearrreglo cromosómico, así como explicar la extrema variabilidad del espectro fenotípico (Emanuel BS et al 2008). En este estudio solo determinamos el número de genes en dosis heterocigota, sin determinar el tamaño exacto de la deleción, el mecanismo o el origen de la misma. Para lo anterior, es necesario incluir marcadores microsatélite y realizar el análisis del DNA de los padres para comparar los alelos paternos y maternos con los del paciente, así no solamente se podría identificar el defecto cromosómico y el tamaño de la deleción, sino que también se podría definir el origen parental de ésta cuando hubiera sospecha de segregación del defecto.

Identificar CNV en individuos de riesgo o en familiares de pacientes puede ser benéfico, ya que de esta manera a los portadores de CNV se les daría un seguimiento estricto y un tratamiento adecuado tan pronto aparecieran los síntomas. Para esquizofrenia se ha demostrado que entre más corto sea el período de psicosis no tratada, mejor es la respuesta al tratamiento y más alta la posibilidad (en algunos casos) de remisión completa (Marshall M et al. 2011). Aunque uno o pocos genes pueden tener un gran impacto, es el efecto acumulativo del desequilibrio de varios genes en la delección lo que determina el fenotipo completo. La presencia de modificadores genéticos adicionales (actuando en cis o trans) y modificadores ambientales también puede contribuir a la variabilidad en los fenotipos cognitivos y psiquiátricos del síndrome (Karayiourgu M et al 2010).

Esto último explicaría, en parte, la falta de correlación genotipo-fenotipo en la muestra estudiada.

Es probable que en pocos años, el tamizaje de CNV se convierta en una parte fundamental del proceso diagnóstico de los desórdenes neuropsiquiátricos ya que puede ayudar a confirmar el diagnóstico clínico y permitir el diagnóstico presintomático en los individuos en riesgo familiar (Van Den Bossche MJ et al. 2012).

Es de notar que muchas CNV asociadas con ESQ tienen un efecto de dosis de genes que participan en el neurodesarrollo e involucran proliferación neuronal, migración neuronal o formación de sinapsis (Walsh T et al 2008) y en el modelo actual de la ESQ, se piensa que los cambios tempranos en el neurodesarrollo pueden estar involucrados en la patogenia de la ESQ (**Figura 21**). Este modelo tiene consecuencias importantes con respecto al potencial para predicción pre-sintomática y por ende la atenuación, retraso o prevención de la psicosis así como asesoramiento genético oportuno (Rapoport JL et al 2005).

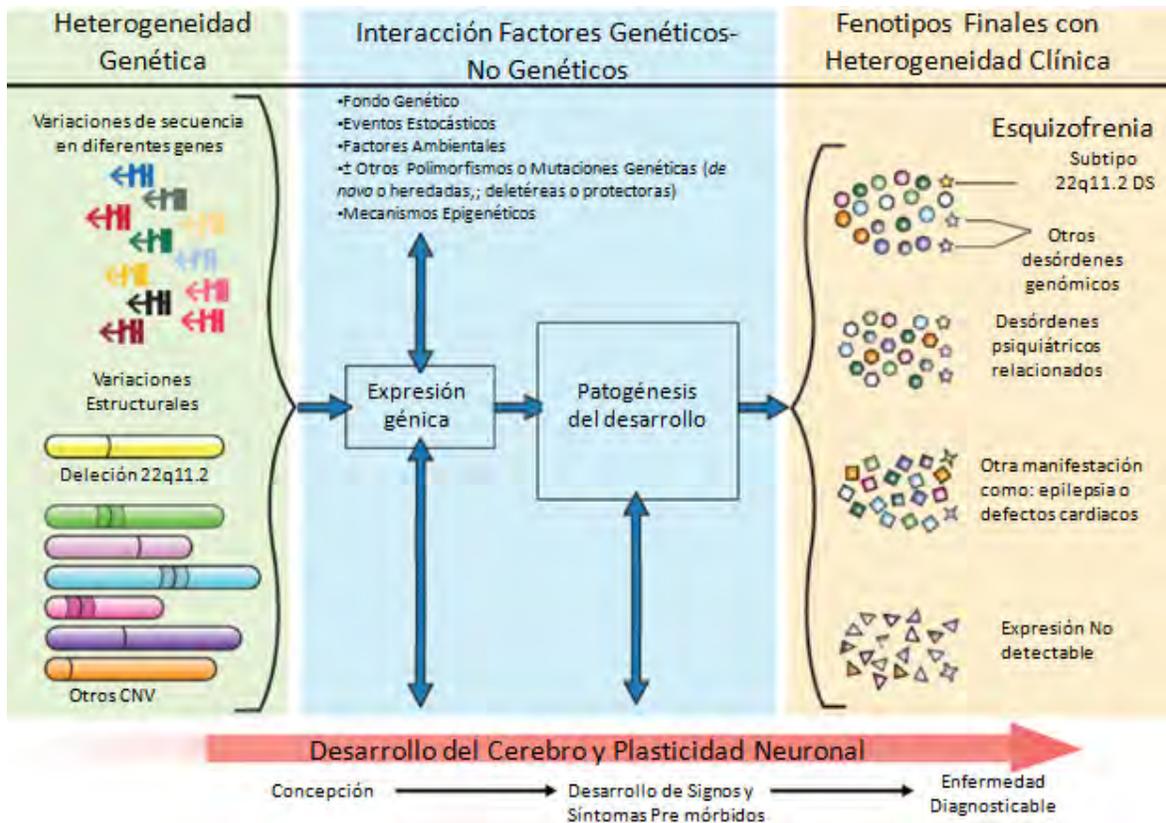


Figura 21. Modelo del Neurodesarrollo de la Esquizofrenia. Modelo descrito por los nuevos descubrimientos genético-moleculares. Una o más mutaciones de secuencia o estructurales heredadas o *de novo* de uno o varios genes y actuando individual o colectivamente se propone como el evento causal inicial. El camino de genotipo a fenotipo es descrito como un proceso dinámico que comienza antes o después de la concepción e involucra la expresión génica (incluyendo, pero no exclusivamente la actividad proteica) y la interacción con el desarrollo normal del cerebro y mecanismos de plasticidad neuronal y probablemente otros múltiples factores genéticos y no genéticos. Diferentes fenotipos finales son posibles y los factores específicos que dictan la expresión variable teóricamente de casos con la misma carga genética son desconocidos y pueden ser variante-específicos. Estos fenotipos resultantes pueden incluir la esquizofrenia clínicamente diagnosticable, otros desórdenes psiquiátricos, otras condiciones, incluyendo desórdenes del desarrollo, o expresión no detectable. Por ejemplo la deleción 22q11 (variante estructural amarilla) puede expresarse tanto en esquizofrenia, como en desórdenes psiquiátricos relacionados o en otros desórdenes del desarrollo (estrellas amarillas) (modificada de Costain et al 2012).

Aunque los hallazgos recientes de mutaciones en esquizofrenia son fortuitos, la disponibilidad de metodologías de secuenciación de todo el genoma ayudará a

sistematizar y descifrar con detalle los mecanismos genéticos que determinan el desarrollo de esquizofrenia (Toyosima M et al. 2010).

El estudio bioquímico y molecular de los factores genéticos de los trastornos psiquiátricos ayudará a diseñar nuevos blancos terapéuticos más efectivos y seguros para el tratamiento de estas entidades, especialmente de la esquizofrenia, cuya terapéutica solo ha sido eficaz para tratar los síntomas positivos de la enfermedad, sin embargo nuevas vías de señalización y modelos animales están revolucionando esta área de estudio y están logrando avances importantes en el tratamiento de los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (Karam CS et al 2010).

8. Conclusiones

La metodología de PCR-TR empleada en esta tesis permitió determinar una prevalencia de deleción 22q11.2 de 2.91% en pacientes Mestizo Mexicanos con esquizofrenia, sin embargo se encontraron cuatro casos que presentaron deleción de solo uno de los genes estudiados en este protocolo, *ZNF74*, lo que aumenta la prevalencia incluyendo las deleciones de menor tamaño a 6.8%.

Los resultados mostraron correlación genotipo-fenotipo en aquellos casos positivos para deleción mayor a siete genes de la región 22q11.2, concordantes con el síndrome de deleción 22q11.2. Dos de estos casos, no habían sido diagnosticados previamente y en el tercero se confirmó la sospecha clínica del síndrome.

La presentación fenotípica de la ESQ, TE y TB es extremadamente heterogénea, y sus síntomas comprometen todo un espectro psicopatológico con una alta variación interindividual. En este trabajo identificamos un caso de TB con deleción de *ZNF74*.

En la muestra estudiada, ningún paciente con diagnóstico de trastorno esquizoafectivo mostró deleción de algún gen en la región analizada.

Las CNV más penetrantes como la región cromosómica estudiada (22q11.2) tienen implicaciones clínicas directas y apoyan una subclasificación diagnóstica de estos trastornos psiquiátricos.

Este trabajo abre un nuevo campo para la búsqueda de otras CNV relacionadas con las manifestaciones fenotípicas del padecimiento y para establecer nuevos parámetros de respuesta a los agentes antipsicóticos.

9. Perspectivas

En los casos negativos para delección de la región 22q11.2, será necesario analizar otros *loci* para CNV asociados con esquizofrenia (cromosomas 15 y 16, por ejemplo).

En los casos positivos para la delección de 22q11.2 con antecedentes heredo-familiares, resultaría interesante hacer el estudio de los progenitores y de los familiares en riesgo para determinar si es una delección heredada o *de novo*. Si es heredada, dar asesoramiento genético y riesgos de recurrencia a los familiares.

En la actualidad no existen marcadores o pruebas específicas que confirmen el diagnóstico de estos trastornos psiquiátricos. En un futuro próximo, sería necesario realizar la subclasificación de pacientes con ESQ, TB y TE de acuerdo a resultados conjuntos de estudios genéticos, neuroquímicos, de imagenología (estructurales y funcionales), pruebas electrofisiológicas y otros métodos para identificar características endofenotípicas que apoyen en el diagnóstico de estas entidades. Del mismo modo estas pruebas permitirían validar nuevos blancos terapéuticos y de esta manera, a largo plazo, tener terapias individualizadas que mejoren la calidad de vida de estos pacientes.

10. Bibliografia

- Allen N, Bagade S, McQueen M, *et al.* Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia. The SzGene database. *Nat Genet.* 2008; 40:827–834.
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, *et al.* Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 2008; 40: 827.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350–355.
- Arguello PA, Gogos JA. Modeling madness in mice: one piece at a time. *Neuron* 2006; 52: 179–196.
- Arinami T, Ohtsuki T, Takase K, *et al.* Screening for 22q11 deletions in a schizophrenia population. *Schizophr Res.* 2001 1; 52 (3):167-170.
- Badner J, Gershon E. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002; 7:405– 411
- Bassett AS, Chow EWC, O'Neill S, *et al.* Genetic insights into the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2001; 27:417 430.
- Bassett AS, Chow EWC, Weksberg R. Chromosomal abnormalities and schizophrenia. *Am J Med Genet Semin Med Genet.* 2000; 97:45–51.
- Bassett AS, Chow EWC. 22q11 deletion syndrome: a genetic subtype of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1999; 46: 882–891.
- Bassett AS, Scherer SW, Brzustowicz LM. Copy number variations in schizophrenia: critical review and new perspectives on concepts of genetics and disease, *Am J Psychiatry,* 2010; 167(8): 899-914
- Baumer A, Riegel M, Schinzel A. Non-random asynchronous replication at 22q11.2 favours unequal meiotic crossovers leading to the human 22q11.2 deletion. *J Med Genet* 2004; 41:413–420.
- Bittel DC, Yu S, Newkirk H, *et al.* Refining the 22q11.2 deletion breakpoints in DiGeorge syndrome by a CGH. *Cytogenet Genome Res* 2009; 124(2): 113-120.

- Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature Genet* 2008; 40: 695–701.
- Bornemann KD, Brewer JW, Perez E. Secretion of soluble pre-B cell receptors by pre-B cells. *J Immunol.* 1997; 15: 2551-7.
- Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, et al. A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. *Am J Hum Genet.* 2003; 73:152–161.
- Bucan M, Abrahams BS, Wang K, et al. Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. *PLoS Genet.* 2009; 5: e1000536.
- Buchanan RW, Javitt DC, Marder SR et al. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. *Am J Psychiatry.* 2007; 164:1593–1602.
- Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B et al. Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophr Res,* 2007; 97 (1-3): 51-59.
- Campbell LE, Daly E, Toal F, et al. Brain and behaviour in children with 22q11.2 deletion syndrome: a volumetric and voxel-based morphometry MRI study. *Brain.* 2006; 129: 1218–1228.
- Caraveo A, Medina M. Trastornos emocionales en población urbana adulta mexicana: resultados de un estudio nacional. *Salud Mental.* 1996; 19: 40-45.
- Cardno AG, 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): 12-17.
- Carlsson A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 1988; 1:179–186.
- Chiang P W, Song W J, Wu K Y, et al. Copy number and transcriptional abundance. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence. *Genome Res.* 1996 6: 1013-1026.

- Chowdari KV, Mirnics K, Semwal P, et al. Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. Hum Mol Genet 2002;11:1373–80.
- Christofolini DM, Bellucco FT, Ota VK. Assessment of 22q11.2 copy number variations in a sample of Brazilian schizophrenia patients. Schizophr Res 2011; 132 (1): 99-100.
- Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, et al. The DISC locus in psychiatric illness. Mol psychiatry. 2008; 13:36–64.
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, et al. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:13675–13680.
- Cook EH Jr, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. Nature. 2008; 455:919–923.
- Costain G, Bassett AS. Clinical applications of schizophrenia genetics: genetic diagnosis, risk and counseling in the molecular era. Appl Clin Genet 2012 20; 5: 1-18.
- Costain G, Chow EW, Silversides CK, et al. Sex differences in reproductive fitness contribute to preferential maternal transmission of 22q11.2 deletions. J Med Genet. 2011;48(12):819–824.
- Craddock N, O’donovan MC, Owen MJ. Genes for schizophrenia and bipolar disorder? Implications for psychiatric nosology, Schizophr Bull, 2006; 32(1): 9-16.
- Craddock N, O’donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. J Med Genet, 2005; 42 (3): 193-204.
- Craddock N, Owen MJ. The beginning of the end for the Kraepelinian dichotomy. Br J Psychiatry. 2005; 186: 364–366.
- De Lisi L. A critical overview of recent investigations into the genetics of schizophrenia. Curr Opin Psychiatry. 1999; 12: 119-129.
- Donald SP, Sun XY, Hu CA, et al. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. Cancer research. 2001; 61:1810–1815.

- Eaton W. Residence, social class, and schizophrenia. J Health Soc Behav. 1974; 15: 289-299.
- Edelman L, Pandita RK, Morrow BE. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. Am J Hum Genet 1999; 64:1076–1086.
- Edelman L, Pandita RK, Spiteri E, et al. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. Hum Mol Genet 1999;8:1157-1167.
- el-Husseini, Ael D, Brecht, DS. Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. Nature reviews. 2002; 3:791–802.
- Emanuel BS. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements, Dev Disabil Res Rev, 2008; 14(1): 11-18.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, et al. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. Am J Hum Genet 2003; 73:1027–1040.
- Estivill X, Armengol L. Copy-number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. PLoS Genet. 3, 1787–1799.
- Feinstein C, Eliez S, Blasey C, et al. Psychiatric disorders and behavioral problems in children with velocardiofacial syndrome: usefulness as phenotypic indicators of schizophrenia risk. Biol. Psychiatry 2002; 51: 312–318.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. Nat Rev Genet 2006;7:85–97.
- Ford JM, Mathalon DH, Whitfield S, et al. Reduced communication between frontal and temporal lobes during talking in schizophrenia. Biol Psychiatry. 2002; 51: 485–492.
- Franco JG, Valero J, Labad-Alquézar A. Anomalías físicas menores y características clínicas en pacientes con trastornos del espectro de la esquizofrenia. Rev Neurol. 2012; 54: 468-474.

- Frenk Mora J, Ruelas Barajas E, Tapia Conyer R, et al. Programa específico de esquizofrenia 2001-2006, Primera edición, 2002 1-98.
- García-Miñaur S, Fantes J, Murray RS, et al. A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. J Med Genet 2002; 39: e62.
- Gejman PV, Sanders AR, Duan J. The role of genetics in the etiology of schizophrenia, Psychiatr Clin North Am, 2010; 33(1): 35-66.
- Gilman SR, Chang J, Xu B, et al. Diverse types of genetic variation converge on functional gene networks involved in schizophrenia. Nat Neurosci 2012; 15(12): 1723-1728.
- Gogos JA, Santha M, Takacs Z, et al. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. Nature genetics. 1999; 21:434–439.
- Gogos JA, Santha M, Takacs Z, et al. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. Nature Genet. 1999; 21: 434–439.
- Gothelf D, Schaer M, Eliez S. Genes, brain development and psychiatric phenotypes in velo-cardio-facial syndrome, Dev Disabil Res Rev, 2008; 14: 59-68.
- Greenwood CMT, Husted J, Bomba MD, et al. Elevated rates of schizophrenia in a familial sample with mental illness and intellectual disability. J Intellect Disabil Res. 2004; 48:531–539.
- Grondin B, Bazinet M, Aubry M et al. The KRAB zinc finger gene ZNF74 encodes an RNA binding protein tightly associated with the nuclear matrix. J Biol Chem 1996 28; 271(26):15458-67.
- Grondin B, Côté F, Bazinet M, et al. Direct Interaction of the KRAB/Cys2-His2 Zinc Finger Protein ZNF74 with a Hyperphosphorylated Form of the RNA Polymerase II Largest Subunit. J Biol Chem.1997; 272: 27877-85.
- Halder A, Jain M, Kabra M, et al. Mosaic 22q11.2 microdeletion síndrome: diagnosis clinical manifestations of two cases. Mol Cytogenet. 2008; 1: 18.
- Hatzimanolis A, Mc Grath JA, Wang R, et al. Multiple variants aggregate in the neuregulin signaling pathway in a subset of schizophrenia patients. Transl Psychiatry, 2013 28;3:e264.

- Henrichsen CN, Vinckenbosch N, Zöllner S, et al. Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes. Nat Genet, 2009; 41 (4): 424-429.
- Hoogendoorn ML, Vorstman JA, Jalali GR, et al. Prevalence of 22q11.2 deletions in 311 Dutch patients with schizophrenia. Schizophr Res 2008; 98 (1-3): 84-88.
- Hornstein E, Shomron N. Canalization of development by microRNAs. Nature Genet 2006; 38: S20–S24.
- Horowitz A, Shifman S, Ravlin N, et al. A survey of the 22q11 microdeletion in a large cohort of schizophrenia patients. Schizophr Res 2005 1; 73 (2-3): 263-267.
- Huotari M, Gogos JA, Kariyorgou M, et al. Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice. Eur J Neurosci 2002; 15: 246–256.
- Hurles, ME, Dermitzakis ET, Tyler-Smith CI. The functional impact of structural variation in humans. Trends Genet. 2008; 24: 238–245
- Ingraham LJ, Kety SS. Adoption studies of schizophrenia. Am J Med Genet 2000; 97: 18.
- Ivanov D, Kirov G, Norton N, et al. Chromosome 22q11 deletion, velo-cardio-facial syndrome and early-onset psychosis. Molecular genetic study. Br J Psychiatry 2003; 183:409-413.
- Jacquet H, Berthelot J, Bonnemains C, et al. The severe form of type I hyperprolinaemia results from homozygous inactivation of the *PRODH* gene. J Med Genet 2003; 40: e7.
- Jacquet H, Demily C, Houy E, et al. Hyperprolinemia is a risk factor for schizoaffective disorder. Mol Psychiatry 2005; 10: 479–485.
- Johnson MH, Halit H, Grice SJ, et al. Neuroimaging of typical and atypical development: a perspective from multiple levels of analysis. Dev Psychopathol 2002; 14: 521–536.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, et al. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. Nat Cell Biol. 2005; 7:1167–1178.

- Karam CS, Ballon JS, Bivens NM, et al. Signaling pathways in schizophrenia: emerginf targets and therapeutic strategies. Trends Pharmacol Sci. 2010; 31 (8): 381-390.
- Karayiorgou M, Gogos JA. The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia. Brain research. 2004; 132: 95–104.
- Karayiorgou M, Morris MA Morrow B, et al. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92: 7612–7616.
- Karayiorgou M, Simon TJ, Gogos JA. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia, Nat Rev Neurosci, 2010; 11(6): 402-416.
- Kasanin J. The acute schizoaffective psychoses, Am J Psychiatry 1933; 90: 97.
- Kasprzyk A, Secker-Walker LM. Increased sensitivity of minimal residual disease detection by interphase FISH in acute lymphoblastic leukemia with hyperdiploidy. Leukemia. 1997; 11 (3):429-35.
- Keller MC, Miller G. Resolving the paradox of common, harmful, heritable mental disorders: wich evolutionary genetic model work best? Behav Brain Sci 2006; 29:385.
- Kosik KS. The neuronal microRNA system. Nature Rev Neurosci. 2006; 7: 911–920.
- Kringlen E, Cramer G. Offspring of monozygotic twins discordant for schizophrenia, Arch Gen Psychiatry, 1989; 46 (10): 873-877.
- Kurahashi H, Akagi K, Inazawa J, et al. Isolation and characterization of a novel gene deleted in DiGeorge syndrome. Hum Mol Genet. 1995; 4: 541-549.
- Kvajo M, McKellar H, Gogos JA. Molecules, signaling, and schizophrenia. Curr. Top. Behav. Neurosci. 2010; 4:629–656.
- Leana-Cox J, Pangkanon S, Eanet KR, et al. Familial DiGeorge/velocardiofacial syndrome with deletions of chromosome area 22q11: report of five families with a review of the literature. Am J Med Genet 1996; 65:309–316.

- Li T, Ma X, Sham PC et al. Evidence for association between novel polymorphisms in the PRODH gene and schizophrenia in a Chinese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2004; 129B:13–15.
- Lindsay EA, Shaffer LG, Carrozzo R, et al. De novo tandem duplication of chromosome segment 22q11-q12: clinical, cytogenetic, and molecular characterization. Am J Med Genet 1995; 56:296–299.
- Liu H, et al. Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002; 99:3717–3722
- Llevadot R, Scambler P, Estivill X, et al. Genomic organization of TUPLE1/HIRA: a gene implicated in Di George syndrome. Mamm Genome. 1996; 7: 911-914.
- Lupski JR. Genome structural variation and sporadic disease traits. Nat Genet. 2006; 38: 974–976.
- Malaspina D, Harlap S, Fenning S, et al. Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 2001; 58: 361.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorders. Am J Hum Genet. 2008; 82:477-488.
- Marshall M, Rathbone J. Early intervention for psychosis. Schizophr Bull, 2011; 37 (6): 1111-1114.
- Matsuoka R, Kimura M, Scambler PJ, et al. Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. Hum Genet 1998; 103:70–80.
- Maynard TM, et al. A comprehensive analysis of 22q11 gene expression in the developing and adult brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 24: 14433–14438.
- McCarroll SA, Kuruville FG, Korn JM, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy-number variation. Nat Genet. 2008; 40: 1166–1174.

- McDonald-McGinn DM, LaRossa D, et al. The 22q11.2 deletion: screening for deletion, diagnostic workup, and outcome of results. Report on 181 patients. Genet Test 1997; 1:99–108.
- McDonald-McGinn DM, Tonnesen ML, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net. Genet Med 2001; 3:23–29.
- McDonald-McGinn DM, Zackai E. Genetic counseling for the 22q11.2 deletion, Dev Disabil Res Rev, 2008; 14(1):69-74.
- Medina M. La epidemiología de la salud mental en México. Conadic Informa. Boletín especial. 2001 México. Secretaría de Salud.
- Merikangas AK, Corvin AP, Gallagher L. Copy-number variants in neurodevelopmental disorders: promises and challenges. Trends Genet. 2009; 25: 536-544.
- Meyer-Lindenberg AS, Olsen RK, Kohn PD, et al. Regionally specific disturbance of dorsolateral prefrontal-hippocampal functional connectivity in schizophrenia. Arch. Gen Psychiatry. 2005; 62: 379–386.
- Michaelovsky E, Frisch A. Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome. BMC Med Genet. 2012; 13: 1-11
- Mill J, Tang T, Kaminsky Z, et al. Epigenomic profiling reveals DNA- methylation changes associated with major psychosis. Am J Hum Genet 2008; 82 (3) 696-711.
- Mukai J, Dhillia A, Drew LJ et al. Palmitoylation-dependent neurodevelopmental deficits in a mouse model of 22q11 microdeletion. Nature neuroscience. 2008; 11:1302–1310.
- Mukai J, Liu H, Burt RA, et al. Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. Nature genetics. 2004; 36:725–731.
- Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. Arch Gen Psychiatry. 1999; 56: 940–945.

- Nakata K, Lipska BK, Hyde TM, et al. DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106:15873–15878.
- Norton N, Moskvina V, Morris DW, Bray NJ, et al. Evidence that interaction between neuregulin 1 and its receptor erbB4 increases susceptibility to schizophrenia. Am J Med Genet B 2006; 141B: 96–101
- Park TJ, Curran T. Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the Reelin pathway. J Neurosci. 2008; 28: 13551–13562.
- Paterlini M, Zakharenko SS, Lai WS, et al. Transcriptional and behavioral interaction between 22q11.2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice. Nature neuroscience. 2005; 8:1586–1594.
- Paterlini M, Zakharenko SS, Lai WS, et al. Transcriptional and behavioral interaction between 22q11.2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice. Nature Neurosci 2005; 8: 1586 1594.
- Petronis A. The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis and resolving synthesis. Biol Psychiatry 2004; 55 (10): 965-970.
- Pickard B. Progress in defining the biological causes of schizophrenia. Expert Rev. Mol. Med. 2011; 13:e25
- Pinto D, Marshall C, Feuk L, et al. Copy-number variation in control population cohorts. Hum Mol Genet.2007; 15;16 Spec No. 2:R168-73.
- Rao SG, Williams GV, Goldman-Rakic PS. Destruction and creation of spatial tuning by disinhibition: GABA(A) blockade of prefrontal cortical neurons engaged by working memory. J Neurosci. 2000; 20:485–494.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. Mol Psychiatry. 2005;10(5):434–449.
- Raux G, Bumsel E, Hecketsweiler B, et al. Involvement of hyperprolinemia in cognitive and psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome. Hum Mol Genet 2007; 16: 83–91.

- Ravassard P, Côté F, Grondin B, et al. ZNF74, a gene deleted in DiGeorge syndrome, is expressed in human neural crest-derived tissues and foregut endoderm epithelia. Genomics. 1999; 15: 82-85.
- Robin NH, Shprintzen RJ. Defining the clinical spectrum of deletion. 22q11.2. J. Pediatr 2005; 147: 90–96.
- Roth TL, Lubin FD, Sodhi M, et al. Epigenetic mechanisms in schizophrenia, Biochim Biophys Acta. 2009 1790 (9): 869-877.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. J Med Genet 1997; 34:798–804.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. J. Med. Genet 1997; 34: 798–804.
- Saitta SC, Harris SE, Gaeth AP, et al. Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. Hum Mol Genet 2004; 13:417–428.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002; 15: e57.
- Scutt L, Chow EWC, Weksberg R, et al. Patterns of dysmorphic features in schizophrenia. Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet. 2001; 105: 713–723.
- Sebat, J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy-number polymorphism in the human genome. Science. 2004; 305: 525–528.
- Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. Annu Rev Genet 2000;34:297–329.
- Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. Genet Med 2001;3:6–13.

- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. Hum Mol Genet 2000; 9:489–501.
- Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. American journal of human genetics. 2002; 71:1296–1302.
- Sigurdsson T, Stark KL, Karayiorgou M, et al. Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. Nature. 2010 464:763–767.
- Singer W. Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? Neuron 1999; 24: 49–65.
- Sperandio MP, Borsani G, Incerti B et al. The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. Genomics. 1998; 15: 230-236.
- Sporns O, Tononi G, Kötter R. The human Connectome: A structural description of the human brain. PLoS Comput Biol, 2005; 1 (4): e42.
- St Clair D, Blackwood D, Muir W, et al. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. Lancet. 1990; 336:13–16.
- Stark KL, Xu B, Bagchi A, et al. Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. Nature Genet 2008; 40: 751–760.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. Am J Hum Genet 2002; 71: 877–892.
- Steinpreis RE. The behavioral and neurochemical effects of phencyclidine in humans and animals: some implications for modeling psychosis. Behav Brain Res. 1996; 74:45–55.
- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes, Science, 2007, 9; 315 (5813): 848-853.

- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. Science 2007; 315: 848-853.
- Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, et al. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. Am J Hum Genet. 2002;71(2):337–348.
- Su Q, Mochida S, Tian JH, et al. SNAP-29: a general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 14038–14043.
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, et al. Autism Genome Project Consortium. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. Nat Genet. 2007; 39:319–328.
- Szentpetery Z, Szakacs G, Bojjireddy N et al. Genetic and functional studies of phosphatidylinositol 4-kinase type III α . Biochim Biophys Acta. 2011; 1811: 476-483.
- Taddei I, Morishima M, Huynh T, et al. Genetic factors are major determinants of phenotypic variability in a mouse model of the DiGeorge/del22q11 syndromes. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 11428–11431.
- Takase K, Ohtsuki T, Migita O, et al. Association of ZNF74 gene genotypes with age-at-onset of schizophrenia. Schizophr Res 2001 1; 52(3): 161-165.
- Tam GW, Rendon R, Carter NP, et al. The role of DNA copy number variation in schizophrenia, Biol Psychiatry, 2009; 66 (11): 1005-1012.
- Taylor MA. Are schizophrenia and affective disorder related? A selective literature review. Am J Psychiatry. 1992; 149: 22–32.
- Toyosima M, Maekawa M, Toyota T. et al Schizophrenia with the 22q11.2 deletion and additional genetic defects: case history, Br J Psychiatry, 2011; 199: 245-246.
- Tsuang M, Williams S, Faraone S. Toward reformulating the diagnosis of schizophrenia. Am J psychiatry. 2000; 157: 1041-1050.

- Urban AE, Korbelt JO, Selzer R, et al. High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 4534–4539.
- Van de Kerkhof NW, Feenstra I, Van der Heijden FM, et al. Copy number variants in simple of patients with psychotic disorders: is standard screening relevant for actual clinical practice?, Neuropsychiatr Dis Treat, 2012; 8:295-300.
- Van Den Bossche MJ, Johnstone M, Strazisar M, et al. Rare copy number variants in neuropsychiatric disorders: Specific phenotype or not?, Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2012; 159B(7):812-822.
- Vassos E, Collier DA, Holden S, et al. Penetrance of copy number variants associated with schizophrenia. Hum Mol Genet 2010. 1; 19 (17): 3477-3481.
- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. Science. 2008; 320(5875):539–543.
- Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 1987; 44: 660–669.
- WHO. The ICD10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Diagnostic criteria for research. Geneva, World Health Organization; 1993.
- Wiehahn GJ, Bosch GP, du Preez RR, et al. Assessment of the frequency of the 22q11 deletion in Afrikaner schizophrenic patients. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2004 15; 129B (1): 20-2.
- Wilson GM, Flibotte S, Chopra V, et al. DNA copy-number analysis in bipolar disorder and schizophrenia reveals aberrations in genes involved in glutamate signaling. Hum Mol Genet. 2006; 15: 743-749.
- Xu B, Ionita-Laza I, Roos JL, et al. De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia. Nat Genet 2012; 44(12):1365-1369.
- Xu B, Roos JL, Levy S, et al. Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. Nature Genet. 2008; 40: 880–885.

- Zhang D, Cheng L, Qian Y, et al. Singleton deletions throughout the genome increase risk of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2009; 14(4): 376-380.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, et al. Copy number variation in human health, disease and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009; 10:451-81.

RECURSOS ELECTRÓNICOS:

Gene, OMIM, PUBMED en NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

Ensemble. www.ensembl.org/

GWAS esquizofrenia. <http://www.schizophreniaforum.org/>

Anexo 1

Carta de consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
"MANUEL VELASCO SUÁREZ"

Departamento de Neurogenética y Biología Molecular

Consentimiento informado para participar en investigación
sobre Genética de la esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo
y trastorno bipolar.

Me han informado que:

Yo: _____ //

Mi familiar (parentesco): _____ ()

padezco/padece: (marque una de las siguientes)

- Esquizofrenia
 Trastorno bipolar
 Trastorno esquizoafectivo

Que es una enfermedad psiquiátrica crónica que puede presentar reactividad emocional alterada y conducta desorganizada con resultados variables al tratamiento y remisión parcial. Actualmente no se conocen los mecanismos que determinan la aparición de estas enfermedades. Hay evidencia de factores hereditarios que pueden contribuir al desarrollo de las mismas.

El objetivo de este estudio es determinar la presencia o ausencia de una pérdida de información genética (deleción) en el cromosoma 22, con la finalidad de contar con un modelo de estudio que aporte información que nos permita identificar factores de riesgo o susceptibilidad, y factores que puedan ser determinantes en la aparición de estas enfermedades psiquiátricas.

PROCEDIMIENTOS A REALIZARSE

Será enviado por el servicio de psiquiatría a solicitar una cita en la consulta del servicio de Genética. Se le realizará una historia clínica completa que incluye la elaboración de un árbol genealógico, lo cual permitirá identificar casos familiares y de acuerdo a los resultados obtenidos, identificar a otros familiares en riesgo de presentar la deleción.

Se tomará una muestra de sangre periférica, de la cual se extraerá el ADN (material genético) y se estudiará la región q11 del cromosoma 22.

Se dará una nueva cita en consulta externa de Genética para asesoramiento genético de acuerdo a los resultados obtenidos.

EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS

La punción para obtener la sangre periférica puede causar dolor leve. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local. Los riesgos se reducen al emplear personal altamente calificado para la toma de muestras.

BENEFICIOS PARA LAS PERSONAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

Su participación en este estudio permitirá identificar o descartar la presencia de una pérdida de material genético (deleción) en el cromosoma 22, que se ha identificado como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de estas enfermedades psiquiátricas. De resultar positivo para la deleción se le completará el abordaje integral, a través del sistema de referencia y contrarreferencia de pacientes.

CONFIDENCIALIDAD

Los resultados de este estudio serán confidenciales y cuando se publiquen, no se podrán identificar a los participantes.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

El estudio de su muestra no tendrá costo para usted.

ACLARACIONES

Si usted considera que los puntos antes mencionados, no le quedan claros o le surgen nuevas dudas, puede dirigirse directamente con los responsables de este estudio: Dra. Elisa Alonso V. y Dra. Paola Medina L. al Tel.: (55) 56-06-38-22 exts 2022 y 2018 respectivamente.

OTROS ESTUDIOS

Estoy de acuerdo en que mi ADN puede ser usado para otras investigaciones que se realizan en este Instituto.

ESTOY DE ACUERDO _____

NO ESTOY DE ACUERDO _____

He sido informado que mi **participación** en este estudio es **voluntaria**, si no deseo participar, no se verá afectada mi atención en el Instituto.

FIRMA del PACIENTE y/o FAMILIAR _____

Nombre y firma del representante legal _____

Teléfono casa (_____) _____ otro: _____

Nombre y Firma Testigo1 _____

Nombre y Firma Testigo 2 _____

Nombre y firma de quien obtuvo el consentimiento _____



Departamento de Genética y Biología Molecular
 Protocolo Delección 22q11

Paciente:

Registro: _____ Fecha: _____
 Sexo: M F Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____
 Consanguinidad: _____ Coloridad: _____ Lugar de
 Nacimiento: _____ de Residencia: _____
 Tel: _____ Familiar: _____

Diagnóstico: Esquizofrenia ___ Trx Esquizoafectivo ___ Trx Bipolar ___ Tipo _____

Síntomas positivos: _____

Síntomas Negativos

Edad de inicio: _____ Personalidad Premórbida: _____

Tratamiento: _____

Años de Tratamiento: _____ Respuesta a tratamiento: _____

de Muestra (ADN) _____ Caso Familiar: NO / SI # Familia _____

Características clínicas	Presente	Ausente	Característica	Presente	Ausente
Microcefalia			Oftalmopatía (específ)		
Facies alargada			Talla baja		
Retrognatía			Manos y dedos largos		
Asimetría facial estruct o funcio			Cardiopatía		
PH o PHS / voz nasal			Hipoacusia condu/ NS		
Puente nasal prominente			Pabellones displasicos		
Nariz bulbosa o bifida			Hipotonía generalizada		
Hipoplasia esmalte			Ataxia cerebelar		
Agnesia o hipoplasia dental			Manos y pies pequeños		
Comisura bucal hacia abajo			ARJ		
Hipoplasia malar			Otros		

Otros diagnósticos: NO / SI: _____

Estudio Neuropsicológico (Fecha): _____

IQ: _____

Neuroimagen: _____

Quistes periventriculares		
Vermix cerebelar pequeño		
Disgenesia/hipoplasia cerebelar		
Objetos no identif en sust blanca		
Strokes		
Espina bífida/mielomeningocele		
Cisura silviana grande		

Observaciones: _____
