



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS DEL GEN *PRODH* EN
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ESQUIZOFRENIA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**PRESENTA
MÓNICA ITZEL MARTÍNEZ FRANCO**



MÉXICO, D.F.

2015



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: Marisol López López

VOCAL: Profesor: Samuel Canizales Quinteros

SECRETARIO: Profesora: Nancy Monroy Jaramillo

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

2do. SUPLENTE: Profesora: Martha Patricia Coello Coutiño

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Nancy Monroy Jaramillo

SUSTENTANTE:

Mónica Itzel Martínez Franco

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Criterios diagnósticos	4
1.3 Características clínicas	5
1.3.1 Síntomas cognitivos	5
1.4 Inhibición del prepulso	6
1.5 Escalas psiquiátricas	8
1.5.1 Escala de síndromes positivos y negativos	8
1.5.2 Escala breve de apreciación psiquiátrica	9
1.5.3 Mini examen del estado mental (MMS)	10
1.6 Etiología y factores de riesgo	11
1.6.1 Hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia	12
1.6.2 Hipótesis dopaminérgica	12
1.6.3 Hipótesis glutamatérgica	13
1.7 Asociación de la esquizofrenia y la epilepsia	15
1.8 La esquizofrenia como un complejo desorden genético	16
1.9 Síndrome de delección 22q11.2	17
1.10 <i>COMT</i>	18
1.11 <i>PRODH</i>	18
1.11.1 Localización.	19
1.11.2 Función de la prolina oxidasa.	19
1.11.3 Función biológica de la prolina.	20
1.11.4 Errores del metabolismo de la prolina.	21
1.11.4.1 Hiperprolinemia tipo I.	21

1.11.4.2 Hiperprolinemia tipo II	22
1.11.5 Polimorfismos de un solo nucleótido de <i>PRODH</i> y sus haplotipos	22
1.11.6 Interacción entre <i>PRODH</i> y <i>COMT</i>	25
2. Planteamiento del problema	26
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	26
5. Sujetos y métodos	27
6. Resultados	36
7. Discusión	57
8. Conclusión	65
9. Perspectivas	66
10. Recursos bibliográficos	68
Anexo I	74
Anexo II	75
Anexo III	76
Anexo IV	78
Anexo V	81
Anexo VI	83

Resumen.

Introducción.

La esquizofrenia es un trastorno cerebral crónico, severo y discapacitante, que se define por delirios, alucinaciones, comportamiento desorganizado y dificultades cognitivas. Ocurre aproximadamente en el 1% de la población mundial y aparece por primera vez en la edad adulta temprana. Debido a que los portadores de la delección hemicigota en 22q11.2, presentan 30% de riesgo de desarrollar esquizofrenia, los genes ubicados en 22q11.2 son candidatos posicionales para la susceptibilidad a dicha patología. Entre ellos se encuentra el gen de la prolina deshidrogenasa (*PRODH*), la cual cataliza el primer paso de la degradación de la prolina, que posteriormente se convierte en glutamato. Éste aminoácido parece estar desregulado en la esquizofrenia. En el gen *PRODH* se han reportado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que afectan la actividad de la proteína en diferentes niveles. Uno de estos niveles es la disminución de la actividad enzimática. Esta reducción ocasiona hiperprolinemia, la cual se ha asociado con la disminución del IQ, el deterioro cognitivo y la esquizofrenia. En el presente trabajo se pretende analizar quince SNP de *PRODH* en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia y formar haplotipos.

Sujetos y métodos.

Previo consentimiento informado, 101 muestras de controles sanos mestizo mexicanos se parearon por género y edad con 101 muestras de pacientes con esquizofrenia. Las muestras fueron analizadas mediante PCR-RFLP y secuenciación directa para los quince SNP. Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg con X^2 y se usó el programa Haploview v.4.2. para construir los haplotipos.

Resultados.

En la población estudiada, el alelo G de la variante rs16983466 presentó asociación como alelo de riesgo para el desarrollo de la esquizofrenia.

Con los quince SNP analizados se encontraron cuatro haplotipos asociados con esquizofrenia. El diplotipo de protección GA está conformado por rs372055/rs16983466. El triplotipo de protección GTG está construido a partir de rs372055/rs450046/rs385440. Con las variantes rs2238731/rs16983466, se obtuvo un diplotipo de protección CA y otro de riesgo CG. Tres portadores del haplotipo de protección CA poseen puntajes de la escala breve de evaluación psiquiátrica (BPRS) normales, después del tratamiento farmacológico. En cambio, tres portadores del haplotipo de riesgo, presentaron puntajes entre 15 a 30, lo que implica que poseían una intensidad leve de la severidad de los síntomas durante la entrevista.

Por último, se identificaron tres pacientes con diferentes mutaciones en *PRODH*.

Conclusiones.

El espectro clínico esquizo-afectivo es un conjunto de desórdenes multifactoriales, donde una sola mutación no explica el fenotipo observado en los pacientes psiquiátricos. En cambio, el análisis de haplotipos permitió agrupar a los pacientes en portadores del diplotipo de riesgo CG y/o de protección AG y compararlos a través de la escala psiquiátrica BPRS.

1. Introducción.

1.1 Generalidades.

Inicialmente la esquizofrenia fue denominada “demencia precoz” por Emil Kraepelin en 1919, para distinguirla de otros tipos de demencia. Sin embargo, Eugene Bleuler en 1950 la denominó “esquizofrenia” (schiz=división; phren=mente), pues consideró que lo más característico era la escisión de la conciencia (Weinberger *et al.*, 2011).

Actualmente se considera a la esquizofrenia un trastorno del neurodesarrollo con alta heredabilidad, que surge de una interacción compleja de factores genéticos y ambientales. Se define por delirios, alucinaciones, comportamiento desorganizado y dificultades cognitivas, tales como la pérdida de la memoria (Tost *et al.*, 2010). Esta enfermedad conlleva a distorsiones profundas en el pensamiento y el lenguaje, que afectan a la percepción y el sentido de sí mismo (OMS, consultado el 13 de julio del 2015). La esquizofrenia destaca entre los trastornos mentales, como una de las condiciones más severas e incapacitantes que afectan alrededor del 1% de la población mundial (Tost *et al.*, 2010). Esta patología representa del 40-50% de las hospitalizaciones psiquiátricas y afecta en la misma proporción a hombres y mujeres, sin embargo, se observan diferencias respecto a la edad de inicio y su curso (Apiquian-Guitart *et al.*, 2014).

La esquizofrenia generalmente comienza en la adolescencia tardía o en la etapa adulta temprana, entre las edades de 15 y 25 años. El género masculino tiende a manifestar los síntomas poco antes que el género femenino. La edad promedio de inicio es de 18 años en hombres y 25 en mujeres. El inicio de la esquizofrenia es bastante raro en menores de 10 años de edad o más de 40 años. (<http://www.schizophrenia.com/szfacts.htm>, consultado el 13 de julio del 2015).

Las personas esquizofrénicas presentan de dos o tres veces mayores tasas de mortalidad por accidentes y causas naturales que la población en general, lo que corresponde a una reducción de 10 a 25 años de la esperanza de vida (Laursen *et al.* 2012). Diferentes estudios ponen de manifiesto que más del

80% de todos estos pacientes tienen otras enfermedades médicas concurrentes (Apiquian-Guitart *et al.*, 2014), como obesidad y enfermedades cardiovasculares (Laursen *et al.* 2012). Así mismo, más del 50% de estas patologías no están diagnosticadas. El suicidio es una causa de muerte frecuente en estos pacientes. Un 50% de los pacientes intentan suicidarse por lo menos una vez en su vida y de un 10 a un 15% de estas personas mueren por esta causa en períodos de seguimiento a 20 años (Apiquian-Guitart *et al.*, 2014).

1.2 Criterios diagnósticos.

El manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM) de la Asociación Estadounidense de Psiquiatría (del inglés *American Psychiatric Association* o APA), contiene una clasificación de los trastornos mentales y proporciona descripciones con fundamento empírico sólido de las categorías diagnósticas, con el fin de que los clínicos y los investigadores de las ciencias de la salud puedan diagnosticar, estudiar, intercambiar información y tratar los distintos trastornos mentales. La edición vigente es la quinta, DSM-5, publicada en el 2013 (Tandon *et al.*, 2013).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de la Clasificación Internacional de Enfermedades décima versión (CIE-10), la cual es la herramienta de diagnóstico estándar para la epidemiología, la gestión de la salud y fines clínicos, cuyo uso está generalizado en todo el mundo (OMS, consultado el 13 de julio del 2015).

El diagnóstico de acuerdo con los criterios del DSM-V, se basa en la aparición concomitante de al menos dos de los siguientes síntomas dentro de un período de 6 meses: delirios, alucinaciones, lenguaje desorganizado, comportamiento catatónico, síntomas negativos (la disminución de la expresión emocional o abulia) y además debe incluir al menos un mes de síntomas activos (Tandon *et al.*, 2013).

La quinta edición del DSM hace algunos cambios en los criterios de diagnóstico de la esquizofrenia con respecto al DSM-IV, puesto que ya no se identifican

subtipos de ésta. Los subtipos (desorganizada, catatónica, paranoide e indiferenciada) que pretendían explicar la heterogeneidad de la esquizofrenia ofrecían una pobre descripción, pues tenían una estabilidad diagnóstica baja, no presentaban patrones distintivos de la respuesta al tratamiento y no eran hereditarias (Tandon *et al.*, 2013).

En la CIE-10 aún se contemplan los subtipos antes descritos, sin embargo, se ha propuesto que en la próxima versión se incorporarán los cambios realizados en el DSM-V, incluyendo la eliminación de los subtipos (Tandon *et al.*, 2013).

1.3 Características clínicas.

Típicamente los síntomas se pueden separar en los síntomas positivos, negativos y cognitivos. Los síntomas positivos, se pueden tratar más eficazmente mediante el uso de antipsicóticos, incluyen delirios de referencia, delirios paranoides, delirios somáticos, alucinaciones (en su mayoría escuchar voces) y comportamiento catatónico. Los síntomas negativos son la falta de emoción, la imposibilidad de disfrutar de actividades, falta de energía, falta de interés en la vida, aplanamiento afectivo (alogia), habilidades sociales inadecuadas, incapacidad para hacer amigos, aislamiento social. Los síntomas cognitivos que a veces se clasifican como parte de los síntomas negativos están relacionados con la atención, la memoria de trabajo y funciones ejecutivas (Lang *et al.*, 2007). Éstas últimas dependen en gran medida de las estructuras del lóbulo frontal (Eisenberg D. P., Berman, 2010).

1.3.1 Síntomas cognitivos.

Algunas funciones cognitivas alteradas en la esquizofrenia son:

1. La memoria declarativa verbal, es decir, la capacidad de aprender y recordar conscientemente lo expresado por más de unos pocos segundos.
2. Las funciones ejecutivas o capacidad de iniciar, planificar, controlar y monitorizar la propia conducta y manipular información abstracta.
3. La memoria de trabajo o capacidad de mantener transitoriamente material mental en un estado activo o accesible, mientras otras

funciones cognitivas (como razonamiento o planificación a largo plazo) están ocurriendo.

4. La atención (Barrera, 2006).

Se ha descrito que los trastornos de la atención y de la memoria de trabajo anteceden el comienzo de la psicosis y permanecen estables después de que ésta se ha resuelto. Los déficits de la atención persisten pese a que la medicación antipsicótica los atenúa, lo cual sugiere una independencia de los síntomas positivos (Barrera, 2006).

Las alteraciones de la memoria ya sea declarativa verbal, espacial o episódica se asocian con la cronicidad de la enfermedad y con la falta de respuesta al tratamiento. Existe también un severo déficit de la memoria semántica y de la fluencia verbal, así como en tareas de asociación de palabras. Por otro lado, la capacidad de recordar la información adquirida tiempo a tras está indemne (Barrera, 2006).

Los pacientes con funciones ejecutivas deficientes pueden contestar normalmente en pruebas cognitivas estructuradas y solamente manifestarán su déficit, en situaciones que requieren de la capacidad de organizar, monitorear y controlar la propia conducta (Barrera, 2006).

Desde un punto de vista psicofisiológico, los pacientes con esquizofrenia presentan como anomalía de atención, la inhibición del prepulso (IPP) (García-Sánchez *et al.*, 2011).

1.4 Inhibición del prepulso.

La IPP tiene lugar cuando un estímulo de baja intensidad (prepulso) se presenta 60-120 milisegundos antes de un estímulo más intenso (pulso), lo que produce una atenuación del reflejo de la respuesta de sobresalto. Este reflejo es un comportamiento no condicionado que se presenta de manera espontánea. Generalmente la respuesta de sobresalto (como parpadear) es típicamente provocada por un estímulo auditivo súbito (como el estallido de un ruido) (Keshavan *et al.*, 2008). El prepulso no genera la respuesta de

sobresalto y actúa como una barrera inhibitoria que atenúa la respuesta al estímulo posterior. Este efecto inhibitorio constituye un proceso preatencional, que aísla al individuo de ser inundado por una sobrecarga de estímulos sensoriales irrelevantes (filtro sensoriomotor) que interrumpen en la conciencia. No depende del aprendizaje ni de experiencias previas (García-Sánchez *et al.*, 2011).

Se ha planteado que la existencia de este déficit conduce a que la respuesta ante el estímulo de sobresalto, no se vea atenuada por el prepulso, como ocurre en individuos sanos, lo que conduce a una sobrecarga estímulos, al trastorno del pensamiento y la fragmentación cognitiva, los cuales se han asociado con síntomas psicóticos graves (García-Sánchez *et al.*, 2011).

Lo anterior se fundamenta en la observación de que la IPP se encuentra reducida en los pacientes del espectro esquizo-afectivo, pacientes de primer episodio y en los familiares no afectados. Así mismo, en modelos animales se ha evidenciado la IPP anormal inducida por lesiones neonatales del hipocampo ventral o manipulaciones farmacológicas tales como agonistas de la dopamina y antagonistas de NMDA (Keshavan *et al.*, 2008).

Estudios de neuroimagen funcionales sugieren la participación del cuerpo estriado, hipocampo, tálamo, las regiones corticales, frontales y parietales en el IPP (Keshavan *et al.*, 2008).

La heredabilidad de IPP es de aproximadamente 70%, sin embargo, el déficit se ve en una variedad de trastornos psiquiátricos, lo que sugiere una falta de especificidad. Así mismo, es dependiente del estado de la enfermedad, siendo revertido después del tratamiento (Keshavan *et al.*, 2008).

La disminución de IPP puede ser inducido por los antagonistas de NMDA, como la ketamina. Este déficit no está influenciado por los antipsicóticos convencionales, pero puede ser revertido por la clozapina y otros antipsicóticos atípicos, señalando el valor de este biomarcador para investigar la función glutamatérgica en las estrategias reto neurofarmacológicas (Keshavan *et al.*, 2008).

1.5 Escalas psiquiátricas.

Basados en los síntomas positivos y negativos se diseñaron diferentes escalas psiquiátricas para evaluar el deterioro en la esquizofrenia. Dos de ellas son la escala de síndromes positivos y negativos (PANSS) y la escala breve de apreciación psiquiátrica (BPRS). Por otro lado, como parte del protocolo del INNMVS, los pacientes psiquiátricos o neurológicos se evalúan mediante el mini examen del estado mental (MMS).

1.5.1 Escala de síndromes positivos y negativos.

Se dividió a la esquizofrenia en dos síndromes: positivo o tipo I y negativo o tipo 2.

Se trata de una escala que se complementa a partir de una entrevista semiestructurada de 40 a 50 minutos de duración. La escala PANSS está compuesta por 30 ítems agrupados en tres factores: síndrome positivo, síndrome negativo y psicopatología general (Kay et al., 1967).

Los ítems 7 que conforman la escala positiva son: delirio, desorganización conceptual, comportamiento alucinatorio, excitación o expectación, ideas de grandeza, suspicacia/persecución y hostilidad (Kay et al., 1967).

La escala negativa también posee 7 ítems, los cuales son: aplanamiento afectivo, retraimiento emocional, relación de comunicación, retraimiento social pasivo/apático, falta de espontaneidad y fluidez de la conversación, dificultad para pensar en abstracto y pensamiento estereotipado (Kay et al., 1967).

Algunos de los 16 ítems de la escala de psicopatología general son: preocupación somática, ansiedad, sentimientos de culpabilidad, depresión, retardo motor, falta de cooperación, desorientación, atención deficiente, falta de juicio, alteración de la voluntad e ira (Kay et al., 1967).

La escala de psicopatología general fue incluida como un complemento importante a la evaluación positiva-negativa, ya que proporciona una medida separada pero paralela de gravedad de la enfermedad esquizofrénica que

puede servir como un punto de referencia, o medidas de control, para la interpretación de las puntuaciones de los síndromes (Kay et al., 1967).

De los 30 ítems que maneja, 7 se adaptaron de BPRS y 12 de la *Psychopathology Rating Schedule* (PRS). Cada elemento de la PANSS se acompaña de una definición completa así como los criterios de anclaje detallados para los siete puntos de valoración, que representan en niveles crecientes de la psicopatología: 1=ausente, 2=mínima, 3=leve, 4=moderada, 5=moderada-severa, 6=grave, y 7=extrema (Kay et al., 1967).

La PANSS se clasifica mediante la suma de las puntuaciones a través de los ítems. Los rangos posibles son 7-49 para las escalas positivo y negativo, y 16-112 para la escala de psicopatología general (Kay et al., 1967). Esta puntuación se considera que refleja el grado de predominio de un síndrome sobre el otro, y su valencia (positiva o negativa) puede servir para la caracterización tipológica (Kay et al., 1967).

1.5.2 Escala breve de apreciación psiquiátrica.

La escala BPRS consiste de una entrevista semiestructurada de 15 a 25 minutos. Los elementos que evalúa abarcan un amplio espectro de síntomas clínicos y aunque algunos de ellos son importantes (como el delirio y los trastornos del pensamiento) están englobados en un solo ítem. BPRS hace referencia a psicosis, ansiedad y depresión, fundamentalmente (Guy, 1981).

Posee 18 ítems en donde la severidad se califica del "0 al 4"; el 0 implica normalidad y el 4 máxima severidad. El resultado se expresa como la suma de las puntuaciones de todas las respuestas. Puntajes de 30 o más implican intensidad severa y de 15 a 30, intensidad leve y se evalúa la presencia y severidad de cada síntoma durante la entrevista y durante las últimas 72 horas (Anexo I).

La escala fue diseñada con el objetivo de valorar la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes psicóticos, aunque también se ha utilizado para el diagnóstico y para la clasificación sindrómica de este cuadro (Bech, 1993). Resulta especialmente útil en casos moderados y severos, disminuyendo su

rendimiento cuando los síntomas son más leves. También es apropiada como clasificación de la sintomatología predominante (positiva o negativa) (Overall, Gorham, 1988).

1.5.3 Mini examen del estado mental (MMS).

La escala MMS fue diseñada por Folstein en 1975 con la idea de proporcionar un análisis breve y estandarizado del estado mental que sirviera para diferenciar en pacientes psiquiátricos, los trastornos funcionales de los orgánicos (Folstein *et al.*, 1975). Hoy en día, se utiliza sobre todo para detectar y evaluar la progresión del trastorno cognitivo asociado a enfermedades neurodegenerativas como la demencia tipo Alzheimer (Galasko *et al.*, 1990).

Es un test sencillo que muestra un buen rendimiento como valoración inicial del deterioro cognitivo (Folstein *et al.*, 1975).

El MMS se compone de 19 ítems que exploran las funciones intelectuales básicas: orientación (10 primeros ítems), memoria de fijación (repetir tres palabras), atención y cálculo (restar y deletrear al revés), memoria a corto plazo (recordar palabras), lenguaje y construcción (últimas 6 instrucciones). Su aplicación en promedio requiere de cinco a diez minutos. Una persona con alta escolaridad debe obtener por lo menos 28 puntos y cinco errores son permisibles en alguien con educación secundaria (Folstein *et al.*, 1975).

En la Tabla 1 se presenta la relación entre la puntuación obtenida por MMS y el grado de discapacidad.

Tabla 1. Interpretación del puntaje de MMS (Folstein et al., 1975).

Puntuación	Grado de discapacidad	Funcionamiento del día a día
25-30	Cuestionable	Puede tener déficits clínicamente significativos pero leves. Que pueda afectar a las actividades solamente más exigentes de la vida diaria.
20-25	Leve	Efecto significativo. Puede requerir algún tipo de supervisión, apoyo y asistencia
10-20	Moderado	Claro deterioro. Puede requerir supervisión las 24 horas.
0-10	Severo	Deterioro marcado. Es probable que requieran supervisión las 24 horas y asistencia con las actividades de la vida diaria

El punto de corte para demencia se establece habitualmente en 24 puntos. Si hay que anular algún ítem (a causa de analfabetismo, ceguera, hemiplejía) se recalcula proporcionalmente. Por ejemplo, 21 puntos sobre 26 posibles equivaldrían a un resultado de 24 puntos (redondeando al entero más próximo) (Guía de Práctica Clínica, 2008) (Ver anexo II).

1.6 Etiología y factores de riesgo.

La etiología de la esquizofrenia se considera multifactorial (Zhang J.P., Malhotra, 2010) e implica diversas anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas y se acepta que factores genéticos, ambientales y epigenéticos juegan un papel importante en su patogénesis (Giménez, Zafra, 2009).

Crecer en un entorno urbano, la inmigración, el abuso de drogas y eventos perinatales (hipoxia, infección materna, estrés y desnutrición) se han asociado, con un mayor riesgo de desarrollar esquizofrenia (Tiwari et al., 2010).

Por otro lado, estudios familiares, de gemelos y de adopción sugieren un fuerte componente genético, (Tiwari *et al.*, 2010) siendo el estimado de la heredabilidad de ~64%-83% (Ota *et al.*, 2014)

1.6.1 Hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia.

Postula que durante el desarrollo del cerebro embrionario y fetal, la conectividad neuronal es defectuosa y el funcionamiento bioquímico alterado resultando en la disfunción cognitiva, emocional e intencional en el futuro. En el cerebro postmortem esquizofrénico se han encontrado alteraciones en la formación del hipocampo, la corteza prefrontal y el lóbulo temporal superior. La dilatación ventricular, las reducciones en el volumen cerebral y los cambios de espesor cortical y la asimetría cerebral, que se observan en los pacientes esquizofrénicos de primer episodio no medicados sugieren un resultado de una cascada de desarrollo neurológico temprano (Lang *et al.*, 2007). Además, estas alteraciones no progresan con el tiempo en la mayoría de los casos (Apiquian-Guitart *et al.*, 2014).

1.6.2 Hipótesis dopaminérgica.

Postula que los síntomas de la esquizofrenia pueden ser resultado de exceso de la neurotransmisión dopaminérgica en particular en las regiones cerebrales mesolímbica y del cuerpo estriado (Figura 1), lo que lleva a los síntomas positivos y los déficits dopaminérgicos en las regiones cerebrales prefrontales, que son responsables de los síntomas negativos (Giménez, Zafra, 2009).

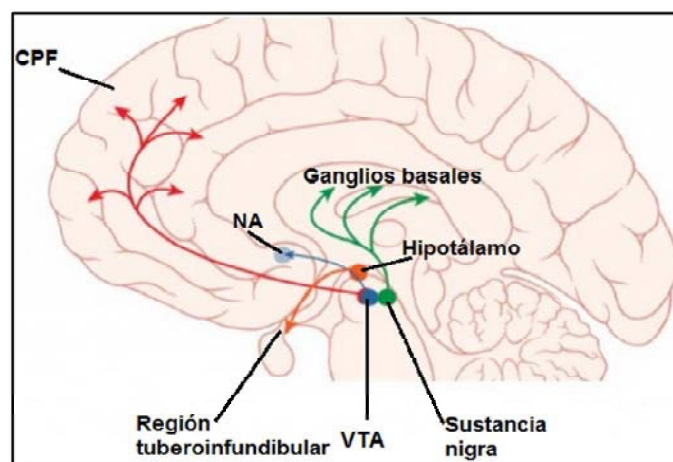


Figura 1. Vías dopaminérgicas. En azul se indica la vía mesolímbica (síntomas positivos), la cual está constituida por proyecciones del área tegmental ventral (VTA) hacia el núcleo accumbens (NA). En rojo, se presenta la vía mesocortical (síntomas negativos y cognitivos) que va desde VTA hacia la corteza prefrontal (CPF). Con flechas verdes se muestra la vía nigroestriada (planificación motora) y en naranja la vía tuberoinfundibular (liberación de prolactina). (Tomado de <http://institutodepsicofarmacologia.com/antipsicoticos/vias-dopaminergicas-y-antipsicoticos>).

Además se sustenta en la observación de que prácticamente todos los fármacos efectivos en el tratamiento de la enfermedad como el haloperidol (los llamados antipsicóticos «típicos»), o como la clozapina o la olanzapina (los llamados «atípicos»), son antagonistas de receptores dopaminérgicos D2. Por otro lado, los agonistas dopaminérgicos indirectos como la cocaína o las anfetaminas, que actúan elevando el tono dopaminérgico, inducen los síntomas positivos de la esquizofrenia (Giménez, Zafra, 2009).

Existen cinco subtipos de receptores de dopamina. Se clasifican en la familia D1 (subtipos de receptores D1 y D5) y la familia D2 (subtipos D2, D3 y D4). Todos los receptores de DA están acoplados a proteínas G y alteran fundamentalmente la producción de cAMP en las células, pero también puede afectar a otros sistemas de transducción (VanDongen, 2009).

Por otro lado, genes tales como *DRD2*, *DRD3*, *DARPP-32*, *BDNF* o *COMT* están estrechamente relacionados con el funcionamiento del sistema dopaminérgico (Giménez, Zafra, 2009).

1.6.3 Hipótesis glutamatérgica.

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en la corteza cerebral (Lang *et al.*, 2007).

Varias líneas de evidencia apuntan a la hipótesis de que la disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia es secundaria a una disfunción glutamatérgica subyacente. En este concepto una hipofunción del glutamato en las proyecciones córtico-estriatal (Figura 2) conduce a un efecto de apertura en el bucle tálamo-cortical que resulta en los síntomas psicóticos y de ese modo los cambios en la concentración de dopamina conocidos (Lang *et al.*, 2007).

Los receptores de glutamato han sido clasificados como receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de glutamato son α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-propionato (AMPA), kainato, y NMDA (N-metil-D-aspartato), los cuales son canales iónicos activados por ligando, mientras que los receptores metabotrópicos de glutamato se acoplan a los diversos sistemas de transducción de señales (VanDongen, 2009).

Aunque los antipsicóticos comunes actúan sobre receptores de dopamina, la hipofunción del receptor NMDA, ha sido propuesta como un mecanismo patogénico complementaria en la esquizofrenia. Esta idea es apoyada por varias líneas de evidencia, especialmente el efecto psicotomimético de antagonistas del receptor NMDA como fenciclidina (PCP), ketamina, dizocilpina (MK-801) (Tost *et al.*, 2010).

Por otro lado, hay evidencias clínicas de que la administración de co-agonistas de receptores NMDA a pacientes esquizofrénicos, les hacen mejorar, aunque de forma modesta, de muchos de los rasgos característicos de la enfermedad. Esta hipótesis se ha visto reforzada por el descubrimiento de varios genes de susceptibilidad relacionados con las vías glutamatérgicas: *G72*, *NRG1*, *GRIA4*, *GRM3*, *GRM8*, *GRIN2D*, o *GRIN2A* (Giménez, Zafra, 2009).

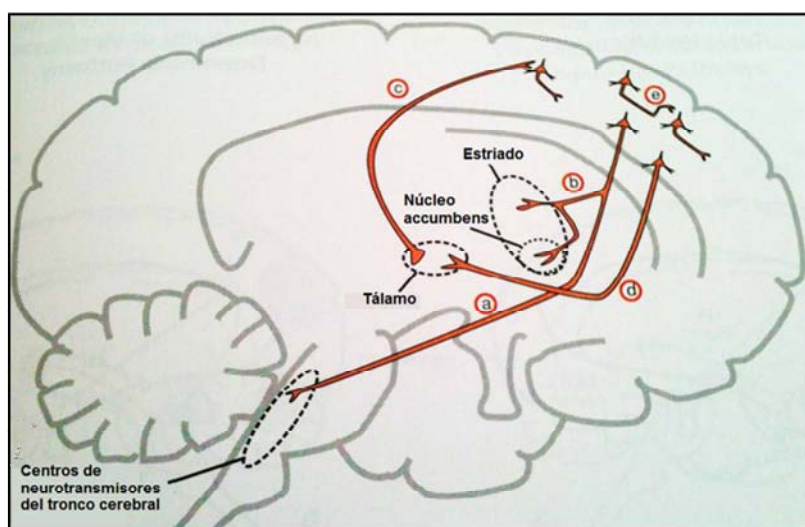


Figura 2. Vías del glutamato. a) Cortical. b) Corticoestriatal. c) Tálamo-cortical d) Córtilo-talámico e) Córtilo-córtilo (Tomado de Stahl, S. M., 2005).

De igual manera, la neurotransmisión del ácido γ -aminobutírico (GABA) en la esquizofrenia se encuentra alterada. La actividad de las neuronas GABAérgicas en la corteza frontal dorsolateral (CFDL) es esencial para la función de la memoria de trabajo normal, lo que sugiere que las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica en la CFDL podrían contribuir a estas perturbaciones. En consonancia con esta interpretación, estudios postmortem han encontrado consistentemente niveles reducidos de ARNm de la isoforma de 67 kDa de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD67, codificada por el gen

GAD1), la cual es la determinante principal de los niveles de GABA en la CFDL, de sujetos con esquizofrenia (Lewis *et al.*, 2006).

De manera que la esquizofrenia presenta una alteración neuroquímica compleja. Se ha postulado la siguiente hipótesis que involucra a los tres neurotransmisores: dopamina, glutamato y GABA. Neuronas piramidales corticales glutamatérgicas excitan directamente las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral que se proyectan hacia la CFDL e inhiben indirectamente, a través de las interneuronas GABAérgicas, las neuronas dopaminérgicas que se proyectan hacia el cuerpo estriado. Por lo tanto, la obtención de células piramidales prefrontales reducidas en la esquizofrenia podría explicar la disminución en la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesocorticales y el aumento de las neuronas mesostriatales (Lewis *et al.*, 2006).

Por otro lado, el equilibrio de excitación e inhibición en el sistema nervioso central es controlado por múltiples mecanismos y las alteraciones en este equilibrio pueden conducir a la activación anormal neuronal y a una neuropatología. La señalización sináptica excitatoria está mediada por glutamato y la inhibitoria por GABA (Yuan *et al.*, 2015).

Cuando la transmisión sináptica excitatoria avanza sin control debido a la atenuación de la transmisión GABAérgica, puede dar lugar a convulsiones (Yuan *et al.*, 2015). Se ha reportado que existe comorbilidad de la esquizofrenia y pacientes con epilepsia, por lo que se han estudiado los genes relacionados con ambas patologías.

1.7 Asociación de la esquizofrenia y la epilepsia.

La epilepsia es un trastorno cerebral común caracterizado por convulsiones recurrentes y diversas comorbilidades graves, entre ellas la disfunción neurológica (Wang *et al.*, 2015).

Recientes avances de la tecnología molecular ofrecen la promesa para la identificación de los defectos moleculares que contribuyen a la arquitectura

genética de esta enfermedad, y para mejorar el diagnóstico precoz y tratamientos personalizados (Wang *et al.*, 2015).

Entre los genes relacionados con la esquizofrenia y la epilepsia se encuentran el regulador de la proteína G de señalización 4 (*RGS4*), el gen alterado en esquizofrenia 1 (*DISC1*), la neuregulina 1 (*NRG1*), el ácido D-amino oxidasa (*DAAO*) y la catecol-O-metiltransferasa (*COMT*). Muy interesantemente, la mayoría de los productos de estos genes tienen funciones asociadas con la neurotransmisión o participan en el desarrollo neurológico. De igual manera, anomalías en el neurodesarrollo, incluyendo defectos de migración neuronal, tienen relación con la epilepsia y la esquizofrenia (Cascella *et al.*, 2009).

Por otro lado, mutaciones en *GRIN2A* se han asociado no solo con esquizofrenia, sino también con la epilepsia. *GRIN2A* codifica para la subunidad GluN2A del receptor NMDA (Yuan *et al.*, 2015).

1.8 La esquizofrenia como un complejo desorden genético.

Desde la observación inicial de que la esquizofrenia tiene un modo de herencia poligénico y la disponibilidad de marcadores polimórficos para el mapeo genético, se han hecho muchos intentos para encontrar genes de susceptibilidad para la esquizofrenia usando los métodos de vinculación o de asociación (Lang *et al.*, 2007).

Los estudios de asociación se han centrado en los polimorfismos genéticos que alteran la expresión o función de un gen, que se supone está involucrada en la esquizofrenia. La selección de genes candidatos surge de su función conocida (candidatos funcionales) o de su localización cromosómica (candidatos posicionales) (Lang *et al.*, 2007).

Una gran variedad de genes candidatos funcionales y/o posicionales se han evaluado en los últimos años. Aunque muchos resultados positivos han sido detectados, muchos hallazgos no pudieron ser replicados en estudios posteriores. El pequeño tamaño de muestra, la heterogeneidad genética, el sesgo de selección de individuos, limitaciones estadísticas y divergentes

poblaciones étnicas pueden explicar sólo algunas razones de los resultados contradictorios (Lang et al., 2007).

Por otro lado, variantes genéticas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), a menudo pueden tener sólo un impacto menor sobre la expresión génica y la función. El avance se ha logrado a través del meta-análisis y la evaluación de los haplotipos que abarcan varios SNP vecinos (Lang et al., 2007).

Recientemente se ha llegado a la conclusión, de que la mayoría de los resultados prometedores para la esquizofrenia se obtuvieron en el cromosoma 6q, 13q, 18 y 22q (Lang et al., 2007). Estas regiones también están implicadas en el trastorno bipolar (Tiwari et al., 2010).

1.9 Síndrome de delección 22q11.2.

La delección hemicigota de la región cromosómica 22q11.2 (del22q11.2), también denominado como síndrome velocardiofacial o de DiGeorge, es el factor de riesgo más fuerte conocido para desarrollar esquizofrenia en la edad adulta (Rees *et al.*, 2013). De hecho, se reporta un 25-30% de incremento de la prevalencia de la esquizofrenia entre pacientes con del22q11.2. Por otra parte, mientras que la prevalencia de la del22q11.2 en la población mundial es 1 en 4.000 individuos (Jacquet *et al.*, 2002), su frecuencia se estima en aproximadamente el 1% en pacientes adultos con esquizofrenia (Tost *et al.*, 2010).

El síndrome de del22q11.2 tiene manifestaciones muy heterogéneas y multisistémicas. Entre ellas se incluyen defectos congénitos cardiovasculares, anomalías craneofaciales, anomalías velofaríngeas, hipoparatiroidismo, inmunodeficiencia de células T, déficits cognitivos y las altas tasas de morbilidad psiquiátrica (por ejemplo, esquizofrenia, trastornos de ansiedad y el trastorno de hiperactividad con déficit de atención). (Hoogendoorn *et al.*, 2004) (Michaelovsky *et al.*, 2012).

La del22q11.2 es debida a la recombinación homóloga no alélica de secuencias de repetidos de bajo número de copias (LCR) en 22q11.2. Las LCR

son bloques de ADN específicos de la región, por lo general de 10 a 300 kilobases (kb) de tamaño y de más de 95% a 97% de similitud entre sí. El 90% de las deleciones de 22q11.2 son de 3 Mb (que abarca ~ 60 genes) y se produce entre LCR A y LCR D. El 10% restante de estas deleciones son de 1,5 Mb de tamaño (~ 28 genes) y ocurre entre LCR A y LCR B (Michaelovsky *et al.*, 2012). Por lo que se considera que los genes comúnmente delectados en esta región, podrían contribuir a la susceptibilidad de esta enfermedad (Ota *et al.*, 2014). Dos de ellos son el gen catecol-O-metil transferasa (*COMT*) y el gen prolina deshidrogenasa (*PRODH*).

1.10 *COMT*.

En el sistema nervioso, la enzima *COMT* media la degradación extraneuronal de las catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina) a través de 3-O-metilación del anillo de benceno. Los transportadores de dopamina son escasos en la CPF y *COMT* es un determinante particularmente crítico de flujo de dopamina en esta área. Estudios han demostrado que un polimorfismo en el gen *COMT* (Val¹⁵⁸Met, rs4680) afecta a la termoestabilidad de la proteína resultando en una reducción de tres a cuatro veces de la actividad enzimática en los portadores del alelo Met, lo que se relaciona con los cambios en las funciones cognitivas prefrontales. Esto sugiere que el alelo Val podría aumentar el riesgo para la esquizofrenia mediante el aumento de catabolismo de la dopamina, que a su vez afecta la eficacia funcional de la CPF (Tost *et al.*, 2010).

1.11 *PRODH*.

Este gen se expresa ampliamente en el cerebro y codifica para la prolina oxidasa (POX), una enzima limitante de la velocidad en el proceso de degradación de la prolina. Mutaciones homocigotas en el gen *PRODH* ocasionan hiperprolinemia tipo I (HPI), un trastorno neurológico poco frecuente, con manifestaciones variables tales como convulsiones, retraso mental y trastornos psiquiátricos (Carmel *et al.*, 2014).

1.11.1 Localización.

PRODH se encuentra en la cadena antisentido de la región 22q11.2. Comprende 15 exones que abarcan 23,77 kb, cerca del final de la región centromérica. Un pseudogén de *PRODH* (ψ *PRODH*) situado de igual manera en 22q tiene más del 95% de identidad de secuencia con *PRODH*, pero tiene una deleción interna que elimina un segmento de 13,1 kb que contiene los exones 2 al 7, junto con los intrones intermedios (Bender *et al.*, 2005). Numerosas mutaciones sin sentido en el gen *PRODH* se han descrito, la mayoría de ellas aparecen de forma recurrente a causa de una conversión génica entre *PRODH* y su pseudogén (Liu *et al.*, 2002).

1.11.2 Función de la prolina oxidasa.

PRODH codifica para la POX, también denominada como prolina deshidrogenasa, una enzima de la membrana interna mitocondrial. Se expresa en riñón, hígado y el cerebro. Cataliza la conversión de la prolina a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) mediante el uso de flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor. P5C tiene tres posibles destinos metabólicos: la oxidación a glutamato en una reacción catalizada por P5C deshidrogenasa (P5CDH), la transaminación a ornitina en una reacción realizada por la ornitina aminotransferasa, o la reducción de nuevo a prolina en una reacción catalizada por P5C reductasa (Figura 3) (Bender *et al.*, 2005).

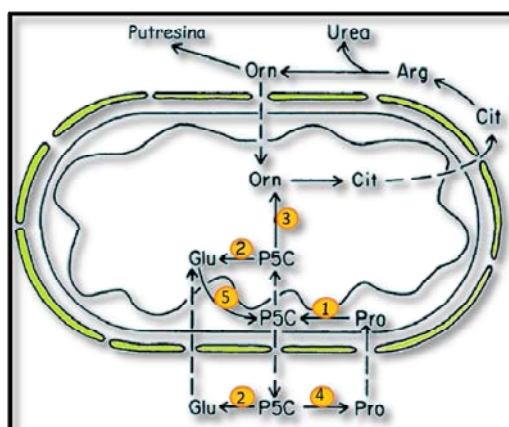


Figura 3. Diagrama de localización subcelular de las enzimas que interconvierten los aminoácidos: ornitina, arginina, prolina y glutamato. Glu, glutamato; P5C, pirrolina-5-carboxilato; Pro, prolina; Orn, ornitina; Cit, citrulina; Arg, arginina. La enzima 1 corresponde a POX, P5CDH es la número 2; a Ornitina aminotransferasa, P5C reductasa y P5C sintetasa, les corresponden los números 3, 4 y 5, respectivamente. El transporte celular está indicado

mediante una línea discontinua y la catálisis enzimática por una línea continua. (Adaptación de Jones M. E., 1985).

Se ha demostrado que las células con alta expresión de *PRODH* tienen un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) dependientes de prolina, lo que sugiere que la alta actividad de POX puede jugar un papel en la apoptosis y/o la proliferación celular (Bender *et al.*, 2005).

1.11.3 Función biológica de la prolina.

La L-prolina es un aminoácido no esencial con una estructura de anillo de pirrolidina que proporciona características únicas para la estructura del péptido. La prolina libre también se utiliza como un osmolito en ciertas plantas y células humanas. Además, se ha sugerido que la prolina pueda ser considerado como un neurotransmisor inhibitorio y es un precursor metabólico de glutamato en subpoblaciones de neuronas glutamatérgicas (Bender *et al.*, 2005). Cabe destacar que el glutamato es importante para la transducción de señales entre las neuronas y para la plasticidad sináptica (Ota *et al.*, 2014). Por otro lado, GABA es sintetizado a partir de la descarboxilación del glutamato, mediante la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Redolar, 2010).

Por otro lado, altos niveles de prolina en sangre se han asociado con IQ disminuido, deterioro cognitivo y esquizofrenia (Clelland *et al.*, 2014). Así mismo, se ha documentado que ratones *knockout* de *PRODH* mostraron hiperprolinemia, fenotipos esquizofrénicos, con memoria asociativa escasa y disminución de IPP (Gogos *et al.*, 1999). Además se ha reportado la reducción de glutamato y de GABA (Ota *et al.*, 2014).

Así mismo, existen reportes en donde los pacientes con del22q11.2 e hiperprolinemia severa tuvieron un desempeño significativamente desfavorable, en un gran número de tareas cognitivas y mostraron una mayor prevalencia de la psicosis, en comparación con otros pacientes con del22q11.2 (Raux *et al.*, 2006).

1.11.4 Errores del metabolismo de la prolina.

Los errores innatos del metabolismo de la prolina en seres humanos son: HPI, HP11, la deficiencia de P5C-sintetasa, la deficiencia de P5C reductasa, la deficiencia de ornitina aminotransferasa y la deficiencia de prolidasa. De estas enfermedades, solo cursan con hiperprolinemia la HPI y HP11. Éstas siguen un patrón de herencia autosómico recesivo (Mitsubuchi *et al.* 2014).

1.11.4.1 Hiperprolinemia tipo I.

Resulta de la deficiencia hereditaria de *PRODH* y se asocia con niveles de prolina en plasma con un rango de 3 a 10 veces por encima de lo normal, sin la excreción urinaria de P5C. En controles sanos la concentración media de prolina en plasma después de una noche de ayuno es de 161 μM , con un rango de 51 a 271 μM (Bender *et al.*, 2005).

Existen reportes controversiales sobre las implicaciones de este trastorno metabólico, puesto que se ha documentado que no está claramente asociado con manifestaciones clínicas y se ha declarado como un trastorno benigno (Phang *et al.* 2001). Así mismo, se ha reportado que la HPI puede ocurrir por otras condiciones, tales como malnutrición y enfermedad hepática. En particular, individuos con condiciones que cursen con niveles elevados de ácido láctico en sangre pueden tener hiperprolinemia, porque el ácido láctico inhibe la degradación de la prolina (*Genetics Home Reference*).

No obstante, Jacquet y colaboradores identificaron una delección homocigota completa de *PRODH*, en un niño con HPI (2 246 μM), el cual tenía severo retraso psicomotor y un estado epiléptico asociado a niveles altos de prolina en sangre (Mitsubuchi *et al.* 2014). Aproximadamente el 50% de los pacientes con el Síndrome de del22q11.2 padecen hiperprolinemia (Bender *et al.*, 2005).

Los datos existentes sugieren que la HPI grave (1 800 μM) se produce en pacientes con grandes delecciones de la región 22q11.2 y/o con mutaciones de sentido equivocado en *PRODH* (como L441P y R453C) que provocan una reducción de la actividad >70%. Mientras que la hiperprolinemia modesta (300-500 μM) se asocia con alelos de *PRODH* con una reducción moderada de la

actividad (Bender *et al.*, 2005). De manera que, la HPI no siempre es una condición benigna, pues los niveles séricos de prolina parecen correlacionarse con la gravedad de la deficiencia de POX y el número de mutaciones por locus de *PRODH* (Alfenjar *et al.*, 2007).

1.11.4.2 Hiperprolinemia tipo II.

Es una condición rara de prevalencia desconocida, que resulta de una mutación en el gen *ALDH4A1* (aldehído deshidrogenasa familia 4, miembro A1) que codifica para la P5CDH. *ALDH4A1* se encuentra ubicado en 1p36. La HP II se caracteriza por niveles de prolina en plasma de 10 a 15 veces por encima de lo normal y la excreción de P5C en la orina. El fenotipo clínico de la HP II incluye un aumento de la frecuencia de las convulsiones y retraso mental leve (Mitsubuchi *et al.* 2014).

Por otro lado, el déficit de la vitamina D se ha asociado con la susceptibilidad a esquizofrenia y la suplementación se ha recomendado para aquellos en situación de riesgo. Aunque el mecanismo por el cual un déficit confiere riesgo es desconocido, la vitamina D es un modulador transcripcional potente y puede regular la expresión de *PRODH* (Clelland *et al.*, 2014).

De manera que los cambios en el metabolismo de la prolina son un factor de riesgo candidato atractivo para la susceptibilidad de desarrollar esquizofrenia.

1.11.5 Polimorfismos de un solo nucleótido de *PRODH* y sus haplotipos.

Al menos 16 mutaciones de sentido erróneo de *PRODH* han sido identificadas en estudios de asociación entre HPI y la esquizofrenia, 10 de las cuales están presentes en frecuencias polimórficas. Las consecuencias funcionales de estas mutaciones sobre la actividad de POX fueron evaluadas *in vitro* y fueron divididas en tres grupos: en aquellas que reducen la actividad levemente (<30%), de forma moderada (30–70%) y severa (>70%) (Bender *et al.*, 2005).

En la Tabla 2 se indican los SNP de *PRODH* analizados en este estudio y que previamente han sido asociados a esquizofrenia.

Tabla 2. Localización, cambio alélico y el efecto sobre la actividad de POX de las variantes analizadas en este estudio.

Número de referencia de SNP (rs)	Localización	Alelo	Proteína	Actividad de POX*
rs4819756	Exón 5	G>A	R185W	30%-70%
rs11913840	Exón 5	C>T	R185Q	<30%
rs137852934	Exón 8	A>T	L289M	<30%
rs16983466	Exón 12	G>A	D426N	30%-70%
rs2238731	Exón 12	C>T	V427M	30%-70%
rs2904552	Exón 12	C>T	R431H	30%-70%
rs2904551	Exón 12	A>G	L441P	>70%
rs3970559	Exón 12	G>A	R453C	>70%
rs2238730	Exón 12	C>T	A454A	-
rs1807467	Exón 12	C>A	A455S	<30%
rs2870984	Exón 12	G>A	T466M	>70%
rs2870983	Exón 12	C>T	A472T	<30%
rs385440	Intrón 13	G>A	SNP etiqueta	-
rs450046	Exón 14	T>C	Q521R	>120%
rs372055	Exón 15	A>G	L581L	-

*Tomando como base la actividad normal de la enzima (Bender *et al.*, 2005).

En vista de lo anterior, varias observaciones apoyan la idea de que los SNP de *PRODH*, la deficiencia de la actividad enzimática de POX y la hiperprolinemia pueden conferir al riesgo de presentar esquizofrenia. Aún así, los SNP de manera aislada, a menudo pueden tener sólo un impacto menor sobre la expresión génica y la función de la proteína. En cambio, el análisis de los haplotipos (combinaciones particulares de alelos observados en una población) (Gabriel, *et al.*, 2002) que abarcan varios SNP vecinos, permite investigar la influencia del conjunto de estos SNP en la enfermedad (Lang *et al.*, 2007).

Por otro lado, cuando surge una nueva mutación, lo hace en un haplotipo cromosómico específico. La asociación entre cada alelo mutante y su haplotipo

ancestral se interrumpe solamente por mutación y recombinación en las generaciones posteriores (Gabriel *et al.*, 2002).

En la Tabla 3 se muestran algunos de los haplotipos de riesgo encontrados en diferentes poblaciones y su asociación con la esquizofrenia.

Tabla 3. Haplotipos de riesgo de *PRODH* y su asociación con esquizofrenia.

Haplotipos de riesgo	Población	Asociación
rs4819756/rs2870983/ rs450046 GCC	Estadounidense	Disminución del volumen estriatal y aumento de la conectividad funcional estriado-frontal durante la ejecución de tareas cognitivas (Kempf <i>et al.</i> , 2008).
rs372055/rs450046/ rs385440 GCA	Griega	Memoria verbal e IPP atenuados, mayor ansiedad y esquizotipia en varones sanos (Roussos, 2009).
rs2904552/rs2238731/ rs16983466 TCG	Brasileña	Disminución del volumen cerebral* (Ota, <i>et al.</i> , 2014).

IPP: inhibición del prepulso.

*El triplotipo rs2904552/rs2238731/rs16983466 presentó asociación con esquizofrenia, pero solo rs2238731 tuvo asociación con la disminución del volumen cerebral.

El haplotipo protector ACT formado por rs4819756/rs2870983/rs450046 se asoció con una disminución de la conectividad funcional estriado-frontal (Kempf *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el efecto de los triplotipos de protección y de riesgo de rs4819756/rs2870983/rs450046, proporcionan evidencia de que las variaciones genéticas en *PRODH* contribuyen al riesgo y la protección de la esquizofrenia mediante la modulación de la actividad enzimática de POX e impactando en el procesamiento neural fronto-estriatal (Tost *et al.*, 2010).

1.11.6 Interacción entre *PRODH* y *COMT*.

La reducción de la actividad de la enzima *COMT* puede conducir a una mayor disponibilidad de la dopamina, mientras que la reducción de actividad de la enzima *POX* puede aumentar la presencia de prolina que conduce a la elevación en la señalización glutamatérgica en el hipocampo causando una liberación de dopamina en CPF (Figura 4) (Carmel *et al.*, 2014).

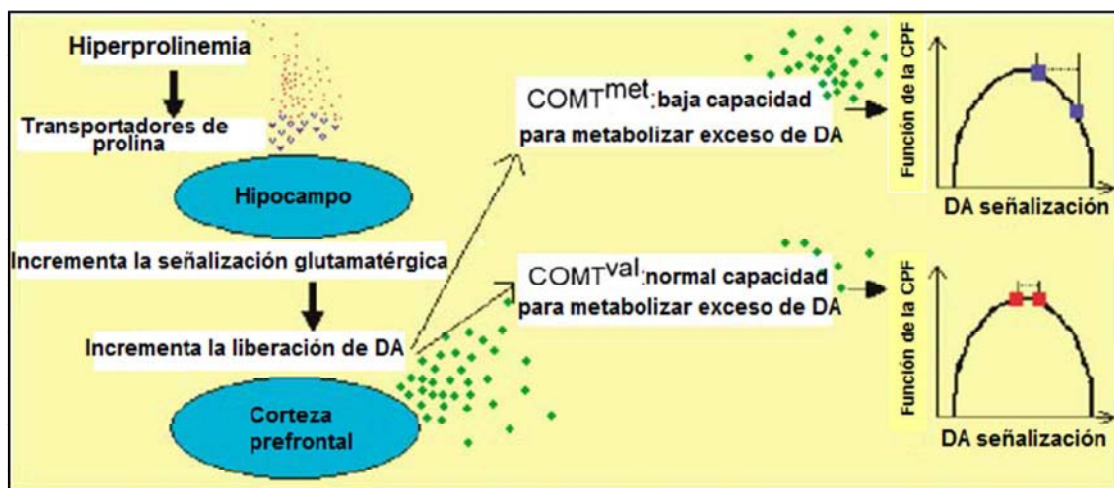


Figura 4. Representación esquemática del modelo hipotético que explica la interacción entre *PRODH* y *COMT*. Los altos niveles de prolina inducen la señalización glutamatérgica en el hipocampo. Aumento del tono glutamatérgico provoca una liberación de dopamina (DA) en la CPF. En individuos con delección hemigota 22q11.2 para *COMT^{met}* (en azul), la ineficiencia en el catabolismo de la DA conduce a una disminución en la función CPF (línea punteada). Esto, en combinación con una posición del punto de partida a la derecha de la curva en el estado óptimo, conduce a una disminución de la función PFC. En los hemigotos para *COMT^{val}* (en rojo), el exceso de DA se cataboliza de manera más adecuada; el cambio resultante, si la hay, en el modelo hipotético de la curva en forma de U invertida es más moderado y no da lugar a un cambio sustancial en la función CPF (Vorstman *et al.*, 2009).

Por otro lado, de acuerdo con un modelo de ratones *PRODH* deficientes, individuos con hiperprolinemia, del22q11 y con baja actividad de la *COMT*, son los menos eficientes para compensar la hiperactividad dopaminérgica y son los que pueden tener el riesgo más alto de desarrollar esquizofrenia (Vorstman *et al.*, 2009).

2. Planteamiento del problema.

La esquizofrenia constituye una de las más importantes causas de discapacidad crónica y es una de las enfermedades con mayor demanda en los servicios de salud mental, cuya etiología es desconocida. Además, en la actualidad no existen pruebas diagnósticas certeras de esta entidad. Es por ello necesario desarrollar pruebas moleculares que apoyen el diagnóstico clínico de la esquizofrenia. El Síndrome de del22q11.2 es uno de los factores de riesgo genético más importantes para desarrollar esta patología y el gen *PRODH* se encuentra en la región típicamente deletada. SNP funcionales de este gen se han asociado con la esquizofrenia, así como sus haplotipos. En nuestra población se desconoce las frecuencias de estos SNP y los haplotipos formados, por lo que se decidió estudiarlos en controles sanos mestizo mexicanos y en pacientes con diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar.

3. Hipótesis.

- ♦ El genotipo mutante de todas las variantes estará presente en mayor medida en pacientes del espectro esquizo-afectivo, que en controles sanos mestizo mexicanos.
- ♦ Los haplotipos encontrados en controles serán diferentes con respecto a los pacientes, lo cual permitirá encontrar haplotipos de protección o de riesgo.

4. Objetivos.

- ♦ Analizar las frecuencias alélicas, genotípicas y de haplotipos de quince SNP de *PRODH* en controles sanos y en pacientes mestizo mexicanos con diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar.
- ♦ Comparar las frecuencias alélicas entre controles, bases públicas y pacientes psiquiátricos.
- ♦ Establecer la asociación de los haplotipos con el espectro esquizo-afectivo.

5. Sujetos y métodos.

5.1 Sujetos de estudio.

Previo consentimiento informado, se analizaron 101 controles sanos mestizos mexicanos sin antecedentes psiquiátricos ni neurológicos y negativos para la del22q11.2. Éstos fueron pareados por género y edad con 101 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno bipolar, fenotipo compatible con del22q11 o trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA) incluidos a través de la consulta externa del INNNMVS. La edad promedio en controles fue de 33.43 ± 11.64 años y en pacientes fue de 33.23 ± 11.70 años. El porcentaje de mujeres y de hombres fue de 44.55% y 55.44% respectivamente.

Tabla 4. Distribución de las enfermedades incluidas en este estudio.

Patología	Porcentaje (%)
Esquizofrenia	64.36
Trastorno Bipolar	26.73
Trastorno esquizoafectivo	5.94
Fenotipo del22q11	1.98
THDA	0.99

Tabla 5. Lugar de nacimiento de los pacientes.

Entidad federativa	Porcentaje (%)
Distrito Federal	60.22
Guerrero	8.60
Estado de México	5.38
Puebla	4.30
Morelos	4.30
Otros estados	17.20

Criterios de inclusión de los controles

- ♦ Individuos sanos mestizo mexicanos sin antecedentes psiquiátricos ni neurológicos, negativos para la del22q11.2.
- ♦ Que deseen participar en el protocolo de investigación y que firmen la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión para los controles

- ♦ Retiro de su consentimiento informado.
- ♦ Antecedentes heredo-familiares psiquiátricos o neurológicos.
- ♦ Presente del22q11.2.

Criterios de inclusión para los pacientes

- ♦ Pacientes mestizo mexicanos con diagnóstico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno bipolar, fenotipo compatible con del22q11 o THDA, confirmado por psiquiatras del INNNMVS y tamizados para la del22q11.2.
- ♦ Que deseen participar en el protocolo de investigación y que firmen la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión de los pacientes

- ♦ Retiro de su consentimiento informado.

Desde el punto de vista etnológico se consideraron mestizos aquellos mexicanos originarios con tres generaciones nacidas en México. (Granados *et al*, 2006) Puede aceptarse solo un abuelo español.

5.2 Toma de muestra biológica.

La sangre periférica se obtuvo mediante venopunción por personal calificado, previo consentimiento informado. Se utilizaron tubos Vacutainer™ de 6 mL con citrato de sodio como anticoagulante. Las muestras fueron preservadas a 4° C hasta el momento de su uso.

5.3 Extracción de DNA genómico a través de la metodología de Sales Miller (modificada por el laboratorio).

1. Se transfirieron 3 mL de sangre periférica a un tubo Falcon de 15 mL. A éste se le adicionó 3 volúmenes de *Buffer* de Lisis de Glóbulos Rojos (BLGR) y se homogenizó mediante inversión del tubo. Después se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm durante 6 minutos, posteriormente se desechó el sobrenadante. Al botón se le agregó 1 mL de BLGR, se homogenizó y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

2. El homogenizado se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta obtener un botón blanco, libre de hemoglobina.
3. Al botón limpio se le adicionaron 570 μL de una solución de NaCl 5 mM y se homogenizó por 2 minutos. Consecutivo a esto se adicionaron 40 μL de una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% p/v y se agitó durante 5 min. Después se adicionaron 200 μL de NaCl 7 M y se homogenizó por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a una velocidad de 11500 rpm durante un lapso de 20 minutos a una temperatura de 4 °C.
4. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de 1.5 mL. Se adicionaron 600 μL de una mezcla de cloroformo-álcool isoamílico en una proporción 49:1 v/v. Se homogenizó y se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm por 15 min a una temperatura de 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
5. Se adicionaron 600 μL de etanol absoluto al tubo anterior a una temperatura de 4°C, se agitó y se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue desechado y al botón se le adicionaron 600 μL de etanol al 70% v/v. Se homogenizó y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el botón se secó al vacío mediante el equipo *Eppendorf concentrator 5301* durante 30 minutos.
6. El botón seco se resuspendió adicionando 200 μL de agua estéril y la posterior agitación constante por medio del equipo *Eppendorf Thermomixer compact*. Las muestras fueron cuantificadas y almacenadas a -20 °C.

5.4 Cuantificación de muestras de DNA.

La determinación de la concentración de DNA, se realizó mediante espectrofotometría (*NanoDrop 2000®*) a una longitud de onda de 260 nm. Se determinaron las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , las cuales son indicativas de la pureza de las muestras, ya que la primera se refiere a la concentración de proteínas y la segunda a la de carbohidratos. Se usó como blanco agua estéril.

5.5 Análisis de integridad de los concentrados de DNA.

Para el análisis de la integridad se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5% con amortiguador SB (Borato de Sodio) 1x (0.005 M) y teñido con 1 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL).

5.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación del gen *PRODH* se realizó empleando diluciones de DNA a 50 ng/ μ L. Las secuencias de cada par de oligonucleótidos utilizados se presentan en la Tabla 6. Los oligonucleótidos fueron analizados mediante la herramienta *Primer Blast*, con la finalidad de determinar que el producto amplificado correspondiera a la secuencia de interés. Además de que los valores de complementariedad tanto para sí mismo como para el extremo 3', fueran menores a cinco y así evitar que los oligonucleótidos formaran dímeros.

Tabla 6. Características de los oligonucleótidos utilizados en la PCR punto final.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb) del fragmento amplificado	Temperatura de fusión (Tm) ($^{\circ}$ C)
Intrón 2-F	GGAGGCCGAGATAGGAGTGT	697	64.5
Intrón 2-R	ATAGCCCCACAGCCTTACCC	697	64.5
Exón 5-F	ATGCTTGGAGCCCTCCTGA	352	62.3
Exón 5-R	GCCCCAGCTTAGTGTTACC	352	64.6
Exón 8-F	TGGTGGGGAGGAGGAGGTCA	428	66.6
Exón 8-R	CAGCCAGGACTGGGAGACGT	428	66.6
Exón 12-F	TCCCCACTGCCATTGCTCCT	412	64.5
Exón 12-R	CCTGCCCTGAGAAGACAGAG	412	64.5
Int13Ex14Ex15-F	GGTGTGCTGGCGGGTGCTAG	472	68.6
Int13Ex14Ex15-R	CTGGGATGGCAGGACAGGCTC	472	68.4

En las Tablas 7, 8 y 9 se presentan los reactivos utilizados y las condiciones para la amplificación del gen *PRODH*.

Tabla 7. Reactivos empleados en la PCR de punto final.

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)
<i>Master Mix</i>	2X	10.0
Oligonucleótido sentido	10 μM	0.5
Oligonucleótido antisentido	10 μM	0.5
Agua libre de DNAsas	-	8.0
DNA	50 ng/ μL	1.0
Volumen Final	-	20.0

Tabla 8. Las condiciones empleadas para la amplificación del exón 5, exón 8 y exón 12 de *PRODH*

Fase	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	95	180
Desnaturalización	95	15
Hibridación	64	15
Elongación	72	5
Elongación final	72	300
Conservación	4	∞

} 35 ciclos

Tabla 9. Condiciones empleadas para la amplificación del intrón 13, exón 14 y exón 15 de *PRODH*.

Fase	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	95	180
Desnaturalización	95	15
Hibridación	68	15
Elongación	72	5
Elongación final	72	300
Conservación	4	∞

} 35 ciclos

A continuación se describirá la metodología empleada para secuenciar los exones 5 y 12 de *PRODH*.

5.7 Resolución de los productos de PCR.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2.0% con amortiguador SB 1x a 100 V durante 1 h y fue teñido con bromuro de etidio.

5.8 Purificación de los productos de PCR.

La purificación de los productos de PCR, se realizó mediante el estuche comercial de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). La metodología que se siguió se describe a continuación:

1. Se adicionó un volumen igual de la solución de unión a membrana que el de la reacción de PCR al tubo de reacción y después se homogenizó.
2. Por otro lado se insertó una minicolumna SV en un tubo colector.
3. La mezcla del primer paso, se transfirió a la minicolumna SV y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
4. La minicolumna junto con el tubo colector se centrifugó a una velocidad de 16,000 g por 1 minuto. Después la solución que quedó en el tubo colector se desechó y la minicolumna se reinsertó en éste.
5. Se adicionó un volumen de 700 µL de la solución de lavado a la minicolumna SV. El tubo se centrifugó a una velocidad de 16,000 g por 1 minuto. Se desechó la solución que se depositó en el tubo colector y la minicolumna se reinsertó en éste.
6. El paso 5 se repitió pero se adicionaron 500 µL de solución de lavado.
7. Se descartó la solución que se depositó en el tubo colector y la minicolumna vacía se reinsertó en éste. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 16,000 g por 1 minuto.
8. Se transfirió la minicolumna a un tubo de 1.5 mL.
9. Se adicionó un volumen de 25 µL de agua libre de nucleasas. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Después se centrifugó a 16,000 rpm por 2 minutos.
10. El producto de PCR purificado se conservó a 4°C hasta su uso.

5.9 Resolución de los productos purificados de PCR.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2.0% con amortiguador SB 1x a 100 V durante 1 h y fue teñido con bromuro de etidio.

5.10 Reacción de secuenciación.

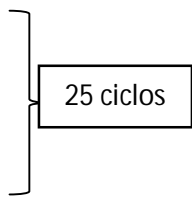
La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando el estuche comercial de secuenciación *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®)*. Los reactivos y los volúmenes empleados, así como las condiciones que se utilizaron para la reacción se resumen en las Tablas 10 y 11 que se muestran a continuación.

Tabla 10. Reactivos empleados en la reacción de secuenciación.

Reactivo	Volumen (µL)
<i>Big Dye Terminator V3.1 Cycle</i>	1.0
Oligonucleótido sentido o antisentido [10 µM]	1.0
Producto de PCR purificado	2.5
Agua libre de DNAsas	15.5
Volumen final	20.0

Tabla 11. Condiciones empleadas para la reacción de secuenciación.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	96	30
Desnaturalización	95	30
Hibridación	50	10
Elongación	60	240
Elongación final	72	60
Conservación	4	∞



5.11 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación.

Se realizó por medio de columnas de purificación *Centri-sep*, la metodología que se empleó se muestra a continuación:

1. Se hidrató la columna *Centri-Sep* con 800 µL de agua estéril. Se eliminaron las burbujas.
2. Las columnas se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4°C durante 2 horas.
3. Posteriormente se quitaron las tapas de la columna para drenar el líquido. La columna se insertó en un tubo colector. Se centrifugó a una velocidad de 3,000 rpm por 2 minutos.
4. Se descartó el líquido. La columna se insertó en un tubo de 1.5 mL.
5. El producto de la reacción de secuenciación se adicionó en el centro de la columna formada. Se centrifugó a una velocidad de 3,000 rpm durante 2 minutos.
6. El producto que resultó se secó al vacío.

5.12 Secuenciación Automatizada.

El producto seco purificado se resuspendió con 14 µL de formamida ultrapura y después se transfirió a una placa de 96 pozos. Se desnaturalizó a una temperatura de 95°C durante 5 minutos. El secuenciador utilizado fue *DNA AB3130 (Applied Biosystems®)*.

5.13 Análisis de las secuencias.

El análisis se realizó mediante el programa *Sequencing Analysis v5.3 (Applied Biosystems®)*, *Mutation Surveyor v.5.0.0 (Applied Biosystems Genetic Analyzers®)* y *Sequencher v.4.7 (Genecodes)*.

5.14 Polimorfismos de longitud variable de fragmentos de restricción (RFLP).

Los SNP de los exones 8 (rs137852934), 14 (rs450046), 15 (rs372055) e intrón 13 (rs385440) fueron interrogados mediante RFLP-PCR. En la Tabla 12 se enlistan las enzimas utilizadas, el sitio de reconocimiento, el tamaño de los fragmentos esperados con la digestión enzimática y el genotipo dado por cada corte.

Tabla 12. Genotipificación a través de PCR-RFLP.

SNP	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento	Tamaño de los fragmentos (pb)		
			Wt	Ht	Mut
rs137852934	<i>BsaBI</i>	<pre> 5'.. G A T N N N N N A T C ..3' 3'.. C T A N N N N N T A G ..5' ↓ ↑ </pre>	428	428, 283, 145	145, 283
rs385440	<i>BseNI</i>	<pre> 5'.. A C T G G N ..3' 3'.. T G A C C N ..5' ↑ ↓ </pre>	355, 77, 40	355, 77, 57, 40, 20	355, 57, 40, 20
rs450046	<i>NciI</i>	<pre> 5'.. C C S G G ..3' 3'.. G G S C C ..5' ↓ ↑ </pre> <p>S= G o C</p>	472	472, 333, 139	333, 139
rs372055	<i>PvuII</i>	<pre> 5'.. C A G C T G ..3' 3'.. G T C G A C ..5' ↓ ↑ </pre>	316, 79	316, 237, 156, 79	237, 156, 79

Wt: Silvestre. Ht: Heterocigoto. Mut: Mutado.

Tabla 13. Reactivos y volúmenes necesarios para efectuar la digestión.

Reactivos	Volumen (µL)
Agua	11.3
Amortiguador de digestión rápida	1.3
Producto de PCR	6.7
Enzima de digestión rápida	0.7
Total	20.0

Incubar a 37 ° C para *NciI* y *PvuII* y a 65 ° C, para *BsaBI* y *BseNI*, durante 15 minutos.

5.15 Resolución de RFLP

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% para los SNP rs137852934, rs450046 y rs372055. Para el polimorfismo rs385440 se preparó el gel de agarosa al 4%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio. Condiciones de la electroforesis: amortiguador SB 1x a 100 V durante 1 h.

Para facilitar la presentación de los resultados y debido al traslape de las características clínicas de los pacientes y a que el 64.36% del total de los casos padecen esquizofrenia, se englobarán todas las enfermedades psiquiátricas bajo estudio como casos o pacientes con esquizofrenia.

6. Resultados.

Se logró amplificar los productos de PCR de los exones 5, 8, 12, 14 y 15 e intrón 13 de *PRODH*, a partir de las condiciones especificadas en la metodología. Todas las muestras incluidas en el estudio pudieron genotificarse con éxito (101 controles y 101 pacientes con esquizofrenia) para las 15 variantes de *PRODH*. Se pudo establecer el equilibrio de Hardy-Weinberg y formar haplotipos.

A continuación se presentan ejemplos de la genotipificación de los controles sanos mestizo mexicanos y de los casos con esquizofrenia a través de PCR-RFLP (Figuras 5-8) y secuenciación tipo Sanger de los quince SNP de *PRODH*.

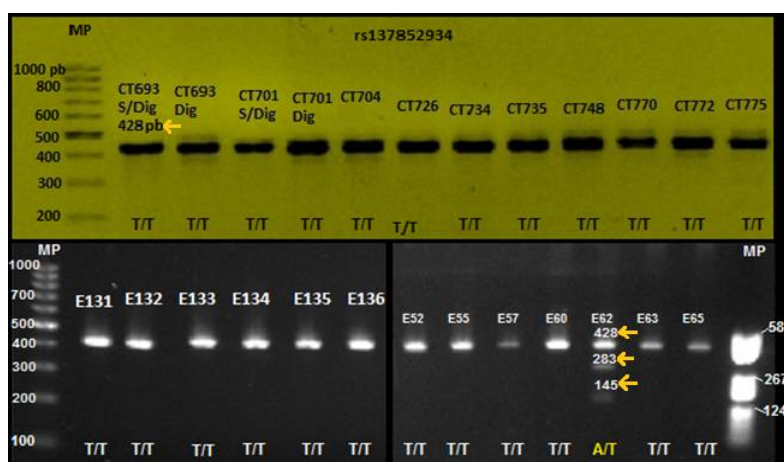


Figura 5. Genotipificación del SNP rs13785934 de *PRODH* en algunos controles (CT) y pacientes con esquizofrenia (E) mediante PCR-RFLP. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador SB. Las flechas amarillas indican el tamaño del producto de PCR digerido (Dig.) y sin digerir (S/Dig.) en pares de bases (pb). Se destaca en amarillo el genotipo heterocigoto A/T encontrado solo en la muestra E62. Marcador de peso molecular (MP), a la izquierda: *GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder* y a la derecha: *DNA molecular weight marker V (8-587 pb)*.

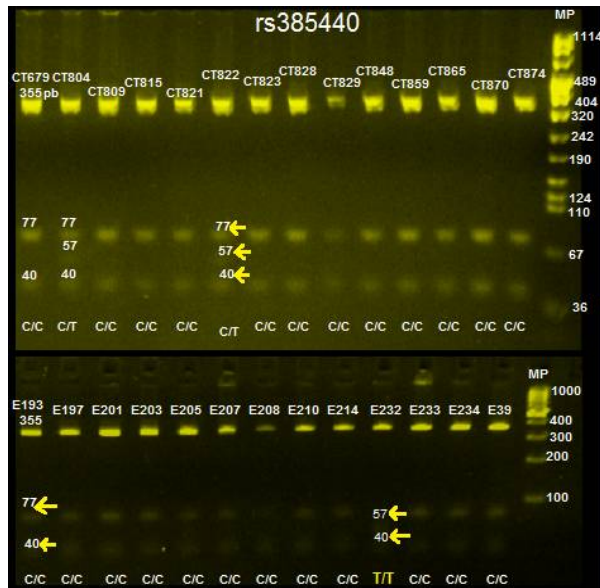


Figura 6. Genotipificación del SNP rs385440 de *PRODH* en algunos controles (CT) y pacientes con esquizofrenia (E) mediante PCR-RFLP. Electroforesis en gel de agarosa al 4% en amortiguador SB. Las flechas amarillas indican el tamaño del amplicón digerido en pares de bases (pb), correspondiente a los genotipos homocigoto silvestre C/C, heterocigoto C/T y homocigoto mutante T/T. Se destaca en amarillo el genotipo T/T presente únicamente en la muestra E232. Marcador de peso molecular (MP), en el panel superior: *DNA molecular weight marker VIII (19-1114 pb)* y en el panel inferior: *GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder*.

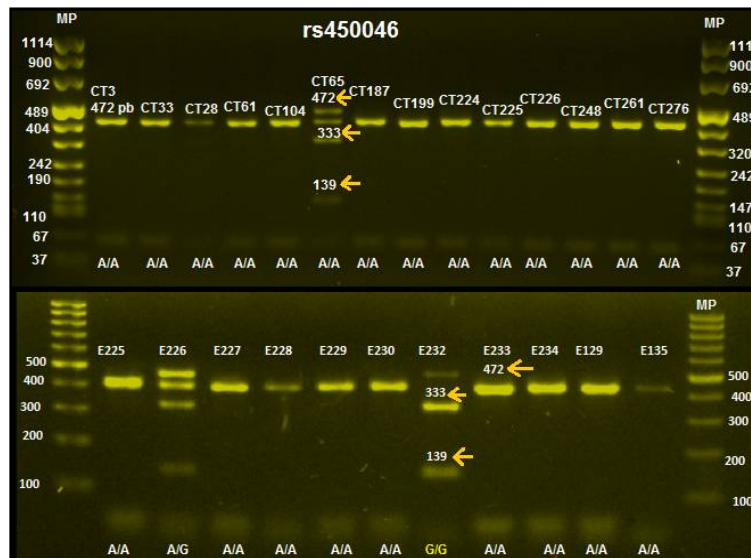


Figura 7. Genotipificación del SNP rs450046 de *PRODH* en algunos controles (CT) y pacientes con esquizofrenia (E) mediante PCR-RFLP. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador SB. Las flechas amarillas indican el tamaño del amplicón digerido en pares de bases (pb), correspondiente a los genotipos: homocigoto silvestre A/A, heterocigoto A/G y homocigoto mutante GG. Se destaca en amarillo el genotipo G/G encontrado solo en la muestra E232. Marcador de peso molecular (MP), en el panel superior: *DNA molecular weight marker VIII (19-1114 pb)* y en el panel inferior: *GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder*.

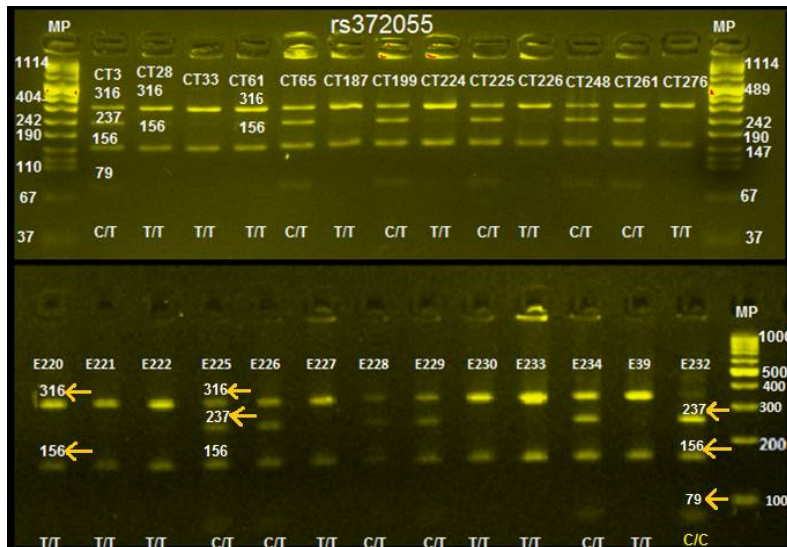


Figura 8. Genotipificación del SNP rs372055 de *PRODH* en algunos controles (CT) y pacientes con esquizofrenia (E) mediante PCR-RFLP. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador SB. Las flechas amarillas indican el tamaño del amplicón digerido en pares de bases (pb), correspondiente a los genotipos homocigoto silvestre C/C, heterocigoto C/T y homocigoto mutante T/T. Se destaca en amarillo el genotipo C/C encontrado solo en la muestra E232. Marcador de peso molecular (MP), en el panel superior: *DNA molecular weight marker VIII (19-1114 pb)* y en el panel inferior: *GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder*.

Un 2% de los resultados de genotipificación obtenidos mediante PCR-RFLP, se validaron mediante la secuenciación tipo Sanger en controles y en un paciente con esquizofrenia (E232) (Anexo V).

En las Figuras 9-10 se muestran electroferogramas parciales de los SNP rs4819756 y rs11913840 ubicados en el exón 5 de *PRODH*. Se presenta el genotipo hallado en casos con esquizofrenia.

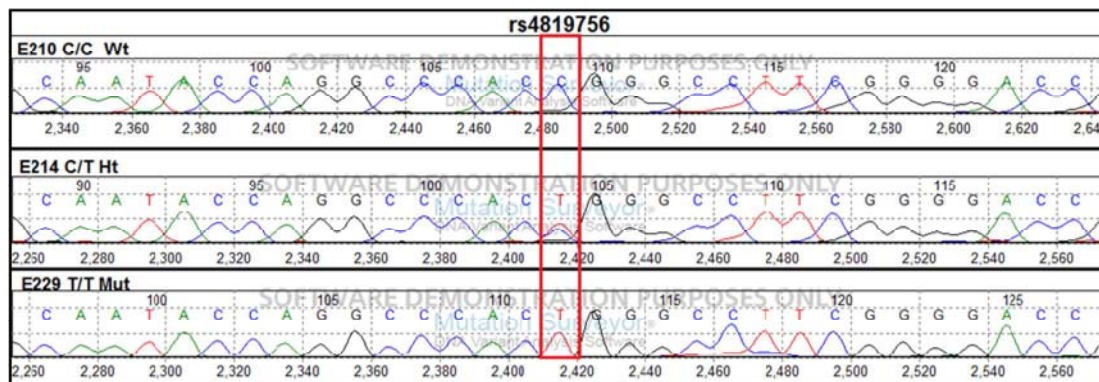


Figura 9. Electroferograma parcial de la variante rs4819756 de *PRODH* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E226 con genotipo homocigoto silvestre C/C, en el segundo la muestra E214

exhibe el genotipo heterocigoto C/T y en el tercero, E228 muestra el genotipo homocigoto mutante T/T. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

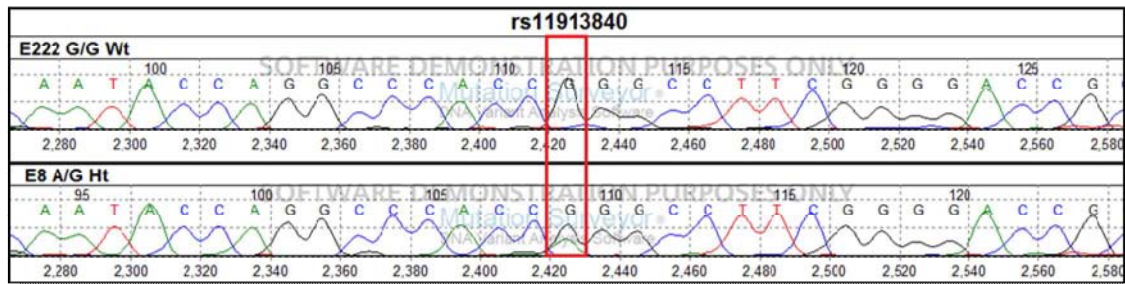


Figura 10. Electroferograma parcial de la variante rs11913840 de *PRODH* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E226 con genotipo homocigoto silvestre C/C, en el segundo la muestra E214 exhibe el genotipo heterocigoto C/T y en el tercero, E228 muestra el genotipo homocigoto mutante T/T. En la población bajo estudio no se observaron homocigotos mutantes para esta variante. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

A continuación se muestran electroferogramas parciales de nueve SNP localizados en el exón 12 de *PRODH*. Se presentan los genotipo encontrados en pacientes con esquizofrenia, excepto para la variante rs2904551 que se muestra sólo en controles, ya que únicamente dos de ellos exhibieron genotipo heterocigoto C/T y en pacientes con esquizofrenia no se presentó este genotipo.

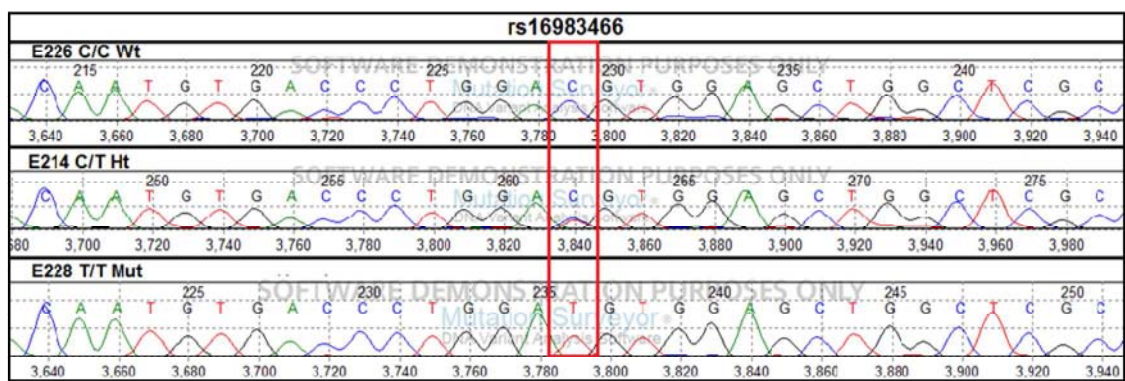


Figura 11. Electroferograma parcial de la variante rs16983466 de *PRODH* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E226 con genotipo homocigoto silvestre C/C, en el segundo la muestra E214 exhibe el genotipo heterocigoto C/T y en el tercero, E228 muestra el genotipo homocigoto mutante T/T. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

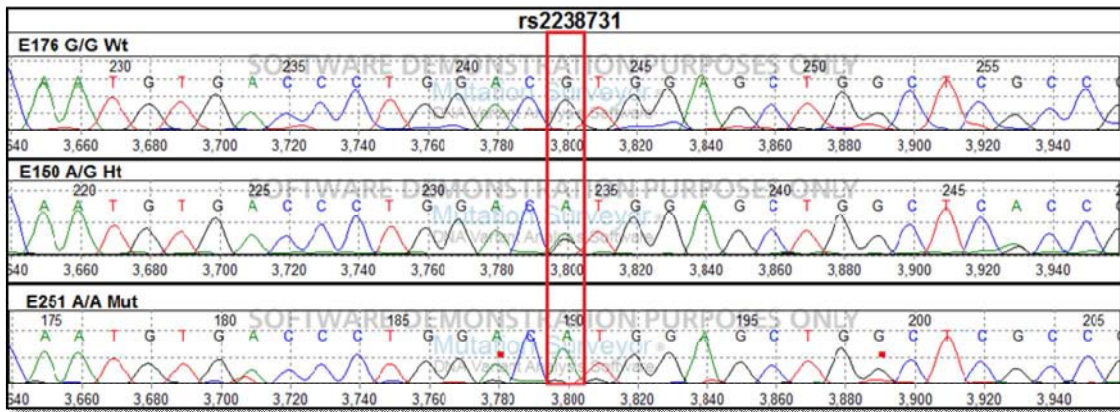


Figura 12. Electroferograma parcial de la variante rs16983466 de *PRODH* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E176 con genotipo homocigoto silvestre G/G, en el segundo la muestra E150 exhibe el genotipo heterocigoto A/G y en el tercero, E251 muestra el genotipo homocigoto mutante A/A. Ésta última fue la única muestra de la población bajo estudio que presentó genotipo mutante. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

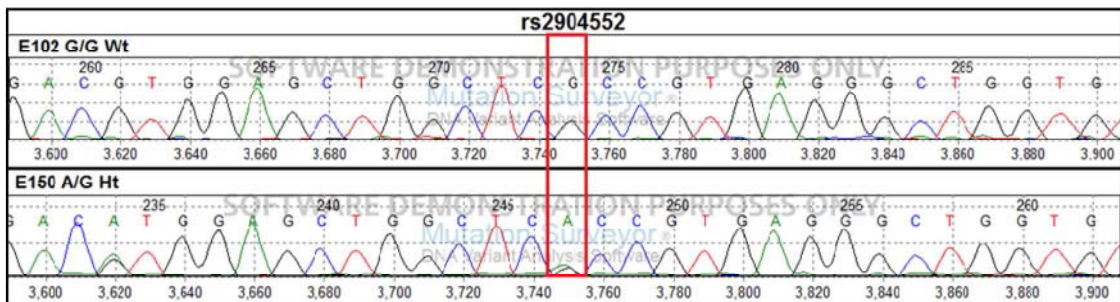


Figura 13. Electroferograma parcial de la variante rs2904552 de *PRODH* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E102 con genotipo homocigoto silvestre G/G y en el segundo, la muestra E150 exhibe el genotipo heterocigoto A/G. En la población bajo estudio no se observaron homocigotos mutantes para esta variante. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

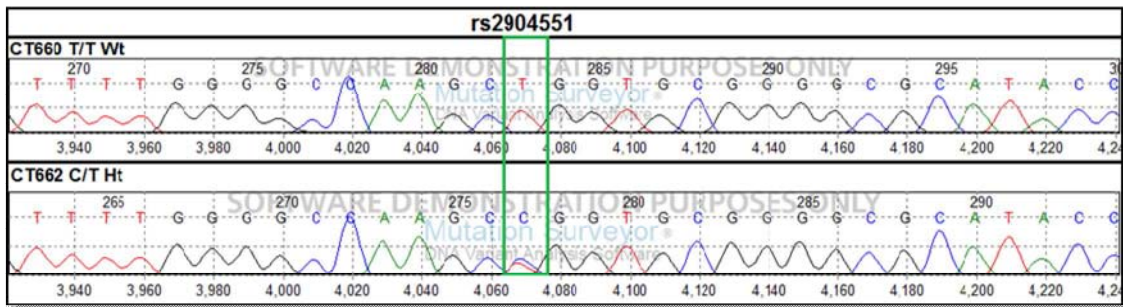


Figura 14. Electroferograma parcial de la variante rs290451 de *PRODHD* en controles (CT). En el primer panel se presenta la muestra CT660 con genotipo homocigoto silvestre T/T y en el segundo, la muestra CT662 exhibe el genotipo heterocigoto C/T. En la población bajo estudio no se observaron homocigotos mutantes para esta variante. Los pacientes con esquizofrenia solo presentaron el genotipo silvestre. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

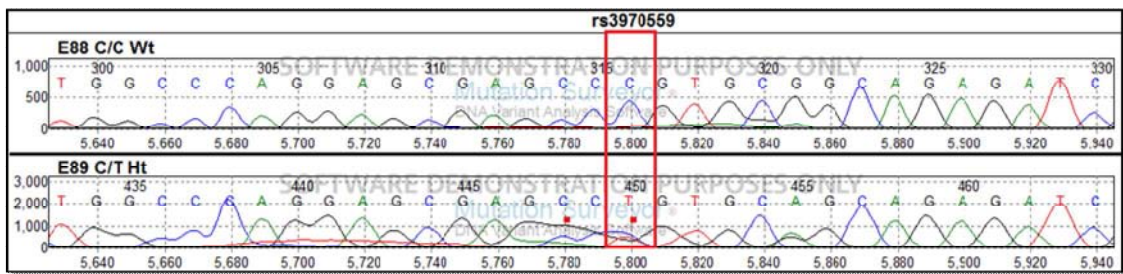


Figura 15. Electroferograma parcial de la variante rs2870984 de *PRODHD* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E88 con genotipo homocigoto silvestre C/C y en el segundo, la muestra E89 exhibe el genotipo heterocigoto C/T. En la población bajo estudio no se observaron homocigotos mutantes para esta variante. En la población bajo estudio no se observaron homocigotos mutantes para esta variante. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

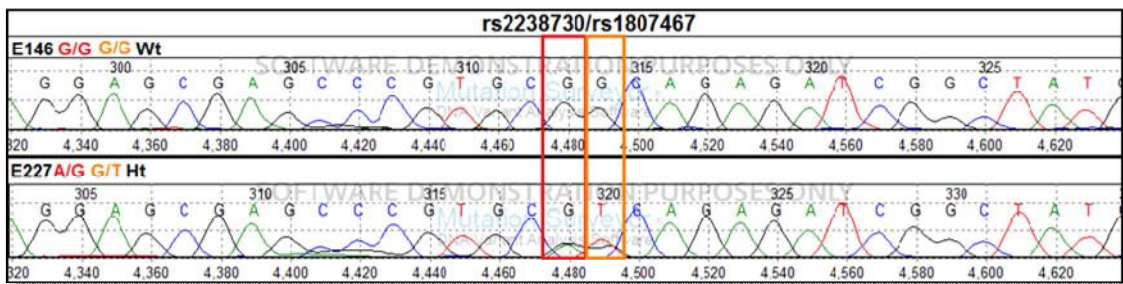


Figura 16. Electroferograma parcial de las variantes rs2238730 y rs1807467 de *PRODHD* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E146 con genotipo homocigoto silvestre G/G para ambos polimorfismos. En el segundo panel, la muestra muestra E227 exhibe el genotipo heterocigoto A/G para rs2238730 y G/T para rs1807467. En la población bajo estudio no se observaron homocigotos mutantes para esta variante. Se remarca con un rectángulo rojo la ubicación de rs2238730 y con uno naranja, rs1807467.

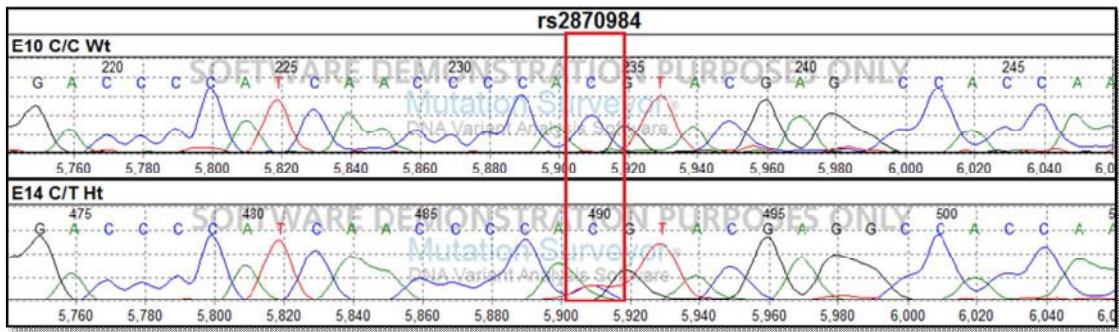


Figura 17. Electroferograma parcial de la variante rs16983466 de *PRODH* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E10 con genotipo homocigoto silvestre C/C, en el segundo la muestra E14 exhibe el genotipo heterocigoto C/T. Se r marca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

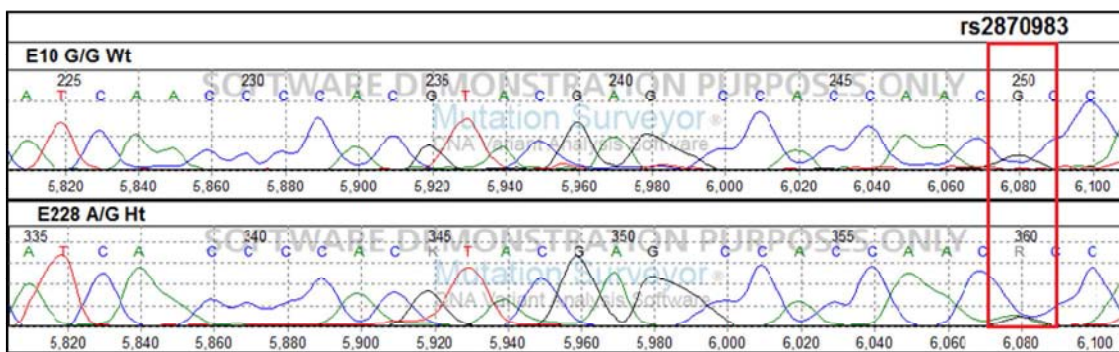


Figura 18. Electroferograma parcial de la variante rs2870983 de *PRODH* en pacientes con esquizofrenia (E). En el primer panel se presenta la muestra E10 con genotipo homocigoto silvestre G/G y en el segundo, la muestra E228 exhibe el genotipo heterocigoto A/G. En la población bajo estudio no se observaron homocigotos mutantes para esta variante. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

En las Tablas 14-17 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas para cada SNP de *PRODH* analizado en controles y casos con esquizofrenia. Además se presentan las frecuencias encontradas en bases de datos públicas para la población con ancestría mexicana (MXL) residente en Los Ángeles. Las frecuencias de las bases de datos públicas fueron tomadas de *National Center for Biotechnology Information* (N=100) y Ensembl (N=64). Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) mediante la prueba de Chi cuadrada (X^2) y el valor de p fue mayor a 0.05 para las quince variantes estudiadas, por lo tanto, se encontraron dentro del EHW.

Adicionalmente, se calculó el modelo de asociación genética para cada una de las variantes a través del programa en línea <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>, consultado el 6 de septiembre del 2015. Las variantes rs16983466 y rs372055 siguieron el modelo dominante al presentar un valor de $p \leq 0.05$ (Tabla 14-17). Los demás polimorfismos no se ajustaron a ningún modelo.

Debido a que *PRODH* se encuentra en la cadena antisentido del autosoma 22 para compararlo con lo reportado se realizó la inversión del genotipo de cada SNP a la hebra sentido como se documenta en las bases públicas.

Tabla 14. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes de *PRODH* en controles, casos con esquizofrenia y bases públicas.

Grupo	Frecuencias genotípicas (%)			Frecuencias alélicas (%)		p_{dom}
	GG	AG	AA	G	A	
rs4819756 (R185W)						
CT	37.62	47.52	14.85	61.00	39.00	0.2336
E	29.70	51.50	18.81	55.00	45.00	
Bases públicas	40.00	48.00	12.00	64.00	36.00	
rs11913840 (R185Q)						
CT	96.04	3.96	0.00	98.00	2.00	0.7330
E	95.05	4.95	0.00	98.00	2.00	
Bases públicas	93.80	6.20	0.00	96.90	3.10	

CT: controles sanos mestizo mexicanos. E: pacientes con esquizofrenia.

p_{dom} : valor de p del modelo dominante.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes de *PRODH* en controles, casos con esquizofrenia y bases públicas. (Continuación)

Grupo	Frecuencias genotípicas (%)			Frecuencias alélicas (%)		p_{dom}	RM (IC 95%)
	AA	AT	TT	A	T		
rs137852934 (L289M)							
CT	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.3161	
E	99.00	1.00	0.00	99.50	0.50		
Bases públicas	98.40	1.60	0.00	99.20	0.80		
rs16983466 (D426N)	GG	AG	AA	G	A		
CT	54.46	39.60	5.94	74.26	25.74	0.0201	0.505 (0.283-0.902)
E	70.30	24.75	4.95	83.00	17.00		
Bases públicas	75.00	25.00	0.00	87.50	12.50		
rs2238731 (V427M)	CC	CT	TT	C	T		
CT	76.24	23.76	0.00	88.00	12.00	0.4947	
E	80.20	18.81	0.99	90.00	10.00		
Bases públicas	79.70	20.30	0.00	89.80	10.20		
rs2904552 (R431H)	CC	CT	TT	C	T		
CT	86.14	13.86	0.00	93.00	7.00	0.1751	
E	92.08	7.92	0.00	96.00	4.00		
Bases públicas	89.00	9.40	1.60	93.80	6.20		
rs2904551 (L441P)	AA	AG	GG	A	G		
CT	98.02	1.98	0.00	99.00	1.00	0.1552	
E	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00		
Bases públicas	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00		

CT: controles sanos mestizo mexicanos. E: pacientes con esquizofrenia.

p_{dom} : valor de p del modelo dominante. RM: razón de momios.

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes de *PRODH* en controles, casos con esquizofrenia y bases públicas. (Continuación)

Grupo	Frecuencias genotípicas (%)			Frecuencias alélicas (%)		p_{dom}
	GG	AG	AA	G	A	
rs3970559 (R453C)						
CT	95.05	4.95	0.00	98.00	2.00	0.248
E	98.02	1.98	0.00	99.00	1.00	
Bases públicas	98.40	1.60	0.00	99.20	0.80	
rs2238730 (A454A)	CC	CT	TT	C	T	
CT	96.04	3.96	0.00	98.00	2.00	0.5164
E	94.06	5.94	0.00	97.00	3.00	
Bases públicas	98.40	1.60	0.00	99.20	0.80	
rs1807467 (A455S)	CC	AC	AA	C	A	
CT	99.01	0.99	0.00	99.50	0.50	1.0000
E	99.00	1.00	0.00	99.50	0.50	
Bases públicas	99.90*	0.10*	0.00*	99.90	0.10	
rs2870984 (T466M)	GG	AG	AA	G	A	
CT	95.05	4.95	0.00	98.00	2.00	0.0973
E	99.00	1.00	0.00	99.50	0.50	
Bases públicas	99.80*	0.20*	0.00*	99.50	0.50	
rs2870983 (A472T)	CC	CT	TT	C	T	
CT	95.05	4.95	0.00	98.00	2.00	0.4705
E	97.03	2.97	0.00	99.00	1.00	
Bases públicas	87.50	12.50	0.00	93.80	6.20	
rs385440 (SNP etiqueta)	GG	AG	AA	G	A	
CT	95.05	4.95	0.00	98.00	2.00	0.3895
E	92.08	6.93	0.99	96.00	4.00	
Bases públicas	85.90	14.10	0.00	93.00	7.00	

*Frecuencias tomadas de población caucásica, ya que no existen reportes en población MXL. CT: controles sanos mestizo mexicanos. E: pacientes con esquizofrenia. p_{dom} : valor de p del modelo dominante.

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes de *PRODH* en controles, casos con esquizofrenia y bases públicas. (Continuación)

Grupo	Frecuencias genotípicas (%)			Frecuencias alélicas (%)		p_{dom}	RM (IC 95%)
	TT	CT	CC	T	C		
rs450046 (Q521R)							
CT	93.07	6.93	0.00	97.03	2.97	0.7883	
E	92.08	6.93	0.99	96.00	4.00		
Bases públicas	89.10	10.90	0.00	94.50	5.50		
rs372055 (L581L)	AA	AG	GG	A	G		
CT	43.56	50.50	5.94	67.48	32.52	0.0348	0.550
E	58.42	35.64	5.94	76.00	24.00		(0.315-0.960)
Bases públicas	68.80	26.60	4.70	82.00	18.00		

CT: controles sanos mestizo mexicanos. E: pacientes con esquizofrenia.

p_{dom} : valor de p del modelo dominante. RM: Razón de momios.

Se calculó el valor de p, mediante una tabla de 2x2 en el programa Epi Info™ v.7.1.5, entre las frecuencias alélicas de CT vs bases públicas en la Tabla 18. En esta tabla sólo se incluyeron los resultados estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$).

Tabla 18. Comparación de las frecuencias alélicas entre controles y bases de datos públicas.

CT vs base pública	p
rs16983466	0.0058
rs372055	0.0053

A continuación se presenta la comparación de las frecuencias alélicas de los SNP rs450046, rs16983466 y rs372055 en diferentes poblaciones.

Las frecuencias alélicas de las poblaciones fueron tomadas de bases públicas (Ensembl, consultado el 21 de agosto del 2015). El valor de p fue calculado a través del programa Epi Info™ v.7.1.5. Se indica con negritas el valor de $p \leq 0.05$.

Tabla 19. Comparación de frecuencias alélicas de rs450046 en diferentes poblaciones.

Población	Frecuencias alélicas (%)		p
	C	T	
CT	97.03	2.97	
Mexicanos residentes en Los Ángeles	94.53	5.47	0.3973
Españoles	94.39	5.61	0.2801
Colombianos	96.81	3.19	0.8674
Japoneses	97.12	2.88	0.9590
Africanos residentes en Estados Unidos	78.69	21.31	2.349x10⁻⁷

CT: controles sanos mestizo mexicanos analizados en este estudio.

Tabla 20. Comparación de frecuencias alélicas de rs16983466 en diferentes poblaciones.

Población	Frecuencias alélicas		p
	G	A	
CT	74.26	25.74	
Mexicanos residentes en Los Ángeles	87.50	12.50	0.0058
Españoles	83.18	16.82	0.0352
Colombianos	82.98	17.02	0.0011
Japoneses	88.46	11.54	0.0004
Africanos residentes en Estados Unidos	78.69	21.31	0.4414

CT: controles sanos mestizo mexicanos analizados en este estudio.

Tabla 21. Comparación de frecuencias alélicas de rs372055 en diferentes poblaciones.

Población	Frecuencias alélicas		p
	G	A	
CT	67.48	32.52	
Mexicanos residentes en Los Ángeles	82.03	17.97	0.0053
Españoles	79.44	20.51	0.0076
Colombianos	81.38	18.62	0.0017
Japoneses	81.25	18.75	0.0013
Africanos residentes en Estados Unidos	61.48	38.52	0.2708

CT: controles sanos mestizo mexicanos analizados en este estudio.

Con base a Taliun y colaboradores se tomaron los valores de desequilibrio de ligamiento (D') para formar haplotipos como se enlista a continuación:

$D' = 100$, desequilibrio de ligamiento completo entre los SNP (rojo oscuro).

$D' > 60$, alto desequilibrio de ligamiento (rojo).

$D' < 60$, bajo desequilibrio de ligamiento (colores rosa y blanco).

$D' = 0$, no presentan desequilibrio de ligamiento, los dos marcadores son independientes (color azul) (Taliun *et al.*, 2014).

De manera que se consideraron como haplotipos, aquellos grupos de SNP cuyo valor de D' fuera mayor a 60.

Se presentan los mapas de desequilibrio de ligamiento obtenidos a través del programa Haploview v.4.2 para los quince SNP, tanto en controles (Figura 19) como en casos con esquizofrenia (Figura 20), así como las frecuencias haplotípicas (Tabla 21).

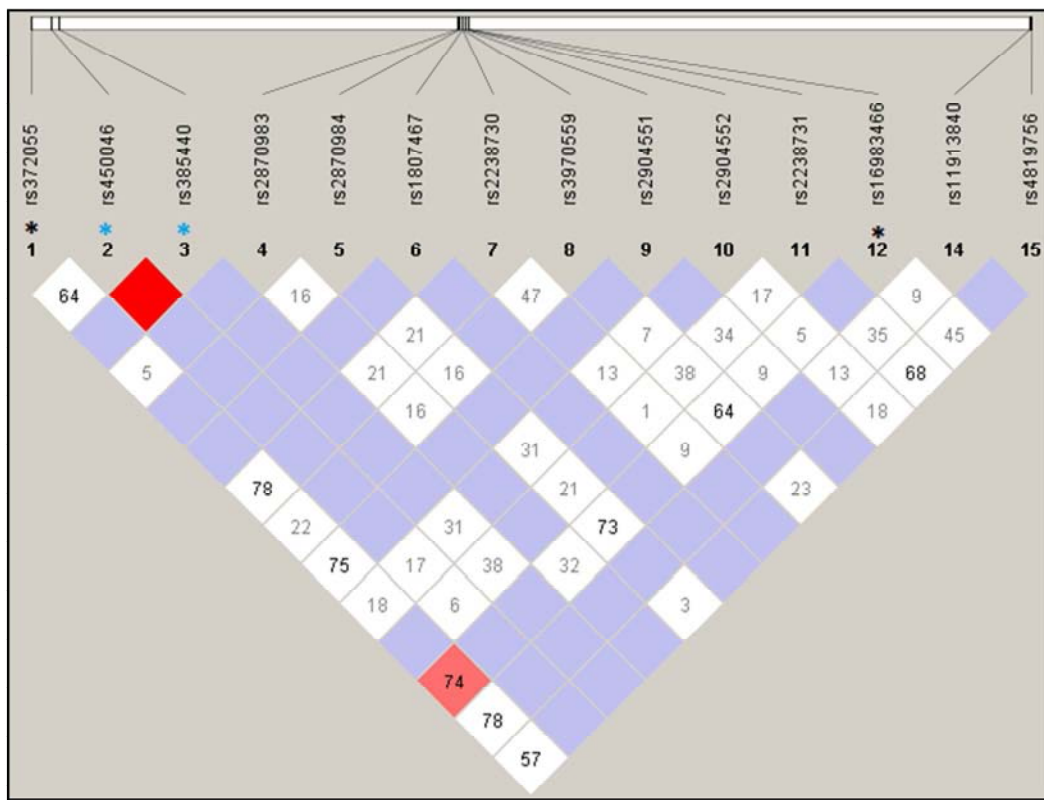


Figura 19. Prueba de desequilibrio de ligamiento (D') de las quince variantes en controles y sus haplotipos del gen *PROD*H. Los números dentro de los rombos son valores D' para los respectivos pares de SNP. Los asteriscos en color azul denotan el diplotipo formado por rs450046/rs385440 y en color negro el diplotipo, rs372055/rs16983466. En color rojo se muestran los polimorfismos con mayor desequilibrio de ligamiento.

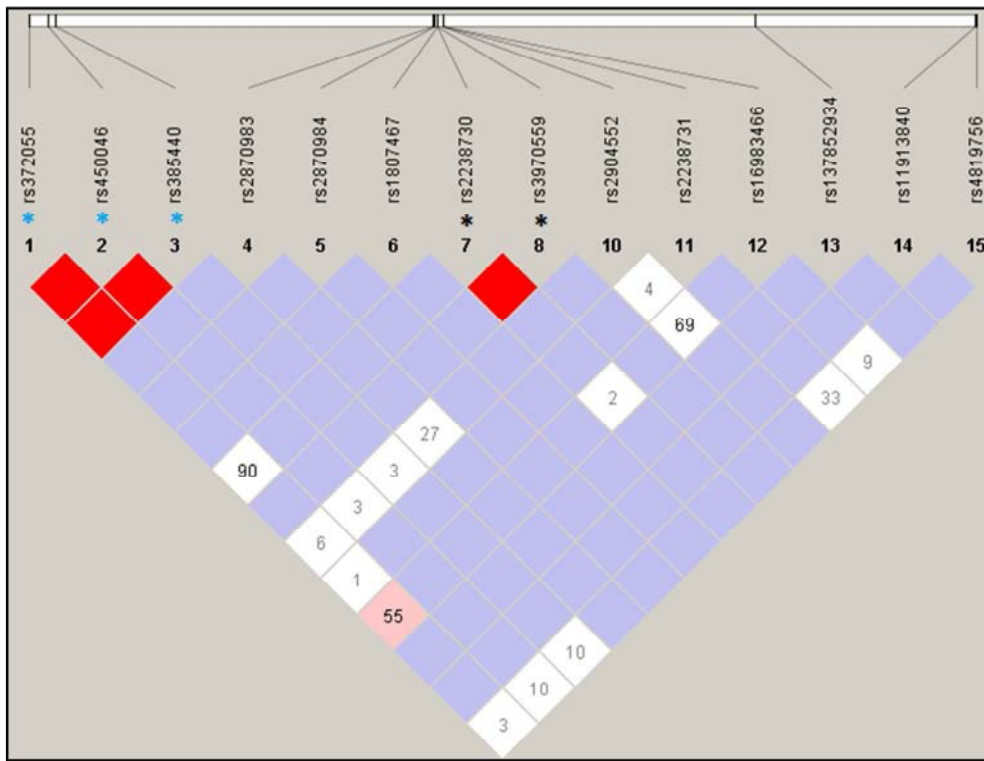


Figura 20. Prueba de desequilibrio de ligamiento de las quince variantes en casos con esquizofrenia y sus haplotipos del gen *PRODH*. Los asteriscos en color azul denotan el triplotipo formado por rs372055/rs450046/rs385440 y en color negro el diplotipo, rs2238730/rs3970559.

Tabla 22. Frecuencias de los haplotipos encontrados en controles y pacientes con esquizofrenia.

CT		E	
Haplotipo	Frecuencias haplotípicas	Haplotipo	Frecuencias haplotípicas
rs4550046/rs385440		rs2238730/rs3970559	
TG	0.965	CG	0.969
CA	0.025	TG	0.02
rs372055/rs16983466		rs372055/rs450046/ rs385440	
AG	0.644	ATG	0.765
GA	0.213	GTG	0.189
GG	0.099	GCA	0.046
AA	0.045		

CT: controles. E: pacientes con esquizofrenia.

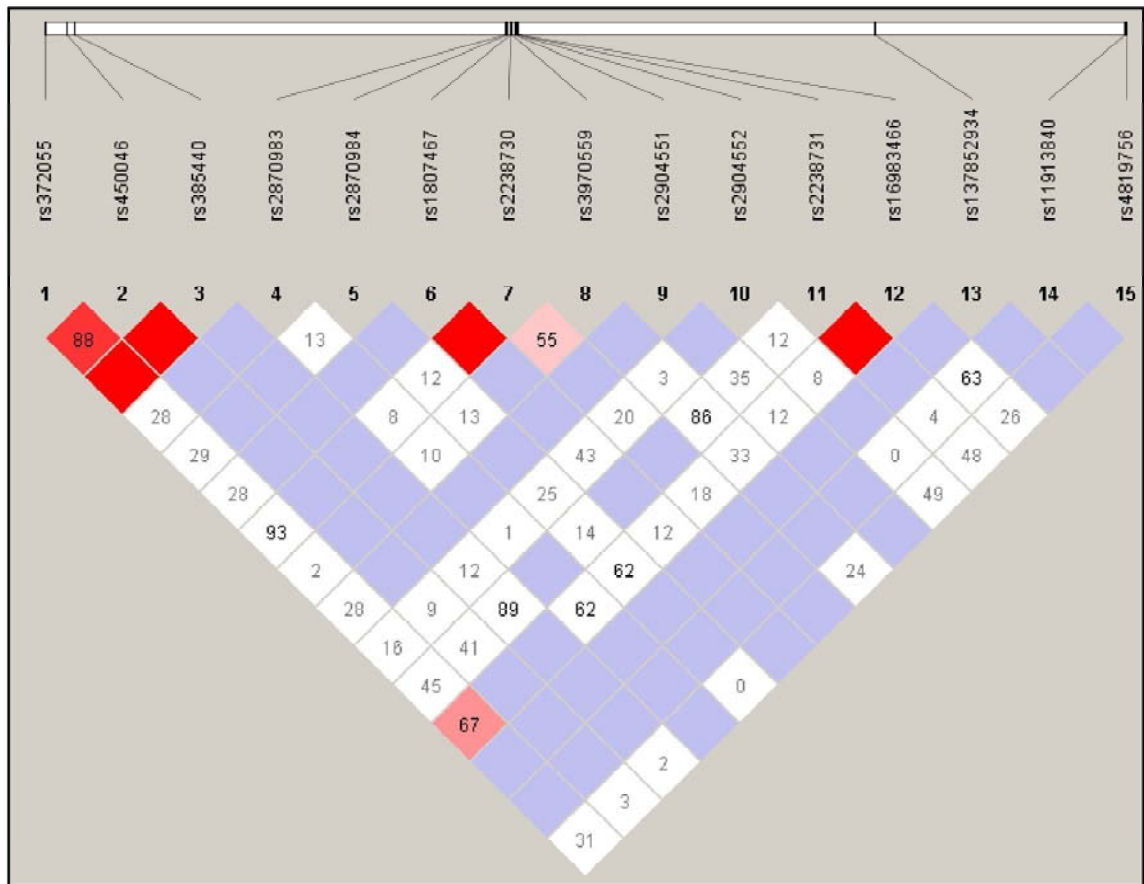


Figura 21. Mapa de desequilibrio de ligamiento en donde se superponen los haplotipos encontrados en controles y en casos con esquizofrenia.

En la Tabla 23 se presenta la asociación de cada haplotipo realizada a través del programa Haploview v.4.2. considerando las frecuencias alélicas.

Se resalta en negritas los valores de p significativos. El valor de RM fue obtenido por medio del programa Epi Info™ v.7.1.5.

Tabla 23. Asociación con esquizofrenia de cada haplotipo.

Haplotipo	Total	Proporción Caso, Control	X ²	p	RM (IC 95%)
rs2238731/rs16983466					
CG	0.673	0.724, 0.624	4.589	0.0322	1.58 (1.04-2.42)
CA	0.214	0.168, 0.257	4.698	0.0302	0.58 (0.35-0.94)
TG	0.113	0.107, 0.119	0.135	0.7132	
rs372055/rs16983466					
AG	0.675	0.710, 0.641	2.195	0.1385	
GA	0.162	0.113, 0.210	6.836	0.0089	0.56 (0.33-0.96)
GG	0.111	0.121, 0.102	0.381	0.5369	
AA	0.051	0.055, 0.047	0.119	0.7304	
rs450046/rs385440					
TG	0.960	0.954, 0.965	0.327	0.5673	
CA	0.035	0.046, 0.025	1.313	0.2518	
rs372055/rs450046/ rs385440					
ATG	0.722	0.765, 0.681	3.547	0.0597	
GTG	0.237	0.189, 0.285	5.045	0.0247	0.59 (0.37-0.94)
GCA	0.035	0.046, 0.025	1.313	0.2518	
rs1807467/rs2238730					
CC	0.975	0.969, 0.980	0.475	0.4909	
CT	0.02	0.026, 0.015	0.574	0.4488	

RM: razón de momios. Se consideró el valor de $p \leq 0.05$ para el cálculo de RM.

En las Tablas 24 y 25 se enlistan síntomas positivos, negativos y cognitivos de diez casos, los antecedentes heredo-familiares, la presencia de agresividad y convulsiones, así como las escalas psiquiátricas a las que fueron evaluados desde su ingreso al INNNMVS. En la columna “Haplotipo rs2238731/rs16983466” se refiere al haplotipo de riesgo (CG) y/o de protección (CA), que son portadores los pacientes.

Así mismo se mencionan a continuación, otras características clínicas de los pacientes muestreados:

El caso E175 presenta hipertrofia ventricular derecha, estenosis pulmonar, nariz bulbosa o bífida, puente nasal prominente y pabellones displásicos. El paciente E216 se refiere con múltiples malformaciones, estrabismo, paladar hendido y se diagnosticó como probable síndrome velocardiofacial.

El paciente E188 tiene como antecedentes heredo-familiares un hermano con diagnóstico de esquizofrenia y dos hermanos con enfermedad mental no especificada. Le realizaron una resonancia magnética de cráneo, encontrando una disminución del volumen subcortical de predominio infratentorial.

El caso E208 portador del haplotipo de protección CA y de riesgo CG, en el año 2000 presenta alucinaciones visuales, agitación psicomotriz, lenguaje incongruente, ideas delirantes de daño y referencia. Tiene como antecedente heredo-familiar una prima con epilepsia. En la escala BPRS obtuvo un puntaje de 23. Sin embargo, en el 2011 fue valorado nuevamente y obtuvo un puntaje para la misma escala de 3 (Tabla 24). Así mismo, para esa misma fecha se describió en el expediente clínico que su discurso era lógico, coherente y congruente, permanecía alerta, poseía memoria sin déficit, pero era introvertido, ansioso, tenso y con pobre autoestima.

E228 solo es portador del haplotipo de protección CA y no presenta el haplotipo de riesgo. Padece epilepsia criptogénica del lóbulo frontal. Es estudiante de licenciatura en nutrición y no presenta alucinaciones.

El caso E229 tiene un hermano gemelo que presenta mismo diagnóstico y evolución, pero con alucinaciones. E229 presenta agresividad verbal y según MMS posee un deterioro cognitivo moderado.

El paciente E230 es portador del haplotipo de riesgo. Tiene como antecedentes heredo-familiares dos tías abuelas paternas con diagnóstico de esquizofrenia, una tía paterna con tratamiento psiquiátrico no especificado y padre con dependencia etílica. Se le realizó una imagen de resonancia magnética y se encontraron lesiones de carácter desmielinizante en el lóbulo parietal derecho.

El caso E232 es portador del haplotipo de riesgo y presentó 3 mutaciones en *PRODH* (Tabla 24). Padeció el Síndrome de West en la infancia, el cual es una forma grave de epilepsia que por lo general afecta a los niños menores de 2 años de edad (Wheless *et al.*, 2012). No ha tenido nuevas crisis epilépticas. Tiene como antecedentes heredo-familiares: abuela paterna con esquizofrenia, abuela materna con síndrome demencial y tío materno con tumoración cerebral.

E251 presentó una mutación en el gen *PRODH*, la cual se muestra en la Tabla 25. Citando el expediente clínico, el paciente E251 al momento de su ingreso manifestaba “agresividad extrema” hacia sus familiares y vecindario, por lo que fue necesaria su hospitalización. Se consideró como un padecimiento psiquiátrico grave, afecto restringido, juicio disminuido, con abuso de sustancias (alcohol y cannabis) y dependencia grave hacia nicotina. Después del tratamiento manifiesta leve aplanamiento afectivo, retraimiento emocional y poca fluidez en la conversación. Fue evaluado mediante la escala psiquiátrica PANSS obteniendo 9 puntos en síntomas positivos, 26 en síntomas negativos y 31 en psicopatología general.

Tabla 24. Características clínicas y genóticas de algunos casos con esquizofrenia.

Px.	Dx.	Síntomas y otras características	AHF	Agr.	Conv	Escalas psiquiátricas		Haplotipo rs2238731/rs16983466	Mutaciones en <i>PRODH</i>	del22q11.2 *
						MMS	BPRS			
E188	E	Alucinaciones auditivas y visuales, ideas delirantes de daño, hiperreligiosidad, ideas de grandiosidad, funciones ejecutivas disminuidas. Miedo.	Sí	No	No	19/30	28	CG, CG	No	No
E230	E	Alucinaciones visuales y auditivas, ideas delirantes de referencia y daño, soliloquios, anhedonia, aislamiento, irritabilidad, retraso psicomotor.	Sí	Sí	No	-	23	CG,CG	No	No
E232	E	Pensamiento místico-religioso, alucinaciones, soliloquios, repetición de frases, irritabilidad, conducta obsesiva, poca tolerancia a la frustración y dificultad para sociabilizar.	Sí	No	Sí	-	20	CG,CG	**c.1203-51T>C +Q521R +L581L	No
E208	E	Alucinaciones visuales, agitación motriz, lenguaje incongruente, ideas delirantes de daño y de referencia. Después del tx: discurso lógico, congruente, memoria sin déficit, introvertido, pobre autoestima y ansiedad.	Sí	No	No	-	9	CG,CA	No	No
E228	TE+TDM	Depresión, ansiedad, ideas obsesivas de contaminación con presencia de actos compulsivos secundarios. Anergia, anhedonia, anorexia y desnutrición.	No	No	Sí	24/30	7	CA, CA	No	No

Px: Paciente. Dx: Diagnóstico. AHF: Antecedentes heredo-familiares. Agr.: Agresividad. Conv: convulsiones E: Esquizofrenia. TB: Trastorno bipolar. TE: Trastorno esquizoafectivo. TDM: Trastorno depresivo mayor. Tx.: tratamiento.*Trabajo previo del INNNMVS. **NM_001195226.1.

Tabla 25. Características clínicas y genóticas de algunos casos con esquizofrenia. (Continuación)

Px.	Dx.	Síntomas y otras características	AHF	Agr.	Conv.	Escala psiquiátrica		Haplotipo rs2238731/rs16983466	Mutaciones en <i>PRODH</i>	del22q11.2 *
						MMS	BPRS			
E229	TB	Conducta hipersexual, hiperreligiosidad, manía aguda, hiperfagia, labilidad emocional, fatiga, mutismo, abulia, irritabilidad.	Sí	Sí	No	19/30	3	CG, CA	No	No
E175	E	Retraso mental y psicomotriz, ideas delirantes de daño y referencia, errores de juicio y conducta, desorientación, alucinaciones visuales y auditivas, anhedonia, soliloquios, irritabilidad, ansiedad.	No	No	No	18/30	-	del, CG	No	Sí 7/10**
E216	E+ TDM	Ideas de minusvalía e ideas de muerte con alucinaciones auditivas, conducta autolesiva, embotamiento, desorganización.	No	No	No	-	25	del, CG	No	Sí 8/10**
E62	E	Aislamiento, pérdida de la personalidad	-	-	-	-	-	CG, CG	L289M	No
E251	E	Alucinaciones auditivas y visuales, ideas delirantes de persecución, aislamiento, retraimiento emocional, juicio disminuido. Abuso de sustancias.	No	Sí	No	24/30	-	TG, TG	V427M	No

Px: Paciente. Dx: Diagnóstico. AHF: Antecedentes heredo-familiares. Agr.: Agresividad. Conv: convulsiones. E: Esquizofrenia. TB: Trastorno bipolar. TE: Trastorno esquizoafectivo. TDM: Trastorno depresivo mayor. *Trabajo previo del INNNMVS. **Genes deletados: 7/10 (*PRODH, TUPLE, COMT, ZNF74, PIK4CA, LZTR1* y *CAT4*), 8/10 (*PRODH, TUPLE, COMT, ZNF74, PIK4CA, LZTR1, CAT4, D22S936*).

En la Tabla 26 se muestra la distribución porcentual de los pacientes por patología de acuerdo al genotipo de los SNP rs2238731 y rs16983466. El cálculo se realizó considerando el número total de pacientes por patología (N).

Tabla 26. Distribución de los pacientes por patología de acuerdo al genotipo presentado para las variantes rs2238731/rs16983466.

SNP		Patología				
rs2238731	rs16983466	E% N=65	TB% N=27	TE% N=6	del22q11% N=2	THDA% N=1
CC	GG	32.00	17.00	4.00	2.00	0.00
CC	AG	16.00	4.00	0.00	0.00	1.00*
CC	AA	3.00	1.00	1.00	0.00	0.00
CT	GG	15.38	14.81	16.67	0.00	0.00
CT	AG	4.62	3.70	0.00	0.00	0.00
TT	GG	1.54	0.00	0.00	0.00	0.00

E: Esquizofrenia. TB: Trastorno bipolar. TE: Trastorno esquizoafectivo. del22q11: Fenotipo compatible con delección 22q11.2. THDA: Trastorno de hiperactividad con déficit de atención.

*Solo un paciente de la muestra analizada tuvo como diagnóstico el trastorno de hiperactividad con déficit de atención. Este paciente presentó signos cardiacos asociados a probable fenotipo 22q11.2.

7. Discusión.

El análisis de hiperprolinemia en pacientes con del22q11.2 (Karayiorgou y Gogos, 2004), los tipos de hiperprolinemia I y II (Phang *et al.*, 2001) y un modelo de administración crónica de este aminoácido (Shanti *et al.*, 2004), han documentado las propiedades patogénicas de la hiperprolinemia. Sin embargo, la evidencia directa de que la disfunción de *PRODH* aumenta la prolina y conduce a la función cerebral alterada, fue proporcionada por un estudio sobre ratones *knockout* de *PRODH*, que muestran niveles elevados de prolina e IPP atenuado (Gogos *et al.*, 1999) y por lo tanto, estos ratones presentaron un déficit en el filtro sensoriomotor. También manifestaron aumento de la sensibilidad a la anfetamina y a deficiencias en la memoria declarativa, además de glutamato y GABA localmente disminuidos en el sistema nervioso central y el aumento de glutamato en el hipocampo con la posible activación de la señalización dopaminérgica en la corteza prefrontal (Gogos *et al.*, 1999). Así mismo, se ha documentado que la insuficiencia de la vitamina D confiere riesgo de esquizofrenia; a través de la reducción de la expresión de *PRODH*, elevación de la prolina y la desregulación concomitante de la neurotransmisión (Clelland *et al.*, 2014).

En este estudio se evaluó la asociación de múltiples variantes funcionales y sinónimas de *PRODH* con la esquizofrenia, trastorno bipolar y trastorno esquizo-afectivo de pacientes y de controles mestizos mexicanos.

De los quince SNP analizados se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles analizados y la base pública para los SNP rs16983466 y rs372055 (Tabla 18). Las diferencias pueden deberse a que el tamaño de muestra de la base pública es de sólo 64 individuos y/o a la heterogeneidad de la población mestiza mexicana. La distribución geográfica de nuestras muestras de acuerdo a su lugar de origen fue: Distrito Federal 60.22%, Guerrero 8.60%, Estado de México 5.38%, Puebla 4.30%, Morelos 4.30% y otros estados 17.20% (Tabla 5). Entre los otros estados se encuentran Veracruz, Oaxaca y Tlaxcala como los más numerosos. De manera que la distribución geográfica abarca el centro y sur del país.

Es importante determinar las frecuencias alélicas y haplotípicas de genes asociados a enfermedades en nuestra población debido a que éstas varían dependiendo del origen étnico. Por ejemplo, la frecuencia alélica de rs450046 hallada en controles mestizo mexicanos presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a las frecuencias de africanos residentes en Estados Unidos (Tabla 19). Por otro lado, rs16983466 y rs372055 presentaron diferencias no solo con la población mestizo mexicana reportada, sino también con la población española, colombiana y japonesa, pero ninguna con la población africana (Tablas 20-21).

Al comparar las frecuencias genotípicas de los SNP rs16983466 y rs372055, se determinó que el modelo de asociación genética fue dominante, ya que al contrastar el genotipo homocigoto silvestre vs. el heterocigoto y el homocigoto mutante, se obtuvo un valor de p estadísticamente significativo. Sin embargo, al comparar el genotipo heterocigoto vs. el homocigoto mutante, se obtiene un valor de $p > 0.05$. De manera que el modelo de asociación para estos SNP es dominante, ya que el genotipo homocigoto mutante y el heterocigoto presentan el mismo riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, las demás variantes no se ajustaron a ningún modelo.

Así mismo, el valor e intervalo de RM para las variantes antes descritas fue menor a 1, lo que implica que estadísticamente los alelos menores A y G de la variantes rs16983466 y rs372055, respectivamente, son de protección (Tablas 15, 17).

Esto no concuerda con la literatura, ya que se ha documentado que el alelo menor A del SNP rs16983466 se asocia con la actividad reducida de POX en un 30-70%, aunque estos estudios fueron *in vitro* (Bender *et al*, 2005). Por otro lado, rs372055 es un SNP sinónimo.

En este trabajo se consideró como haplotipo, aquellos grupos de SNP cuyo valor de desequilibrio de ligamiento fuera mayor a 60.

Con los quince SNP analizados se encontraron cuatro haplotipos asociados con esquizofrenia. El diplotipo de protección GA está conformado por rs372055/rs16983466. El triplotipo de protección GTG está construido a partir

de rs372055/rs450046/rs385440. Con las variantes rs2238731/rs16983466, se obtuvo un diplotipo de protección CA y otro de riesgo CG.

El diplotipo formado por rs372055/rs16983466 no ha sido reportado previamente y está formado por los SNP que presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la base de datos pública consultada (Ensembl, consultada el 21 de agosto del 2015).

Por otro lado, se ha documentado que los portadores de la combinación **GCA** del triplotipo rs372055/rs450046/rs385440 exhiben IPP y memoria verbal atenuada, mayor ansiedad y esquizotipia en comparación con individuos no portadores. Este triplotipo fue encontrado en estudiantes masculinos sanos (Roussos *et al.*, 2009). En la muestra estudiada identificamos el triplotipo **GTG**, conformado por los mismos SNP reportados por Roussos y colaboradores, pero la asociación fue de protección contra esquizofrenia (Tabla 23). En ambos resultados, el alelo **G** de rs372055 es el único que está presente en ambos triplotipos. El triplotipo reportado por Roussos es de riesgo (GCA) y están presentes los alelos menores C y A de rs450046 y rs385440, respectivamente. En cambio en el haplotipo de protección (GTG) hallado en este trabajo se encuentran los alelos mayores T y G.

Se comparó visualmente las frecuencias haplotípicas de los pacientes psiquiátricos (Tabla 22) con las frecuencias de haplotipos reportadas por Roussos y colaboradores (Anexo VI). Se encontró que el triplotipo ATG fue el más frecuente en ambos grupos. Sin embargo, en la población griega se exhibieron dos triplotipos (ACG y GCA) que no mostraron los pacientes psiquiátricos. En controles no observamos el haplotipo descrito, sino un subhaplotipo formado por las variantes rs450046 y rs385440.

Por otro lado, se reportó el diplotipo TA formado por las variantes rs372055 y rs385440 en población china. El diplotipo TA se asoció con el deterioro en el rendimiento de la Torre de Hanoi, la cual es una tarea de resolución de problemas que refleja principalmente la capacidad de planificación (Tao *et al.*, 2008).

En la bibliografía se ha descrito la asociación entre varias permutaciones de SNP y haplotipos contruidos a partir de los marcadores rs383964, rs372055, rs450046 de *PRODH* en 107 casos con esquizofrenia. Fue un estudio realizado en tríos en población europea americana. Posteriormente analizó una segunda muestra de 26 tríos para los mismos SNP, donde el caso índice tenía una enfermedad de inicio en la infancia y por último, analizó estas variantes en una tercera muestra de 109 africanos adultos y 75 controles. Su análisis sugiere una asociación entre la esquizofrenia y un haplotipo para las variantes rs383964, rs372055 y rs450046 definido por los alelos G, T y C, respectivamente. Este efecto se asoció de manera más fuerte para el inicio temprano de la enfermedad (Liu *et al.*, 2002) Nosotros no analizamos el SNP rs383964, pero sí los otras dos variantes. Este polimorfismo puede presentar cualquiera de las bases nitrogenadas que dan secuencia al DNA (A/C/G/T) y es una variante localizada en la región 3' UTR de *PRODH* (Ensembl, consultado el 21 de agosto del 2015). Nuestros datos de las dos variantes estudiadas del haplotipo mencionado no se asociaron con la edad de inicio de la enfermedad (datos no mostrados).

Nuestro resultados identificaron el diplotipo formado por las variantes rs2238731/rs16983466 como de riesgo: CG y de protección: CA. Al analizar a los portadores del diplotipo con los puntajes de la escala psiquiátrica BPRS que se describen más adelante, observamos que los pacientes que presentaron el diplotipo CA tuvieron un puntaje en la escala BPRS menor que los pacientes con diplotipo CG.

Con los resultados de genotipos-haplotipos de *PRODH* tratamos de establecer una correlación genotipo-fenotipo considerando las características clínicas y genotípicas de los diez pacientes psiquiátricos, portadores del haplotipo de riesgo CG y el de protección CA conformados por los polimorfismos rs2238731/rs16983466 (Tablas 24 y 25). Es importante mencionar que la mayoría de los pacientes presentados en las tablas ya referidas, fueron evaluados mediante las escalas BPRS, MMS y/o PANSS. Estas pruebas psiquiátricas se realizan generalmente al ingreso del paciente al INNNMVS, duran diferente tiempo y dependen del estado cooperador del paciente. La

escala MMS necesita que el paciente colabore y realice algunos cálculos, lo cual representa una limitante. En ocasiones los pacientes psiquiátricos se encuentran negativistas y las escalas no pueden ser valoradas, es por ello que no todos los casos presentan esta escala.

Del paciente E62 no contamos con otros datos clínicos además de los mostrados en la Tabla 25, excepto su escolaridad que fue licenciatura y su actual empleo de carpintería, ya que no se pudo obtener el expediente. Este caso se incluyó en la Tabla 25 por su relevancia, al presentar la mutación heterocigota en la posición L289M y ser portador del haplotipo de riesgo CG. Este resultado no se observó en alguna otra muestra analizada (controles y pacientes). Además se ha documentado, que dos mutaciones heterocigotas (L441P y L289M) en *PRODH*, se asocian con un aumento de los niveles plasmáticos de prolina. Estas dos mutaciones fueron identificadas en tres de 63 pacientes con esquizofrenia (4.76%), pero no en los 68 controles (Jacquet *et al.*, 2002). No obstante, en las bases de datos públicas se ha reportado que este SNP se ha presentado en un control sano de los 64 individuos analizados (1.56 %) (Tabla 15). Sería necesario revisar clínicamente a este “control” y evaluar sus niveles de prolina. Así mismo y contrario a lo esperado, en la muestra bajo estudio se encontraron dos controles con la mutación L441P de forma heterocigota (Figura 18 y Tabla 15) y ningún paciente psiquiátrico exhibió esta mutación. Se ha documentado en la literatura que esta mutación tiene una reducción de la actividad enzimática de POX mayor al 70% (Bender *et al.*, 2005). En la literatura también se ha descrito que la hiperprolinemia puede correlacionarse con el número de mutaciones de *PRODH* (Alfenjar *et al.*, 2007), sería idóneo revisar los antecedentes heredo-familiares de estos dos controles y medir los niveles de prolina periférica.

En el paciente E62 sería conveniente medir los niveles de prolina en sangre así como obtener una valoración psiquiátrica mediante escalas para poder establecer una correlación genotipo-fenotipo.

Los casos E175 y E216 mostraron delección hemicigota de la región 22q11.2 que incluye al gen *PRODH* (Tabla 25). E175 y E216 fueron portadores del haplotipo de riesgo y protección, respectivamente. El fenotipo observado

clínicamente concuerda con la del22q11.2 (Página 52), pero no fue posible realizar una comparación entre estos dos pacientes, ya que fueron evaluados para diferentes escalas y no es posible realizar una correlación entre MMS y BPRS, pues mientras que la primera evalúa deterioro cognitivo, la segunda mide el estado mental del paciente. El paciente E175 posee el valor más bajo del MMS entre los pacientes con esta escala, 18/30 que corresponde a un deterioro cognitivo moderado. El paciente E188 es portador del haplotipo de riesgo CG y obtuvo el mayor puntaje en la escala BPRS (Tabla 24).

Se identificó que los pacientes con esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno esquizoafectivo y fenotipo 22q11 fueron mayoritariamente portadores del haplotipo CG sin presentar el diplotipo CA (Tabla 26). La única muestra con trastorno de déficit de atención mostró ser portadora del haplotipo de protección CA y de riesgo CG. Con estos resultados podemos inferir que los portadores de CG se asocian con síntomas más severos de espectro fenotípico. Consideramos que sería importante ampliar la muestra para estudiar a detalle esta posible asociación.

Se ha reportado en la literatura que el triplotipo TCG conformado por rs2904552/rs2238731/rs16983466 presenta asociación con esquizofrenia, y de estos SNP, sólo el rs2238731 se asocia con una disminución del volumen cerebral en los pacientes que lo portan (Ota, *et al*, 2014).

El paciente E188, portador del haplotipo de riesgo CG, fue el único caso en el que se documentaba una disminución del volumen subcortical en su expediente. Aunque E188 no porta el triplotipo TCG documentado por Ota y colaboradores, él presenta el alelo C del SNP rs2238731 (CCG). Este hallazgo sugiere que sería conveniente realizar estudios de resonancia magnética de cráneo a los pacientes portadores del haplotipo de riesgo para establecer su correlación con el volumen cerebral y a los portadores del alelo C del rs2238731.

E229 es portador del haplotipo de riesgo CG y del haplotipo de protección CA. Este caso presentaba trastorno bipolar, carácter hipersexual y en la evaluación BPRS obtuvo el menor puntaje observado. Lo que implica que al momento de

realizarse la entrevista, la severidad y presencia de los síntomas estaban dentro de la normalidad.

E188 y E229 tienen el mismo valor en la escala MMS (19/30), por lo que no es posible comparar entre portadores de CG y CA. En general, los pacientes psiquiátricos presentaron deterioro cognitivo leve y únicamente los casos E175, E188 y E229 tuvieron un deterioro cognitivo moderado, así que pueden requerir supervisión las 24 horas (Folstein *et al.*, 1975).

Por otro lado, el paciente E228 padece trastorno esquizoafectivo y trastorno depresivo mayor. Este paciente presentó el haplotipo de protección CA en estado homocigoto y no manifiesta alucinaciones, según lo documentado en su expediente clínico.

De manera que los tres portadores del haplotipo de protección CA exhibieron valores de BPRS normales, después del tratamiento farmacológico. Esto fue observado en el expediente clínico de E208. En cambio los tres portadores del haplotipo de riesgo que fueron evaluados con la misma escala, presentaron puntajes entre 15 a 30, lo que implica que poseían una intensidad leve de la severidad de los síntomas durante la entrevista (Anexo I). Ningún caso obtuvo un valor superior a 30 puntos, por lo que ningún paciente analizado tuvo una intensidad severa de los síntomas. Una probable explicación a esto puede ser que los portadores del haplotipo de protección responden mejor al tratamiento. Aunque hacen falta otros estudios para probar esta hipótesis. Cabe destacar que la escala psiquiátrica BPRS se diseñó con el objetivo de valorar la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes psicóticos, aunque también se ha utilizado para el diagnóstico y para la clasificación sindrómica de este cuadro (Bech, 1993). Por otro lado, la escala BPRS es especialmente útil en casos moderados y severos, disminuyendo su rendimiento cuando los síntomas son más leves (Overall JE, Gorham, 1988). De manera que sería conveniente aplicar la escala psiquiátrica PANSS a los pacientes, en la cual se realiza un desglose de los síndromes positivos, negativos y la psicopatología general, adicionalmente de la escala BPRS.

El caso E251 fue evaluado mediante la escala PANSS obteniendo 9 puntos en síntomas positivos, 26 en síntomas negativos y 31 en psicopatología general. Este mayor puntaje en la escala de psicopatología general del paciente E251, implica que “prevalecen síntomas que no entran propiamente en las categorías de positivos o negativos” (Kay et al., 1967). Al revisar los ítems de esta escala se identificaron como síntomas predominantes la falta de juicio y la ansiedad, mas ítems como la ira y la hostilidad estaban ausentes. Lo cual es discordante con la historia clínica de su expediente. Este paciente no fue valorado mediante la escala BPRS.

Entre las características clínicas de los pacientes con hiperprolinemia, que presentan delección hemicigota de *PRODH* y mutaciones en el segundo alelo, así como mutaciones en múltiples sitios de este gen son: epilepsia, retraso mental, desórdenes del comportamiento, psicosis, características autistas, agresividad y retraso psicomotor (Di Rosa *et al.*, 2008) (Alfenjar *et al.*, 2007) (Raux *et al.*, 2006). El paciente E251 presentó mutación en el SNP rs2238731 y en su expediente clínico se le describe como “agresivo extremo”. El efecto de esta mutación *in vitro* es de una reducción del 30-70% de la actividad enzimática de POX (Bender *et al.*, 2005).

Por otro lado, E230 portador del haplotipo de riesgo, sin ninguna mutación en *PRODH* manifiesta agresividad verbal y física heterodirigida.

E232, portador del haplotipo de riesgo, presenta tres mutaciones (dos de las cuales son funcionales) y no presenta signos de agresión hacia sí mismo o hacia otros. Esto podría deberse a que la mutación NM_001195226.1:c.1203-51T>C está localizada en el intrón 13 de *PRODH* y es un SNP etiqueta. Q521R está ubicada en el exón 14 e incrementa la actividad de la enzima >120% (Bender *et al.*, 2005) y L581L es una mutación sinónima. Sin embargo, no podemos excluir totalmente una contribución a las alteraciones observadas en los endofenotipos por los SNP silenciosos (SNP etiqueta y L581L); de hecho, cada vez hay más pruebas que apoyan la idea de que SNP sinónimos son capaces de alterar la cantidad, estructura o función de la proteína (Roussos *et al.*, 2009). Así mismo, E229 presenta agresividad verbal y es portador del haplotipo de riesgo y el de protección.

Nuestros resultados sugieren que la agresividad no parece ser una característica predominante en pacientes con el haplotipo de riesgo o con mutación en *PRODH*. Tampoco los estados epilépticos fueron característicos de un haplotipo en específico, pues estuvieron presentes en E232, E228 y E229. Debemos considerar que epilepsia y agresividad son rasgos multifactoriales, donde otros genes y factores ambientales también están participando. Por ejemplo, se ha descrito que las variantes en el número de copias (CNV) son importantes contribuyentes a los trastornos del neurodesarrollo con herencias complejas, y puede ser uno de los principales factores de riesgo de epilepsia. Varios puntos de acceso genómicas recurrentes se han identificado en relación con la patogénesis de la epilepsia, incluyendo 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 15q11-q13, 16p11.2, y 16p13.11 (Wang *et al.*, 2015).

No obstante, cabe destacar que solo los portadores del haplotipo de riesgo presentaron mutaciones en *PRODH*. Sería conveniente medir los niveles de prolina en sangre para establecer la implicación clínica de las mutaciones homocigotas, heterocigotas y la del22q11.2, ya que la hiperprolinemia periférica se ha asociado con una disminución de IQ y deterioro cognitivo en pacientes con esquizofrenia (Clelland *et al.*, 2014)

8. Conclusión.

El espectro clínico esquizo-afectivo es un conjunto de desórdenes multifactoriales, donde una sola mutación no explica el fenotipo observado en los pacientes psiquiátricos. En cambio, el análisis de haplotipos permitió agrupar a los pacientes en portadores del diplotipo de riesgo y/o de protección y compararlos a través de la escala psiquiátrica BPRS.

El fenotipo entre esquizofrenia, trastorno bipolar y trastorno esquizoafectivo es muy heterogéneo con superposición de las características clínicas, pues mientras que la esquizofrenia está caracterizada por delirios y alucinaciones, en el trastorno bipolar los estados maníacos y depresivos son latentes, más no excluye el presentar alucinaciones. Así mismo, el trastorno esquizoafectivo es una combinación de ambos padecimientos con predominio de alguna de sus características, lo cual dificulta su clasificación. Por lo que la biología molecular

podría en un futuro ayudar a delimitar y caracterizar estas patologías mediante la identificación de marcadores genéticos, con el soporte de pruebas bioquímicas, de imagen, psicológicas y psiquiátricas. Adicionalmente, se podría establecer endofenotipos característicos de estas enfermedades multifactoriales, lo que permitiría el uso de la medicina personalizada y la mejora de la calidad de vida del paciente y sus familiares.

Este es el primer trabajo que explora las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de quince variantes de *PRODH* previamente asociadas, en población mestizo mexicana. De manera que, este estudio sirve de base para investigaciones del gen *PRODH* en esta población, así como en pacientes psiquiátricos, ya que pueden encontrarse diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre distintos grupos. Esto implica que los haplotipos de riesgo y protección, así como sus frecuencias cambien de una población a otra.

9. Perspectivas.

Este es un estudio preliminar que forma parte de un protocolo de investigación financiado por CONACYT #233695 a largo plazo, en el que se están evaluando otros genes asociados con esquizofrenia, entre ellos *COMT*, *NRG* y *DISC1*. Así mismo, se están aplicando escalas neuropsicológicas para cognición y funciones ejecutivas.

El presente trabajo presenta varias limitantes:

Entre ellas, analizar el SNP rs383964 para los 101 controles y 101 pacientes psiquiátricos; para establecer si se genera o no un haplotipo junto con rs372055 y rs450046 pues el triplotipo GTC presentó asociación para el inicio temprano de la enfermedad. Establecer la implicación del triplotipo de protección GTG conformado por rs372055/rs450046/rs385440, con funciones ejecutivas.

Es aconsejable cuantificar los niveles de prolina en sangre tanto en pacientes con esquizofrenia, trastorno bipolar y trastorno esquizoafectivo como en controles sanos mestizo mexicanos, así como correlacionar este hallazgo con los SNP funcionales de *PRODH*, el haplotipo de riesgo y los de protección, las

mutaciones homocigotas y heterocigotas encontradas en este gen y en *COMT*, así como la del22q11.2.

Así mismo, evaluar las asociaciones entre haplotipos de *COMT* y *PRODH*, y su implicación clínica en cognición y funciones ejecutivas, a través de MATRICS, batería consensuada para cognición en esquizofrenia (*Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*).

Los expedientes clínicos son heterogéneos entre sí y por tal motivo, los pacientes no fueron evaluados con las mismas pruebas psiquiátricas. Estas pruebas reflejan el estado del paciente en las últimas 72 horas (Anexo I), por lo que sería necesario realizar la misma escala al ingreso, durante y después del tratamiento farmacológico para realizar una correlación genotipo-fenotipo más confiable.

Adicionalmente, después de aumentar el tamaño de muestra, tratar de establecer haplotipos de riesgo y protección por patología.

Del mismo modo sería interesante realizar pruebas de imagen estructural y de función cerebral de todos los pacientes psiquiátricos y establecer la relación existente con el genotipo.

10. Recursos bibliográficos.

- ♦ Afenjar A. et al., Early neurological phenotype in 4 children with biallelic *PRODH* mutations, *Brain & Development*, 2007, 29, pp.547–552.
- ♦ Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M. J., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, *Bioinformatics*, 2005, 21 (2): 263–265.
- ♦ Apiquian-Guitart R., Aviña-Cervantes C., Colín Piana R., et al, Guía terapéutica para el manejo de la esquizofrenia, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Academia de Esquizofrenia de la Asociación Psiquiátrica Mexicana, 3-111.
- ♦ Bech P. Rating scales for psychopathology, health status and quality of life. Springer-Verlag, Alemania, 1993.
- ♦ Bell M, Milstein R, Beam-Goulet J. The Positive and Negative Syndrome Scale and the Brief Psychiatric Rating Scale: reliability, comparability, and predictive validity. *J Nerv Ment Dis*, 1992; 180: 723-8.
- ♦ Bender H. U., et al., Functional Consequences of *PRODH* Missense Mutations, *Am. J. Hum. Genet.*, 2005, 76: 409–420.
- ♦ Carmel M. Zarchi O., Michaelovsky E., Frisch A., Patya M., Green T., Gothelf D., Weizman A., Association of *COMT* and *PRODH* gene variants with intelligence quotient (IQ) and executive functions in 22q11.2DS subjects, *Journal of Psychiatric Research* 56 (2014) pp. 28-35.
- ♦ Cascella N. G., Schretlen D. J., Sawa A., Schizophrenia and epilepsy: is there a shared susceptibility?, *Neurosci Res*. 2009, 63(4): 227–235.
- ♦ Clelland J. D., Read L. L., Drouet v, Kaon A., Kelly A., Duff K. E., Nadrich R.H., Rajparia A., Clelland C. L., Vitamin D insufficiency and schizophrenia risk: Evaluation of hyperprolinemia as a mediator of association, *Schizophrenia Research*, 2014, 156:15–22.
- ♦ Di Rosa G., Pustorino G., Spanoa M., et al., Type I hyperprolinemia and proline dehydrogenase (*PRODH*) mutations in four Italian children with epilepsy and mental retardation, *Psychiatric Genetics* 2008, 18:40–42.

- ♦ Eisenberg D. P., Berman K. F., Executive Function, Neural Circuitry, and Genetic Mechanisms in Schizophrenia, *Neuropsychopharmacology Reviews*, 2010, 35, 258–277.
- ♦ Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR: “Mini-mental state: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.” *J Psychiatr Res*, 1975, 12:189-198.
- ♦ Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., Defelice, M., Lochner, A., Faggart, M., et al., The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 2002, 296 (5576): 2225-2229.
- ♦ Giménez C., Zafra F., Monografía XXV: Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas, Real Academia Nacional de Farmacia, España, 2009, pp. 287-307.
- ♦ García-Sánchez F., Martínez-Gras I., Rodríguez-Jiménez R., Rubio G., Inhibición prepulso del reflejo de la respuesta de sobresalto en los trastornos neuropsiquiátricos, *Rev Neurol*, 2011, 53:422-432.
- ♦ Galasko D., Klauber M.R., Hofstetter C.R., Salmon D.P., Lasker B., Thal L.J, The Mini-Mental State Examination in the early diagnosis of Alzheimer's disease, *Arch Neurol*, 1990, 47(1):49-52.
- ♦ Gogos J.A., Santha M., Takacs Z., Beck K.D., Luine V., Lucas L.R., Nadler JV, Karayiorgou M. 1999. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nat Genet* 21:434–439.
- ♦ Granados J., Zúñiga J., Acuña-Alonzo V., Rosetti F, Vargas-Alarcón G., Influencia de alelos y haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en la susceptibilidad a lupus eritematoso generalizado en la población mexicana, *Gac. Méd. Méx.*, 2006, 142 (3): 195-199.
- ♦ Guía de Práctica Clínica, Detección y Manejo del Maltrato en el Adulto Mayor en Primer Nivel de Atención, México: Secretaría de Salud; 2008.
- ♦ Guy W. ECDEU. Assessment Manual for Psychopharmacology. Maryland: US Dept. Health Education and Welfare (NIMH), 1981.

- ◆ Hoogendoorn B., Coleman S. L., Guy C. A., Smith S. K., O'Donovan M. C., Buckland P. R., Functional Analysis of Polymorphisms in the Promoter Regions of Genes on 22q11, *Human Mutation*, 2004, 24:35-42.
- ◆ Jacquet H., et al, *PRODH* mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients, *Hum. Mol. Genet.*, 2002, 11 (19): 2243–2249.
- ◆ Jones M. E, Conversion of Glutamate to Ornithine and Proline: Pyrroline-5-Carboxylate, a Possible Modulator of Arginine Requirements American Institute of Nutrition, 1985, pp. 511.
- ◆ Kay S.R., Fiszbein A., Opler L. A., The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for Schizophrenia, *Schizophrenia Bulletin*, 1967, 13 (2): 1-16.
- ◆ Karayiorgou, M., Gogos, J.A., The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia, *Brain Res. Mol. Brain Res*, 2004, 132 (2): 95–104.
- ◆ Kempf L., et al, Functional Polymorphisms in *PRODH* Are Associated with Risk and Protection for Schizophrenia and Fronto-Striatal Structure and Function, *Plos Genetics*, 2008, 4 (11): 1-4.
- ◆ Keshavan M. S., Tandon R., Boutros N. N., Nasrallah H. A., Schizophrenia, “just the facts”: What we know in 2008 Part 3: Neurobiology, *Schizophrenia Research*, 2008, 106: 89–107
- ◆ Lang U. E., Puls I., Müller D. J., Strutz-Seebohm N., Gallinat J., Molecular Mechanisms of Schizophrenia, *Cell Physiol Biochem* 2007, 20:687-702
- ◆ Laursen T. M., Munk-Olsen T., Vestergaard M., Life expectancy and cardiovascular mortality in persons with schizophrenia, *Curr Opin Psychiatry*, 2012, 25:83–88.
- ◆ Liu H., Abecasis G. R., Heath S.C., Knowles A., Demars S., Chen Y., Roos JL, Rapoport JL, Gogos JA, Karayiorgou M. 2002. Genetic variation in the 22q11 locus and susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99:16859–16864.
- ◆ Li T., Ma X., Hu X., et al., *PRODH* Gene is Associated With Executive Function in Schizophrenic Families, *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 2008, 147B:654–657.

- ♦ Michaelovsky E., Frisch A., Carmel M., Patya M., Zarchi O., Green T., Basel-Vanagaite L., Weizman A., Gothelf D., Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome, *BMC Medical Genetics*, 2012, 13:122.
- ♦ Ota V. K., et al, PRODH Polymorphisms, Cortical Volumes and Thickness in Schizophrenia, *Plos one*, 2014, 9 (2): 1-6.
- ♦ Overall JE, Gorham DR. The Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS): recent developments in ascertainment and scaling. *Psychopharmacol*, 1988; 24: 97-9.
- ♦ Phang, J. M., Chien-an, A. H., Valle, D. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. : *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. II. New York: McGraw-Hill (8th ed.): 2001. pp. 1820-1838
- ♦ Raux G., Involvement of hyperprolinemia in cognitive and psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome, *Human Molecular Genetics*, 2007, 16, (1): 83–91.
- ♦ Redolar Ripoll D., *Fundamentos de psicobiología*, Editorial UOC, 2010: 258.
- ♦ Rees E., et al, Kirov G., Sanders A., et al. Evidence that duplications of 22q11.2 protect against schizophrenia, *Molecular Psychiatry*, 2013: 1–4.
- ♦ Rodríguez-Esparragón F., Rodríguez-Pérez J.C., García-Bello M. A., *Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica*, *Nefrología* 2009; 29 (6): 582-588.
- ♦ Stahl, S. *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis & Practical Applications*. 3rd ed. Cambridge University Press, 2008.
- ♦ Shanti, N.D., Shashikumar, K.C., Desai, P.V., Influence of proline on rat brain activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and acid phosphatase. *Neurochem. Res*, 2004, 29 (12): 2197–2206.
- ♦ Taliun D., Gamper J., Pattaro C., Efficient haplotype block recognition of very long and dense genetic sequences, *BMC Bioinformatics* 2014, 15:10.
- ♦ Tandon, R., et al., Definition and description of schizophrenia in the DSM-5, *Schizophr. Res.*, 2013.

- ♦ Tiwari A. K., Zai C. C., Müller D. J., Kennedy J. L., Genetics in schizophrenia: where are we and what next?, *Dialogues Clin Neurosci.* 2010, 12: 289-303.
- ♦ Tost H., Alam T., Meyer-Lindenberg A., Dopamine and Psychosis: Theory, Pathomechanisms and Intermediate Phenotypes, *Neurosci Biobehav Rev.* 2010; 34 (5): 689–700.
- ♦ VanDongen A., *Biology of the NMDA Receptor*, *Frontiers in Neuroscience*, 1ª edición, 2009.
- ♦ Vorstman J., Turetsky B., Sijmens-Morcus M., et al., Proline Affects Brain Function in 22q11DS Children with the Low Activity COMT158 Allele, *Neuropsychopharmacology* 2009: 34, 739–746.
- ♦ Wang D., Li X., Jia S., Wang Y., Wang Z., Song X., Liu L., Wang D et al. Copy number variants associated with epilepsy from gene expression microarrays. *J Clin Neurosci*, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2015.05.033>
- ♦ Weinberger D. R., Harrison P. *Esquizofrenia*, Wiley-Backwell, 3ª edición, Reino Unido, 2011: 29.
- ♦ Wheless J., Gibson P., Luther-Rosbeck K., et al., Infantile spasms (West syndrome): update and resources for pediatricians and providers to share with parents, *BMC Pediatrics* 2012, 12:108.
- ♦ Yuan H., Low C. M., Moody O., et al., Ionotropic GABA and Glutamate Receptor Mutations and Human Neurologic Diseases, *Mol Pharmacol*, 2015, 88:203–217.
- ♦ Zhang J.P., Malhotra A. K., *Pharmacogenetics and Antipsychotics: Therapeutic Efficacy and Side Effects Prediction Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011, 7(1): 9–37
- ♦ Zinkstok J., Schmitz N., van Amelsvoort T., Moeton M., Baas F., Linszen D., Genetic variation in COMT and PRODH is associated with brain anatomy in patients with schizophrenia, *Genes, Brain and Behavior*, 2008; 7: 61–69.

Recursos electrónicos.

http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/ OMS, consultado el 13 de julio del 2015.

<http://institutedepsicofarmacologia.com/antipsicoticos/vias-dopaminergicas-y-antipsicoticos>, Instituto de psicofarmacología, consultado el 25 de julio del 2015.

<http://www.schizophrenia.com/szfacts.htm>, Schizophrenia Facts and Statistics, consultado el 13 de julio del 2015

<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hyperprolinemia>, Genetics Home Reference, consultado 14 de julio del 2015.

<http://www.ensembl.org/index.html> Ensembl, consultado el 21 de agosto del 2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/coreutils/dispatch.cgi>, National Center for Biotechnology Information, consultado el 21 de agosto del 2015.

Anexo I.



ESCALA BREVE DE APRECIACION PSIQUIATRICA (BPRS)

Paciente _____ Fecha _____ Cama _____
 Evaluador _____ Expediente _____

Debe evaluarse la presencia y severidad de cada síntoma durante la entrevista, excepto los reactivos 2, 10, 12, 15 y 16 que califican en base al estado del paciente durante las últimas 72 horas. Cuando existan dudas, solicitar información al personal de enfermería o familiares del paciente. La entrevista tiene que tener una duración de 15 a 30 minutos. La severidad se califica del "0 al 4"; el 0 implica normalidad, y el 4 máxima severidad.

1. Preocupaciones somáticas; hipocondriasis delirante (p.e. ausencia de órganos internos).	0	1	2	3	4
*2. Ansiedad psíquica (irritabilidad, inseguridad, aprehensión, temor, terror o pánico). No incluye signos físicos).	0	1	2	3	4
3. Aislamiento emocional (falta de contacto con el entrevistador durante la entrevista).	0	1	2	3	4
4. Desorganización conceptual (trastornos formales del pensamiento: vaguedad, lógica propia, bloqueos, neologismos, incoherencia).	0	1	2	3	4
5. Autodepreciación y sentimientos de culpa (sentimientos de minusvalía e ideas de culpa, culpa delirante).	0	1	2	3	4
6. Ansiedad somática (concomitantes fisiológicos de la ansiedad: malestar abdominal, temblor, sudoración, etc.).	0	1	2	3	4
7. Trastornos motores específicos (conductas bizarras, posturas excéntricas, manierismos, agitación catatónica).	0	1	2	3	4
8. Autoestima exagerada (presunción, autocomplacencia, ideas delirantes de grandeza).	0	1	2	3	4
9. Animo deprimido (desaliento, tristeza, depresión, desesperanza, desamparo).	0	1	2	3	4
*10. Hostilidad (sentimientos o acciones en contra de la gente fuera de la entrevista, violencia física).	0	1	2	3	4
*11. Suspición (desconfianza, ideas de referencia, ideas de persecución).	0	1	2	3	4
*12. Alucinaciones (percepciones sin objeto).	0	1	2	3	4
13. Retardo psicomotor (actividad verbal y motora, expresión facial).	0	1	2	3	4
14. Falta de cooperación (actitud del paciente hacia la entrevista y observador).	0	1	2	3	4
*15. Contenido extra, o del pensamiento (ideas de control, influencia, celos, religiosas, sexuales, expansivas, etc. No incluye: grandeza, persecución o culpa).	0	1	2	3	4
*16. Afecto aplanado o inapropiado (reducción en la intensidad de las emociones o incongruencias con la situación o contenido del pensamiento).	0	1	2	3	4
17. Agitación psicomotora (actividad verbal y motora, expresión facial).	0	1	2	3	4
18. Desorientación (obnubilación, confusión o desorientación en persona, lugar y tiempo).	0	1	2	3	4

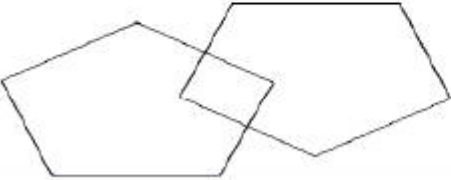
*Evaluar estado en las últimas 72 horas.

Puntaje total _____

30 o más=intensidad severa, y de 15 a 30=intensidad leve.

Anexo II.

**CUADRO IV. EXAMEN MMSE DE FOLSTEIN
(EVALÚA EL ESTADO MENTAL)**

Orientación	Puntos
¿Qué año-estación-fecha-día-mes es?(5)
¿Dónde estamos? (estado-país-ciudad-hospital-piso)(5)
Memoria Inmediata	
Repetir 3 nombres ("mesa", "llave", "libro"). Repetirlos de nuevo hasta que aprenda los tres nombres y anotar el número de ensayos.(3)
Atención y cálculo	
Restar 7 a partir de 100, 5 veces consecutivas. Como alternativa, deletrear "mundo" al revés.(5)
Recuerdo diferido	
Repetir los tres nombres aprendidos antes(3)
Lenguaje y construcción	
Nombrar un lápiz y un reloj mostrados(2)
Repetir la frase "Ni sí es, ni no es, ni peros"(1)
Realizar correctamente las tres órdenes siguientes: "Tome este papel con la mano derecha, dóblelo por la mitad y póngalo en el suelo"(3)
Leer y ejecutar la frase "Cierre los ojos"(1)
Escribir una frase con sujeto y predicado(1)
Copiar este dibujo: (1)
Puntuación total:(30)

Anexo III.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

DMC-ESZTETAB-1-2015

CONSENTIMIENTO INFORMADO: "Análisis de variantes genómicas de secuencia y estructurales y su asociación con el desarrollo de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar"

NOMBRE DEL PACIENTE _____	FECHA _____	HORA _____
REGISTRO _____	FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____	
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL _____		

Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

- ✓ He sido invitado/a a participar el protocolo de investigación: "Análisis de variantes genómicas de secuencia y estructurales y su asociación con el desarrollo de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar".
- ✓ He sido informado/a que padezco o algún familiar padece (Marque una de las siguientes):
 - o ESQUIZOFRENIA ___ TRASTORNO ESQUIZOAFECTIVO _____ TRASTORNO BIPOLAR ___
- ✓ He sido informado/a que los padecimientos mencionados son trastornos psiquiátricos crónicos que puede presentar reactividad emocional alterada y conducta desorganizada con respuesta variable al tratamiento y remisión parcial. Actualmente no se conocen los mecanismos que determinan la aparición de estas enfermedades. Existe evidencia de que los factores genéticos pueden contribuir al desarrollo de las mismas.
- ✓ He sido informado/a que el objetivo de este estudio es determinar la prevalencia y el impacto de variantes genómicas de secuencia y estructurales en pacientes mestizo mexicanos con diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar, comparada con la prevalencia de las mismas en controles sanos. Los resultados de este protocolo nos permitirán identificar factores de riesgo y factores causales para el desarrollo de estas enfermedades.
- ✓ He sido informado/a que para participar en este estudio, en primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados, acto seguido se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el DNA (material genético) y se estudiarán diferentes variaciones genómicas asociadas con estas enfermedades.
- ✓ He sido informado/a que cuando la sangre es obtenida, podré experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.
- ✓ He sido informado/a que mi información clínica recopilada es confidencial. El nombre de los participantes nunca aparecerá en ningún reporte o publicación.
- ✓ He sido informado/a que mi participación en este estudio no tendrá ningún costo ni recibiré remuneración económica alguna.

Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama 14269, México, D.F. Tel. (55) 56063822
www.innn.salud.gob.mx



CONSENTIMIENTO INFORMADO: "Análisis de variantes genómicas de secuencia y estructurales y su asociación con el desarrollo de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar"

- ✓ He sido informado/a que este estudio es a largo plazo (3 años) y requiere de la participación de un gran número de pacientes con estas enfermedades. Una vez terminado el estudio, si los resultados son de relevancia para mí se me contactará para comunicármelos y explicármelos.
- ✓ He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para esta investigación y otras en las que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos: SI NO
- ✓ He sido informado/a que si me surgen dudas puedo contactar a la Dra. Alejandra Camacho Molina, al Dr. David J. Dávila Ortiz de Montellano o la Dra. Nancy Monroy Jaramillo del departamento de Neurogenética y Biología Molecular, las puedo localizar en el Tel. (55) 56 06 38 22 Exts. 1071, 2018 y 3041. También puedo comunicarme al Comité de Ética en Investigación, a la ext. 5027.
- ✓ Después de haber leído cuidadosamente este documento acepto **VOLUNTARIAMENTE** participar en el presente estudio.

Domicilio: _____

Teléfono: _____

Correo electrónico: _____

NOMBRE, FIRMA Y CEDULA DEL MEDICO

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

Anexo IV.

ANEXO III. Consentimiento informado controles



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA "MVS"

Consentimiento para participar en la investigación de la estructura genética de la población mexicana

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Fecha: ____/____/____

1. He sido informado(a) que en el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este instituto se están realizando estudios para determinar las variaciones en genes (que son las unidades de la herencia) en personas, aparentemente sanas, de la población mexicana.
2. Los genes que se van a estudiar son los siguientes: *APOE*, *ATX*, *HTT*, *CYP2D6*, *NAT*, *PARK2*, *PSEN1*, *COMT*, *PRODH*, *NRG*, *DISC*, *APTX* y *TREX1*. Estos genes pueden presentar variantes (polimorfismos) cuya frecuencia varía en diferentes poblaciones.
3. He sido informado(a) que para analizar estos genes es necesario que done una muestra de 20 mL de sangre periférica para que de ahí se extraiga el DNA que es el material hereditario y se estudien los genes antes mencionados.
4. He sido informado(a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción.
5. He sido informado(a) que se me hará un árbol genealógico y se me preguntara acerca de las enfermedades que he padecido así como las de mi familia.
6. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de números y letras para proteger mi identidad.
7. He sido informado(a) que mi participación en este estudio es **VOLUNTARIA** y no tiene costo alguno para mí, ni recibiré remuneración alguna.
8. Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado por los investigadores para saber si deseo conocer la información y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuados.
9. He sido informado(a) de la garantía que tengo para recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a dudas que surjan respecto a los asuntos relacionados con esta enfermedad.
10. Para cualquier duda o aclaración puede dirigirse al Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este instituto con la Dra. Ma. Elisa Alonso y con la Lic. Adriana Ochoa o comunicarse al Tel 56063822 Ext 2022 y 2018, respectivamente. En caso de así requerirse, los pacientes también pueden acudir al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 56 06 38 22 ext. 5027

ANTECEDENTES

Tabaquismo Sí No Años _____ Cantidad promedio _____
 Alcohol Sí No Años _____ Tipo de bebida _____
 Cantidad _____
 Drogas Sí No Tipo y frecuencia _____
 Sedentarismo Sí No
 Hipertensión Sí No Años de evolución _____
 Diabetes Mellitus Sí No Años de evolución _____
 Colesterol alto Sí No Años de evolución _____
 Cardiopatía Sí No Años de evolución _____
 Insuficiencia art. Sí No Años de evolución _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

ENFERMEDAD	SI	NO	FAMILIAR AFECTADO
Embolia cerebral			
Colesterol alto			
Diabetes			
Parkinson			
Pérdida de memoria			
Epilepsia			
Cáncer			
Tipo de cáncer			

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACION Y RESPONSABLE LEGAL
 AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR **VOLUNTARIAMENTE** EN LA
 INVESTIGACION DESCRITA

Nombre del participante: _____ **Género:** H M

Firma: _____ **Teléfono:** _____

Correo electrónico: _____

Dirección: _____

Origen: _____ **Edad:** _____ **Fecha de Nacimiento:** __/__/__

Ocupación: _____

Edo. Civil: _____ **Escolaridad:** _____

Testigo

Testigo

Nombre del (la) investigador(a) que obtuvo el consentimiento: _____

Firma : _____

Anexo V.

Imágenes representativas de electroferogramas parciales que corroboran el genotipo descrito por PCR-RFLP.

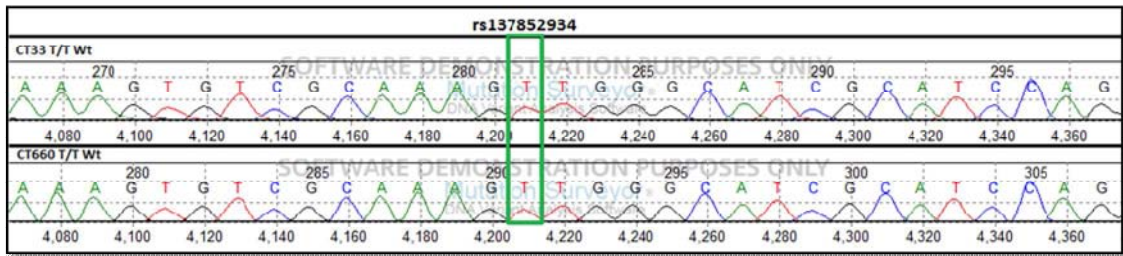


Figura 9. Electroferograma parcial de la variante rs137852934 de *PRODH*. En ambos paneles se presentan dos muestras con genotipo homocigoto silvestre T/T. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

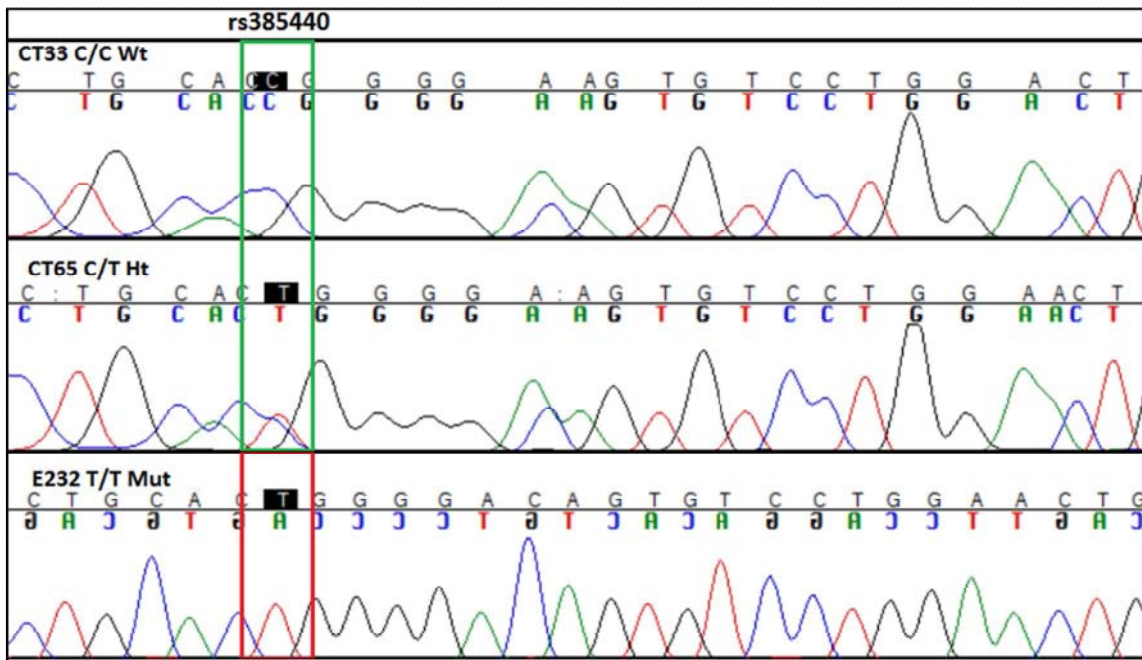


Figura 10. Electroferograma parcial de la variante rs385440 de *PRODH*. En el primer panel se presenta la muestra CT33 con genotipo homocigoto silvestre C/C, en el segundo panel la muestra CT65 exhibe el genotipo heterocigoto C/T y en el tercero, E232 muestra el genotipo homocigoto mutante T/T. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

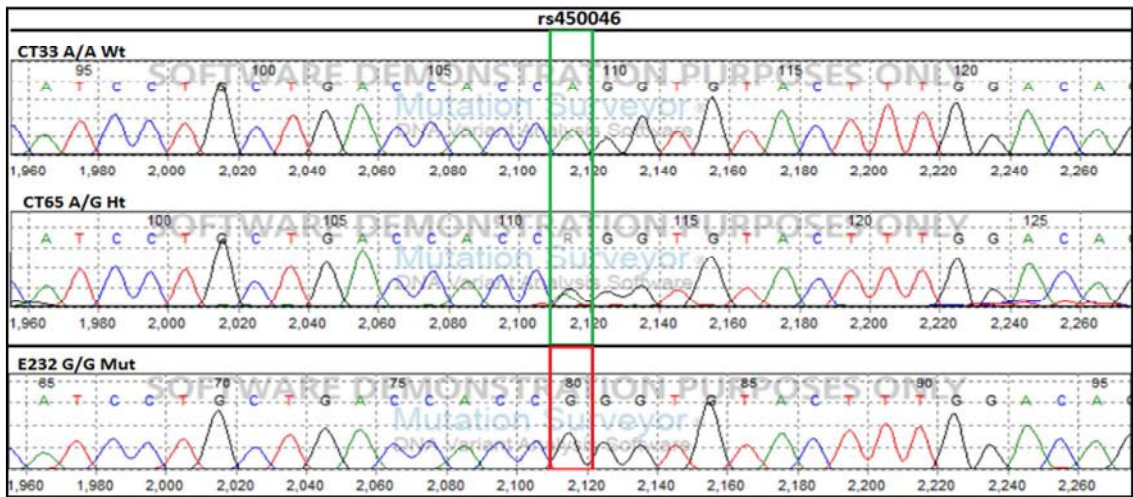


Figura 11. Electroferograma parcial de la variante rs450046 de *PRODH*. En el primer panel se presenta la muestra CT33 con genotipo homocigoto silvestre A/A, en el segundo la muestra CT65 exhibe el genotipo heterocigoto A/G y en el tercero, E232 muestra el genotipo homocigoto mutante G/G. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

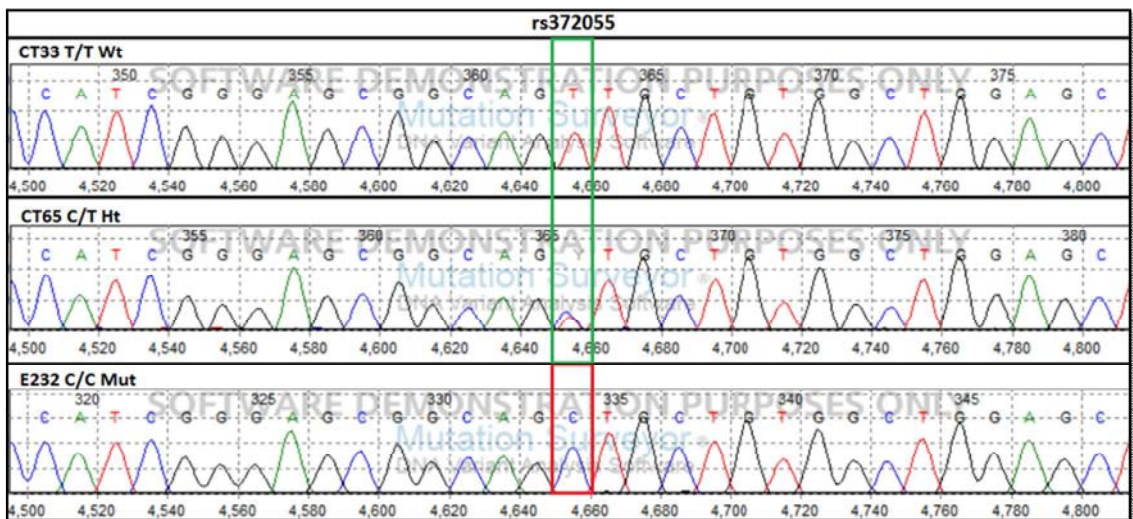
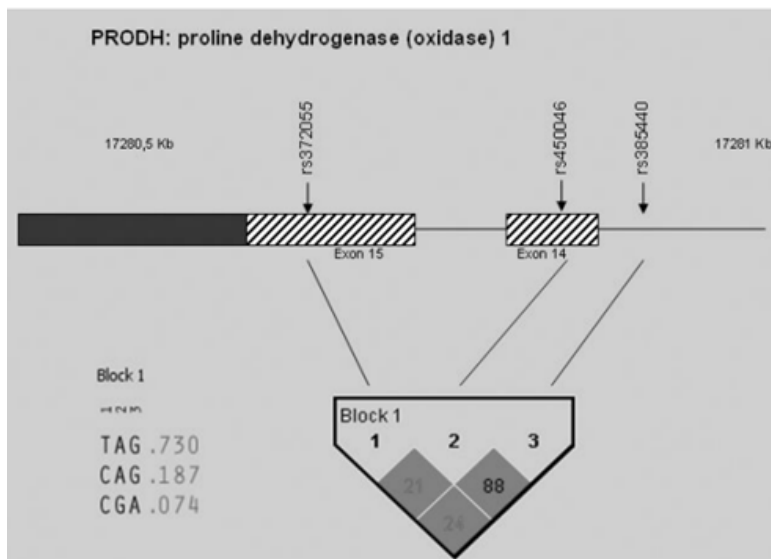


Figura 12. Electroferograma parcial de la variante rs372055 de *PRODH*. En el primer panel se presenta la muestra CT33 con genotipo homocigoto silvestre T/T, en el segundo la muestra CT65 exhibe el genotipo heterocigoto C/T y en el tercer panel, la muestra E232 muestra el genotipo homocigoto mutante C/C. Se remarca con un rectángulo la ubicación del SNP analizado.

Anexo VI.



Tomado de Roussos *et al.*, 2009.

Nota: Los autores invirtieron de posición de los SNP rs450046 y rs372055. Los bloques deberían presentarse de la siguiente manera:

ATG 0.730

ACG 0.187

GCA 0.074

Los alelos de rs372055 son A/G y de rs450046 son C/T.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>