



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN
TOMM40/APOE/APOC1 CON DIFERENTES ENFERMEDADES
PSIQUIÁTRICAS Y NEURODEGENERATIVAS EN POBLACIÓN MEXICANA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

MARTÍNEZ MAGAÑA JOSÉ JAIME

TUTORES

DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

DR. JOSÉ HUMBERTO NICOLINI SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Medicina Genómica

DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON
Instituto Nacional de Cancerología. Dr. Víctor Manuel Loyola

CIUDAD DE MÉXICO A 14 DE FEBRERO DEL 2018



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.

AGRADECIMIENTOS.

Por medio de las presentes quiero agradecer primeramente a todos los participantes del presente estudio, sin ustedes nada de esto pudiera haber sido posible, Muchas gracias!!!

En segundo lugar quiero agradecer a ustedes Dra. Elizabeth Langley, Dr. Samuel Canizales y Dr. Humberto Nicolini, por sus grandes consejos para hacer posible la realización de la presente tesis.

Gracias también a usted Dra. Alma Delia Genis Mendoza, quien siempre me ha apoyado y ha impulsando mi desarrollo dentro y fuera del laboratorio. Muchas gracias por todos sus consejos y por su amistad. Por fin termine, después de muchos muchos muchos regañones!!!!

Gracias también a ustedes Laura Solis, Antonio Solis, Irene Medina, Elizabeth Medina, Fernando Medina, Erika Fiscal, Rebeca Solis y Luis Solis, por todo su apoyo. Muchas gracias por todo.

A ustedes también, Jaime Martínez, Guadalupe Magaña, Jorge Martínez (Enano 1), Humberto Martínez (Enano 2, mini-enano) y aunque se encuentren a muchos kilómetros, sé que aun con la distancia siempre podré contar con ustedes, los llevo presentes todos los días. Jaime Martínez (papá) y Guadalupe Magaña (mamá), gracias por todos sus consejos y apoyo. Muchas gracias!!!!

Por último, pero no por eso menos importante, gracias a tí Anayelly Solis Medina, mi pewe, muchas gracias porque a pesar de lo difícil y los obstáculos que hemos tenido en la realización de la presente, así como en otras cosas; siempre te encuentras ahí apoyándome, aun cuando todos te dicen que serás pobre toda tu vida, tú sigues alentándome a continuar cada día con más fuerza con mis sueños, Muchas Gracias. TE AMOOOOO, NUNCA LO OLVIDES.

Este trabajo está dedicado a todos ustedes, muchas muchas muchas gracias!!!!!!!

**VoBo Tutor,
Revisión de tesis de Maestría.**

CDMX a 31 de Agosto de 2017

Subcomité Académico

Yo Dr.: Samuel Canizales Quinteros

Tutor del estudiante: José Jaime Martínez Magaña

Manifiesto haber leído, revisado y corregido el manuscrito de tesis que lleva como título:

Asociación de polimorfismos en la región *TOMM40/APOE/APOC1* con diferentes enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas en población mexicana.

Por lo que autorizo a que sea entregado para su revisión a los sinodales que el Subcomité Académico asigne para la obtención del grado de Maestro en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente



Dr. Samuel Canizales Quinteros

RESUMEN.

Antecedentes. Las enfermedades mentales entran dentro del conjunto de patologías consideradas como enfermedades complejas, donde para la manifestación de la sintomatología debe de existir la suma de distintos factores. En estudios basados en familias se ha estimado que la heredabilidad de las enfermedades mentales se encuentra en un rango de 40 a 90%, por lo que abre la posibilidad de encontrar factores genéticos asociados a la etiología. En estudios recientes en poblaciones caucásicas, algunas variantes del gen *APOE* se ha reportado que presentan asociación con distintas enfermedades mentales, sin embargo, esta asociación no ha sido replicada en población mexicana.

Objetivo. Determinar la asociación de polimorfismos ubicados en la región *TOMM40/APOE/APOC1* con diferentes enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas en población mexicana.

Material y Métodos. Se realizó un análisis de asociación genética de 22 polimorfismos de la región *TOMM40/APOE/APOC1*, utilizando el microarreglo comercial Infinium PsychArray BeadChip de Illumina® como plataforma de genotipificación. Los individuos incluidos en el análisis fueron un total de 233 pacientes con diagnóstico confirmado de deterioro neurocognitivo mayor (DNM, N = 35), esquizofrenia (EZQ, N = 108), trastorno bipolar (TB, N = 68) e individuos diagnosticados dentro del trastorno del espectro autista (TEA, N = 22); además de un grupo de individuos considerados como controles, quienes no tuvieron diagnóstico de ninguna patología psiquiátrica (CT, N = 67). Para el análisis de las asociaciones genéticas, se realizaron modelos de regresión logística multivariada, así como la prueba de asociación basada en familias (DFAM), ambos análisis implementados en el programa PLINK. Las asociaciones

genéticas se consideraron estadísticamente significativas si el valor de p fue menor a 0.05, después de la corrección por número de pruebas, false Discovery rate (FDR) y 1000 pruebas de permutación. Además, las asociaciones fueron ajustadas por los 2 principales eigenvectores calculados con 200 marcadores informativos de ancestría, incluidos en el PsychArray, previamente reportados para corregir por estratificación poblacional en poblaciones de origen latinoamericano.

Resultados. En el presente análisis dos variantes en la región reguladora de la expresión de *APOE*, en el multi-enhancer 1 (ME1), mostraron asociación exclusivamente en pacientes de sexo femenino con EZQ, TB y TNM, **rs584007** (OR: 2.346; IC_{0.95}[1.33 - 4.133]; p-value:0.026) y **rs439401** (OR: 2.346; IC_{0.95}[1.331 - 4.133]; p-value:0.026).

Conclusiones. Los resultados sugieren la participación de variantes en el ME1 de *APOE* en el desarrollo de enfermedades mentales, en población mestiza mexicana.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

1.- ANTECEDENTES.....	Página
1.1.- Definición de Salud Mental y Enfermedad Mental.....	1
1.2.- Impacto de los Trastornos Mentales en México.....	1
1.3.- Diagnóstico de las Enfermedades Mentales.....	2
1.3.1 Diagnóstico del Trastorno del Espectro Autista (TEA).....	3
1.3.2 Diagnóstico de la Esquizofrenia (EZQ).....	3
1.3.3 Diagnóstico del Trastorno Bipolar (TB).....	4
1.3.4 Diagnóstico del Trastorno Neurocognitivo Mayor (TNM).....	5
1.4.- Traslape de Síntomas de las Enfermedades Mentales.....	5
1.5.- Etiología de las Enfermedades Mentales.....	6
1.6.- Factores genéticos de las Enfermedades Mentales.....	6
1.6.1.- Traslape de Genes en las Diferentes Enfermedades Mentales.....	7
1.7.- La región <i>TOMM40/APOE/APOC1</i> en las diferentes Enfermedades Mentales.....	9
1.7.1.- El Homólogo de levadura de la Translocasa de la Membrana Externa Mitocondrial 40 (<i>Tom40</i>) en las enfermedades mentales.....	11
1.7.2.- La Apolipoproteína E (ApoE) en las enfermedades mentales.....	12
1.7.3.- La Apolipoproteína C1 (ApoC1) en las enfermedades mentales.....	14
1.7.4.- ¿Por qué analizar la región de <i>TOMM40/APOE/APOC1</i> en las enfermedades mentales?.....	14
2.- OBJETIVOS.....	15
2.1.- Objetivo general.....	15
2.2.- Objetivos particulares.....	15
3.- HIPÓTESIS.....	16

4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
4.1.- Población de estudio.....	17
4.2.- Criterios de inclusión y criterios de exclusión de las pacientes.....	19
4.3.- Extracción y Control de Calidad de DNA genómico.....	19
4.4.- Genotipificación.....	20
4.5.- Análisis Estadísticos.....	21
5.- RESULTADOS.....	24
6.- DISCUSIÓN.....	30
7.- CONCLUSIÓN.....	35
8.- REFERENCIAS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS.....Página

Figura 1. Mapas del desequilibrio de ligamiento en las distintas poblaciones.....28

ÍNDICE DE TABLAS.....Página

Tabla 1. Resumen de la población de estudio.....17

Tabla 2. Polimorfismos incluidos en el Infinium® PsychArray que se encuentran dentro de la región *TOMM40/APOE/APOC1*.....22

Tabla 3. Resultados de la asociación de SNP's en la región *TOMM40/APOE/APOC1* sin estratificar por diagnóstico psiquiátrico.....25

Tabla 4. Resultado de la asociación de SNP's en la región *TOMM40/APOE/APOC1* estratificado de acuerdo al diagnóstico psiquiátrico.....26

Tabla 5 Resultados de la asociación de haplotipos en la región *TOMM40/APOE/APOC1* sin estratificar por diagnóstico psiquiátrico.....27

ABREVIATURAS

A1: Alelo con menor frecuencia en la población.

A2: Alelo con mayor frecuencia en la población.

AD: Enfermedad de Alzheimer, del inglés Alzheimer's Disease.

ADNP: Proteína neuroprotectora dependiente de actividad, del inglés Activity-Dependent Neuroprotector Protein.

AIM: Marcadores informativos de ancestría, del inglés ancestry informative markers.

APOC1: Gen de la Apolipoproteína C1.

ApoC1: Apolipoproteína C1 (proteína humana).

APOE: Gen de la Apolipoproteína E.

ApoE: Apolipoproteína E (proteína humana).

APP: Proteína Precursora Amiloide, del inglés amyloid precursor protein.

CEU: Población de residentes de Utah, con ancestría del Norte y Occidente de Europa reportada en la base de 1000 genomas.

DFAM: Análisis basado en familias para fenotipos de enfermedad, del inglés family-based association for disease traits.

DNA: Ácido Desoxiribonucleíco, del inglés desoxiribonucleic acid.

DNM: Pacientes con diagnóstico confirmado de Deterioro Neurocognitivo Mayor.

DSM: American Psychiatric Association's *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.

EZQ: Pacientes con diagnóstico confirmado de Esquizofrenia.

1000 genomas: Base de referencia de Genomas Completos de Distintas Poblaciones a lo largo del mundo.

HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg.

ICD – 10: World Health Organization's *International Classification of Diseases*.

LD: Desequilibrio de Ligamiento, del inglés linkage disequilibrium.

MA: Alelo con menor frecuencia en la población.

MAF: Frecuencia del Alelo Menor, del inglés minor allele frequency.

MXL: Población de ascendencia mexicana, que radica en Los Ángeles California, Estados Unidos de América, reportada en la base de 1000 genomas.

NAT: Población de ascendencia Nativa Mexicana.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido, del inglés single nucleotide polymorphism.

TB: Paciente con diagnóstico confirmado de Trastorno Bipolar.

TEA: Pacientes Diagnosticados con Trastorno del Espectro Autista.

TOMM40: Gen del Homólogo de levadura de la Translocasa de la Membrana Externa Mitocondrial 40.

UTR: Región no Traducida de un gene, del inglés untranslated región.

YRI: Población de residentes de Ibadan Nigeria, con ancestría Africana reportada en la base de 1000 genomas.

WHO = Organización mundial de la Salud, del inglés World Health Organization.

1.- ANTECEDENTES.

1.1.- Definición de Salud Mental y Enfermedad Mental.

La **Salud Mental**, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se define, como: “Un estado de bienestar en el cual los individuos son conscientes de sus propias capacidades, puede afrontar las tensiones normales de la vida, puede trabajar de forma productiva, fructífera y es capaz de hacer una contribución a su comunidad” incluye el bienestar subjetivo, autonomía, competencia, dependencia integral y reconocimiento de la habilidad de realizarse intelectual y emocionalmente ¹. En cambio, un **Trastorno Mental o Enfermedad Mental**, es una alteración de tipo emocional cognitiva o de comportamiento, en el que quedan afectados procesos psicológicos básicos, como: emoción, motivación, cognición, conciencia, conducta, percepción, sensación, aprendizaje, lenguaje; lo que dificulta a la persona su adaptación al entorno cultural y social en el que vive ¹.

1.2.- Impacto de los Trastornos Mentales en México.

Los trastornos mentales, constituyen uno de los mayores problemas de salud en todo el mundo, se calcula que en el continente americano hay 400 millones de personas con algún tipo de trastorno psiquiátrico y neurológico. Este tipo de padecimientos causan el 28% del total de la discapacidad causada por enfermedades y son responsables del 11.5% de la carga global. Además, se ha estimado que los trastornos mentales son responsables del 8.0% de los años perdidos de vida saludable (AVISA) ². La depresión es la principal causa de AVISA, con 40.7 días, la ansiedad con 31.5 días, el estrés postraumático con 25.8 días, el trastorno bipolar con 18.5 días, el trastorno de pánico con 18.5 días,

la fobia específica con 10.1 días, la fobia social con 12.7 días y el abuso del alcohol presenta 6.4 días ³.

En México, cinco de las diez enfermedades más incapacitantes, son psiquiátricas (esquizofrenia, depresión, trastorno obsesivo compulsivo, alcoholismo y demencia). La prevalencia de padecimientos mentales en general es de alrededor del 25% y se espera que el índice de enfermos se incremente ^{4,5}. Los resultados obtenidos en la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica realizada en el 2000, señalan que los trastornos de ansiedad ocupan el 18.5%, seguido por los trastornos afectivos con 11.2%, después aparece el abuso de alcohol con el 17% y el trastorno con menor proporción es el trastorno de uso de sustancias con un 0.44% ^{2,4}.

1.3.- Diagnóstico de las Enfermedades Mentales.

En el área de la psiquiatría dos de las principales herramientas para clasificar y diagnosticar a las enfermedades mentales ampliamente utilizadas a lo largo del mundo, son: el **American Psychiatric Association's *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*** (DSM) y el **World Health Organization's *International Classification of Diseases*** (ICD). La clasificación y diagnóstico implementados tanto en el DSM, como el ICD, se basan en una serie de síntomas y signos; que pueden ser incluidos como únicos de cada trastorno. En un esfuerzo para unificar los criterios diagnósticos, las últimas versiones de estos manuales (DSM-5 e ICD - 10) prácticamente comparten los mismos códigos para los diagnósticos ⁶. Debido a que en el presente estudio se incluirán pacientes de cuatro trastornos diferentes, Trastorno del Espectro Autista (TEA), Esquizofrenia (EZQ), Trastorno Bipolar (TB) y Trastorno

Neurocognitivo Mayor (TNM); a continuación solo se describirán los criterios del DSM-5, para el diagnóstico de estas patologías.

1.3.1.- Diagnóstico del Trastorno del Espectro Autista (TEA).

El diagnóstico del espectro autista se basa en tres grandes síntomas: disminución de la interacción social, disminución de la comunicación social y patrones de comportamiento repetitivos ⁷⁻⁹. Los síntomas pertenecientes al grupo de disminución de la interacción social, hace referencia a la disminución de signos de comunicación no-verbal, como puede ser no realizar contacto visual con las personas, iniciar y responder a una sonrisa u abrazo cariñoso. Mientras que la disminución de la comunicación social, hace referencias a una disminución de la habilidad para conversar de forma no verbal o verbal ¹⁰.

1.3.2.- Diagnóstico de la Esquizofrenia (EZQ).

Las bases del diagnóstico de la esquizofrenia se fundamentan en tres raíces, la Kraepeliana donde se hace énfasis en la abulia, cronicidad y pobre desempeño, Bleureliana que se enfoca principalmente en los síntomas negativos y Scheinederiana que se enfoca en los síntomas positivos ^{11,12}. Sin embargo, la definición de esquizofrenia, ha evolucionado a largo de los años, desde el inicio de su diagnóstico. En el DSM-5, la esquizofrenia se diagnostica basándose en seis criterios (A-F). Siendo los síntomas presentes en criterio A los más importantes y característicos de la enfermedad.

Conformando el criterio A se encuentran cinco síntomas: 1) Delirios, 2) Alucinaciones, 3) Discurso desorganizado, 4) Comportamiento catatónico y desorganizado, y 5) Síntomas negativos; por ejemplo, alogia, abulia, afecto aplanado. El conjunto de síntomas que presenta un paciente para poder ser diagnosticado con esquizofrenia, debe de incluir al menos uno de los ítems del

1 al 3 y debe de presentarse por lo menos con una duración de un mes. Para la confirmación del diagnóstico de esquizofrenia se deben de considerar los siguientes criterios (B a F), ¹³: B) Disfunción social u ocupacional, C) Duración, que la perturbación persista por lo menos seis meses, D) Excluir un diagnóstico de desorden del ánimo o ser esquizoafectivo, E) Incluir una perturbación del ánimo o general ocasionada por el consumo de sustancias, F) Identificar su relación con Espectro Autista (TEA).

1.3.3.- Diagnóstico del Trastorno Bipolar (TB).

El concepto de TB comprende al menos la ocurrencia de un episodio de manía e hipomanía, o un episodio mixto. El episodio es usualmente, pero no necesariamente, precedido o seguido de por lo menos un episodio depresivo; así como también cambios cíclicos de humor ¹⁴. Dentro de la subclasificación del TB, existen dos tipos: A) TB de tipo I y B) TB de tipo II. La subclasificación del TB se basa en la severidad de los síntomas. Siendo el TB de tipo I, caracterizado por al menos un episodio de manía. A diferencia del TB de tipo II, que se caracteriza por un episodio de depresión, un episodio de hipomanía, pero que nunca ha experimentado un episodio de manía ¹⁵.

1.3.4.- Diagnóstico del Trastorno Neurocognitivo Mayor (TNM).

Los criterios de diagnóstico del TNM involucra la identificación de disminución en la memoria y en un dominio cognitivo adicional. La deficiencia a nivel cognitivo puede causar una disminución en la funcionalidad social u ocupacional, determinado a partir de dos puntos de referencia temporales ¹⁶. En el DSM-5, se incluye una lista de dominios cognitivos que están incluidos en el deterioro menor y mayor, que son¹⁷: A) Atención compleja, que incluye atención sostenida, atención dividida, atención selectiva y discurso de procesamiento del

lenguaje, B) Funciones ejecutivas, que incluyen planeación, decisión, memoria de trabajo, C) Aprendizaje y memoria, D) Lenguaje, E) Función motora perceptible, F) Cognición social.

1.4.- Traslape de Síntomas entre las diferentes Enfermedades Mentales.

Los sistemas de diagnósticos empleados actualmente para las enfermedades mentales, el DSM - 5 y el ICD - 10, se caracterizan por su forma categórica de clasificar a las Enfermedades Mentales. Un gran problema generado a partir del diagnóstico de las enfermedades mentales basado en sistemas categóricos, es el sobrelape de síntomas compartidos entre las diferentes patologías psiquiátricas¹⁸. El sobrelape sintomatológico de las enfermedades mentales, conllevan a que muchos pacientes sean diagnosticados en estratos diagnósticos distintos a lo largo de su vida¹⁹. Un ejemplo de sobrelap entre los síntomas es la aparición de delirios y alucinaciones entre la EZQ, TB y pacientes diagnosticados dentro de TEA. Otro ejemplo de sobrelape de sintomatología es la presencia de deterioro cognitivo en EZQ, síndrome de déficit de atención e hiperactividad y los pacientes diagnosticados dentro del TEA²⁰. Existen algunos reportes donde el sobrelape fenotípico correlaciona con modificaciones comunes a nivel de cambios estructurales cerebrales, así como mecanismos moleculares comunes en la sintomatología compartida de las enfermedades mentales ²¹.

1.5.- La Etiología de las Enfermedades Mentales.

Las enfermedades mentales son consideradas enfermedades complejas. Las enfermedades complejas son un grupo de enfermedades, en las cuales la manifestación de la sintomatología es la suma de distintos factores, que juntos confieran un mayor riesgo para el desarrollo de la sintomatología ²². Los factores

de riesgo de las enfermedades complejas, generalmente pueden dividirse en dos grandes grupos, ajenos al paciente y factores propios del paciente. Dentro de los factores ajenos al paciente pueden incluirse los factores ambientales. Mientras que dentro de los factores propios del paciente se pueden incluir, las variaciones genéticas, el sexo, la edad y el estilo de vida ²³. Uno de los factores que recientemente ha tomado mucha fuerza para tratar de explicar la etiología de las distintas enfermedades mentales, ha sido el estudio del **Factor Genético** ²⁴. En el siguiente apartado se resumen algunos de los avances que se han realizado en relación al estudio del factor genético en las distintas enfermedades mentales.

1.6.- Factor genético de las Enfermedades Mentales.

Los estudios basados en familias, incluyendo los estudios de gemelos y de adopción, permiten calcular la heredabilidad de una enfermedad, incluidos los trastornos mentales ^{25,26}. La heredabilidad de los trastornos mentales varía de acuerdo al trastorno considerado, con límites bajos reportados del 40% para desórdenes de ansiedad; mientras que existe un aumento hasta del 60 a 90% para EZQ, trastorno de déficit de atención e hiperactividad o TB²⁷. Las altas heredabilidades de los trastornos mentales proveen una fuerte evidencia de que existen factores genéticos involucrados en la etiología de los trastornos mentales²⁸.

1.6.1.- Traslape de Genes en las Diferentes Enfermedades Mentales.

La alta heredabilidad de las enfermedades mentales nos da la pauta para poder aplicar estudios de asociación genética, para determinar variantes involucradas que podrían estar jugando un papel importante en la etiología de las enfermedades mentales²⁹. El análisis de variantes genéticas en el estudio de las enfermedades mentales, había tenido la dificultad de tratar de estudiar a las

distintas patologías como entidades completamente diferentes, sin ningún factor de riesgo en común a lo largo de los diferentes diagnósticos. Sin embargo, como se expuso anteriormente, se han realizado múltiples reportes donde se establece que diferentes características fenotípicas se comparten a través de las diferentes enfermedades psiquiátricas. Además, de que existe una alta comorbilidad de distintas enfermedades psiquiátricas dentro de un solo estrato diagnóstico³⁰⁻³³. El sobrelape fenotípico y la alta incidencia de comorbilidad neuropsiquiátrica en los diferentes trastornos sugieren que existe un sobrelape de variantes genéticas, que tengan el mismo efecto a través de las distintas enfermedades psiquiátricas y en la etiología de estas enfermedades. El análisis del sobrelape genético a lo largo de los diferentes trastornos psiquiátricos ha aumentado, gracias al desarrollo y al bajo costo de nuevas tecnologías, que permiten evaluar grandes cantidades de variantes genéticas por paciente; por ejemplo, los escaneos de genoma completo basado en microarreglos, las técnicas de secuenciación masiva de DNA, entre otras.

Se han realizado diferentes estudios, con diferentes enfoques analíticos, para poder determinar el posible sobrelape de variantes genéticas con efecto común a través de las diferentes enfermedades mentales. En un estudio realizado por el Cross-Disorders Group of the Psychiatric Genomics Consortium (PGC, por sus siglas en inglés), utilizando un enfoque de metanálisis de GWAS (GWAS, por sus siglas en inglés, Genome-Wide Association Study) en una cohorte con 33,332 casos y 27,888 controles en cinco enfermedades psiquiátricas, incluidas EZQ, TB, depresión mayor, TEA y trastorno de déficit de atención e hiperactividad, se identificaron cuatro variantes genéticas significativamente asociadas a los cinco trastornos. Las variantes asociadas a

los cinco diagnósticos se encuentran en los genes *ITIH3*, *CNNM2*, *CACNA1C* y *CACNB2*. De estos cuatro genes dos forman parte de las subunidades de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L ³⁴. En estudios de casos-contrroles, donde solo se consideran cohortes con un solo diagnóstico, polimorfismos dentro de la región del gen *CACNA1C* han mostrado significancia estadística a nivel de escaneo amplio de genoma, con algunas patologías como el caso de EZQ y TB ³⁵⁻³⁸.

Aun cuando los estudios de GWAS son poderosos para observar variantes genéticas asociadas a las enfermedades mentales de forma individual o en conjunto. Los descubrimientos realizados con la metodología de GWAS solo explican una pequeña parte de la varianza fenotípica de las diferentes enfermedades mentales³⁹. Sin embargo, en épocas recientes y con el avance en las tecnologías de secuenciación, ha sido posible identificar variantes que se encuentran en muy baja frecuencia en la población, menor al 1%, pero que tendrían un gran impacto en el fenotipo de las enfermedades mentales, un ejemplo son las variantes en el número de copias (CNVs, por sus siglas en inglés, copy number variants). En lo referente a CNV's, muchos estudios han demostrado claramente un enriquecimiento de CNV's en pacientes con EZQ y pacientes con TEA, al compararse con individuos sanos ⁴⁰⁻⁴². En el caso de TB, la relación de CNV's aún no es clara. En algunos reportes se establece que existe un aumento de la frecuencia de CNV's generalmente en individuos con edades tempranas de inicio del padecimiento ⁴³⁻⁴⁵.

1.7.- La región *TOMM40/APOE/APOC1* en las diferentes Enfermedades Mentales.

En estudios recientes donde se realizó un meta-análisis de distintas enfermedades mentales, así como de un conjunto de metodologías de análisis realizadas hasta ese momento, se reportaron trece variantes genéticas que fueron comunes a una o más patologías psiquiátricas. Dentro del conjunto de variantes asociadas a las distintas patologías psiquiátricas, las variantes de *APOE* (Apolipoproteína E) mostraron asociación, principalmente el alelo E4 de esta proteína ²⁹. Además, las variantes genéticas que codifican para las isoformas de *APOE* se han asociado consistentemente y en distintas poblaciones con la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano ^{46,47}. Las variantes que codifican para las isoformas proteicas de *APOE*, son dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que codifican para un cambio de aminoácido en ApoE. El SNP rs429358 (TGC ⇒ CGC) promueve un cambio de un residuo de cisteína (Cys) por un residuo de arginina (Arg) en la posición 112 de la proteína, mientras que el SNP rs7412 (CGC ⇒ TGC) promueve un cambio de un residuo de Arg por un residuo de Cys en la posición 158 de la proteína. Derivado de las combinaciones de los dos SNPs, surgen tres alelos y tres isoformas proteicas distintas, comúnmente referidas como E2, E3, E4. El alelo E2 de *APOE*, codifica para una proteína con un residuo de Cys en ambas posiciones de la proteína, el alelo E3 codifica para un residuo de Cys en la posición 112 y un residuo de Arg en la posición 158, mientras que el alelo E4 codifica para una proteína con Arg en ambas posiciones de la proteína ⁴⁸. Sin embargo, la asociación de las isoformas de *APOE* con otras patologías psiquiátricas no han mostrado resultados concluyentes ^{49,50}. En la literatura se

han asociado las diferentes isoformas de ApoE con un mayor riesgo para desarrollar EZQ, TB y depresión mayor, sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado en población de ascendencia caucásica o afroamericana. En relación a la asociación entre *APOE* en las distintas patologías psiquiátricas, en población mexicana, el número de estudios es reducido ⁵¹⁻⁵³.

Las variantes más estudiadas en las enfermedades mentales, han sido aquellas que codifican las dos isoformas proteicas principales de ApoE. Sin embargo, en el estudio de GWAS de la enfermedad de Alzheimer, las variantes con asociaciones más fuertes, se encuentran en regiones fuera del exón 4 de *APOE* (exón donde se codifica los SNP's que codifican las isoformas proteicas) y además, estas variantes con asociación se encuentran distribuidos en una región que comprende tres genes, desde el centrómero al telómero, *TOMM40* (**Translocasa de la Membrana Externa Mitocondrial 40**), *APOE* (**Apolipoproteína E**) y *APOC1* (**Apolipoproteína C1**)⁵⁴⁻⁵⁷. La región de *TOMM40/APOE/APOC1* comprende alrededor de 28 000 pb desde la región 5'-UTR (región no traducida, del inglés untranslated region), de *TOMM40* hasta la región 3'-UTR de *APOC1*. En lo referente a las regiones donde se encuentran codificados cada uno de los genes. Su tamaño es de aproximadamente 12469 pb para *TOMM40* (45394477 a 45406946 pb; coordenadas basadas en el hg19), 3611 pb para *APOE* (45409039 a 45412650 pb), mientras que la región donde se encuentra *APOC1* es de 5029 pb (45417577 a 45422606 pb). En las regiones intergénicas, se encuentran elementos que regulan la expresión de *APOE*, por ejemplo el elemento ME1 (multi-enhancer 1), que regula la expresión de *APOE* de forma tejido específico⁵⁸. Los elementos en cis, como el ME1, regulan la expresión de *APOE* de forma tejido específico, donde la regulación de la

expresión depende de los diferentes factores de transcripción que se encuentren expresados en el tejido, en ese momento⁵⁸. En estudios en poblaciones de origen europeo, se ha establecido que los polimorfismos en el ME1, se encuentran en alto desequilibrio de ligamiento (LD), con las isoformas de la proteína, lo cual hace factible que el efecto patológico de las isoformas de *APOE* y las variaciones en el ME1 pudieran tener un efecto sinérgico en la etiología de las enfermedades mentales⁵⁹. Además, las variantes genéticas en regiones que regulan la expresión, han estudiadas ampliamente en enfermedades mentales⁶⁰. Debido a que algunas de las variantes reguladoras podrían estar incluidas en regiones no codificantes de ApoE, por lo que estudiar la variación genética de estas regiones genómicas podría ser relevante en el estudio de las enfermedades mentales. Además, de que estudiar la variación genética en las regiones reguladoras nos permitirá establecer posibles mecanismos de regulación de la expresión genética, no solo en las enfermedades mentales, en búsqueda de posibles nuevos tratamientos.

1.7.1.- Gen homólogo de levadura de la Translocasa de la Membrana Externa Mitocondrial 40 (*TOMM40*) en las enfermedades mentales.

Las isoformas proteicas de *APOE*, son los que más consistentemente se han asociado en la literatura con el deterioro cognitivo no solo en la AD, sino también en enfermedades como el TB y la EZQ. Sin embargo, existen variaciones en otros genes que se han descubierto recientemente, que podrían tener influencia en el deterioro neurocognitivo, como es el caso de las variantes en el gen *TOMM40*. De manera interesante, en población caucásica las variaciones genéticas en la región de *TOMM40*, se encuentran en alto desequilibrio de ligamiento con las variantes genéticas que dan origen a las

isoformas de ApoE, lo cual sugiere que variantes genéticas podrían estar influenciando a estos dos genes de forma sinérgica ^{59,61}. Además, las variantes en el gen *TOMM40*, también se han asociado a otras enfermedades psiquiátricas como es el caso de depresión mayor ⁶². Sumado a esto, en el caso del deterioro neurocognitivo, Tom40 se ha asociado con una mayor progresión del deterioro. En algunos reportes se establece que la Tom40 forma complejos estables con la proteína precursora amiloide (*APP*) en las mitocondrias de los pacientes con AD. El aumento de la formación de complejos entre la *APP* y Tom40, principalmente formados en corteza prefrontal, amígdala e hipocampo, promueve una disminución de la actividad mitocondrial. Además, los individuos portadores del alelo E4 de *APOE*, presentaron niveles más altos de complejos de APP en la mitocondria, estableciendo un posible efecto sinérgico de *APOE* y Tom40 ^{63,64}.

1.7.2.- La Apolipoproteína E (ApoE) en las enfermedades mentales.

En relación a los genes de susceptibilidad para algunas de las enfermedades mentales, el gen de la apolipoproteína E (19q13.2) es el factor de riesgo más consistentemente asociado con la enfermedad de Alzheimer, especialmente en los individuos que portan el alelo E4 ^{65,66}. La ApoE, es una glicoproteína de 34 kDa con 299 aminoácidos, fue identificada en 1970, formando parte de lipoproteínas con alta concentración de lípidos en modelos animales con alta ingesta de colesterol ⁶⁷⁻⁷⁰. La ApoE se sintetiza en diferentes tejidos incluyendo el hígado, cerebro y en los macrófagos ⁷¹. La ApoE, estructuralmente presenta dos dominios funcionales, uno amino terminal y otro carboxilo terminal, unidos entre sí por un puente flexible ^{72,73}. En el dominio amino terminal se encuentra la región de unión a los receptores de ApoE (residuos 136 – 150), mientras que en el dominio carboxilo terminal se encuentra

la región de unión a lípidos (residuos 244 – 272). La ApoE, en el plasma se encuentra asociada con las lipoproteínas de baja densidad (LDL, low-density lipoprotein), lipoproteínas de muy alta densidad (VLDL, very-low density lipoprotein), proteínas de alta densidad (HDL, high-density lipoprotein) y quilomicrones. Aunque se han identificado muchas funciones en diferentes tejidos para la ApoE, la función principal en el sistema periférico es la de transportar triglicéridos, fosfolípidos, ésteres de colesterol y colesterol a las células; mediando la unión e internalización de estas partículas lipoproteicas ⁷⁴. La internalización de las partículas lipoproteicas es mediada por la unión de la ApoE a la familia de receptores de las LDL ⁷⁵. En el sistema nervioso central (SNC), la ApoE, es sintetizada principalmente por los astrocitos o bajo ciertas condiciones patológicas por las neuronas ^{67,68,76,77}. En el SNC, la ApoE regula la llegada de colesterol hacia las neuronas ^{78,79}. La homeostasis de colesterol es importante para las funciones normales del cerebro, debido a que es esencial para el crecimiento axonal, la formación sináptica, así como eventos de remodelación cruciales en el proceso de aprendizaje y la memoria ^{80,81}. Algunas enfermedades mentales como la EZQ y el TB, sufren modificaciones en la estructura sináptica, en las espinas dendríticas y en la mielina a lo largo del transcurso de la enfermedad ⁸²⁻⁸⁵. Las alteraciones neuronales presentes en las diferentes enfermedades psiquiátricas, podrían explicarse mediante la desregulación de los niveles de colesterol en el SNC. Los pacientes con algunas enfermedades mentales como depresión, TB, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y TEA, presentan una desregulación de los niveles de colesterol en el cerebro ^{84,86,87}. Las posibles alteraciones estructurales en las neuronas observadas en las diferentes enfermedades mentales, podrían

correlacionar con el efecto de la ApoE en la regulación del colesterol a nivel del SNC ⁸⁸.

1.7.3.- La apolipoproteína C1 (ApoC1) en las enfermedades mentales.

Existen muy pocos estudios que correlacionen variantes en *APOC1* con alguna enfermedad mental. Sin embargo, existe un reporte de que en población de ascendencia china, un haplotipo en la región de *APOC1* podría estar actuando de forma sinérgica sobre el deterioro neurocognitivo en pacientes con AD de inicio tardío ⁸⁹. Además, en un modelo animal de ratón transgénico, donde se introdujo el haplotipo de riesgo de *APOC1*, la capacidad de aprendizaje y memoria de estos ratones disminuye significativamente, al compararse con ratones wild type ⁹⁰. Lo cual sugiere que la ApoC1, podría tener un papel modulador no solo en la progresión de la AD, sino también en el desarrollo de estructuras a nivel cerebral.

1.7.4.- ¿Porque analizar la región de *TOMM40/APOE/APOC1* en las enfermedades mentales?

La poca información con la que se cuenta en relación a la posible asociación existente entre polimorfismos dentro de la región de *TOMM40/APOE/APOC1* y las enfermedades psiquiátricas, nos abre las puertas para la realización del presente estudio; el cual tiene el objetivo principal de evaluar la relación existente entre polimorfismos en la región de *TOMM40/APOE/APOC1* en cuatro enfermedades psiquiátricas, TEA, EZQ, TB y TNM en población mexicana. La población mestiza mexicana tiene la particularidad de tener la ascendencia de tres poblaciones, lo cual hace que el genoma del mestizo mexicano sea un reto para realizar estudios de asociación genética en nuestra población⁹¹.

2.- OBJETIVOS.

2.1.- Objetivo general.

- Caracterizar los polimorfismos dentro de la región *TOMM40/APOE/APOC1* y su posible relación con diferentes Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas en Población Mexicana.

2.2.- Objetivos particulares.

- Realizar un estudio de asociación genética de los polimorfismos dentro la región *TOMM40/APOE/APOC1*, sin estratificar por patología psiquiátrica.
- Estratificar el estudio de asociación genética de polimorfismos dentro de la región *TOMM40/APOE/APOC1* de acuerdo a su diagnóstico psiquiátrico.
- Realizar un estudio de asociación genética basado en haplotipos con los polimorfismos que se encuentren dentro la región *TOMM40/APOE/APOC1*, sin estratificar por patología psiquiátrica y estratificando de acuerdo a su diagnóstico.

3.- HIPÓTESIS.

Existirá asociación de algunos polimorfismos en la región de *TOMM40/APOE/APOC1*, que confieran un mayor riesgo a desarrollar enfermedades psiquiátricas.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1.- Población de estudio.

En el estudio se incluyeron pacientes previamente reclutados en distintos hospitales de la Ciudad de México, que fueron concentrados en el Laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas, Neurodegenerativas y Adicciones (LGEPNyA) del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Un total de 300 pacientes fueron considerados para el estudio. Los individuos considerados en el análisis se dividieron en cinco grupos, de acuerdo a su diagnóstico psiquiátrico, los grupos considerados fueron: Trastorno del Espectro Autista (TEA), Trastorno Bipolar (TB), Esquizofrenia (EZQ), Trastorno Neurocognitivo Mayor (TNM) y Controles (CT). Un breve resumen de los datos sociodemográficos de los pacientes se encuentran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Resumen de la población de estudio.

	TEA (n = 22)	TB (n = 68)	EZQ (n = 108)	TNM (n = 35)	CT (n = 67)
Edad ^a	5.78(±3.80)	37.75(±13.94)	35.61(±12.09)	74.87(±6.61)	34.36(±12.70)
Sexo ^b					
Femenino	2(9.09)	37(54.41)	44(40.74)	27(77.14)	40(59.70)
Masculino	20(90.91)	31(45.59)	64(59.26)	8(22.86)	27(40.30)
Escolaridad ^a	NA	12.67(±3.98)	10.39(±3.75)	4.55(±3.97)	13.12(±5.19)
<i>Relación Familiar^c</i>					
No Relacionados	22	34	60	35	67
Pares de Hermanos Concordantes	NA	34	48	NA	NA

a La edad se representa como media de años, ± desviación estándar.

b El sexo se representa entre número total y entre paréntesis porcentaje.

c La relación familiar, se representan los individuos que presentan relación filial de hermanos.

Los pacientes considerados en el grupo de TEA, son un total de 22 pacientes no relacionados con diagnóstico confirmado dentro del Trastorno del Espectro Autista. Los pacientes fueron reclutados y diagnosticados por paidopsiquiatras del Hospital Psiquiátrico Infantil “Dr. Juan N. Navarro”. Dentro del grupo de TB se incluyeron un total de 68 pacientes. Del total de pacientes, 34 pacientes no relacionados, mientras que 34 pacientes son pares de hermanos

concordantes (Un par de hermanos concordantes son aquellos donde ambos hermanos son diagnosticados con el trastorno). Los pacientes dentro del grupo de TB fueron reclutados y diagnosticados por psiquiatras del Grupo Médico Carracci. El grupo considerado como esquizofrenia (EZQ) se incluyeron un total de 108 pacientes. Del total de individuos considerados 60 pacientes son individuos no relacionados mientras que 48 individuos son pares de hermanos concordantes. Los pacientes dentro del grupo de EZQ fueron reclutados y diagnosticados por psiquiatras del Grupo Médico Carracci. En lo referente al grupo de Trastorno Neurocognitivo Mayor (TNM) se incluyeron 35 pacientes no relacionados. Los pacientes dentro del grupo de TNM fueron reclutados y diagnosticados por psiquiatras del Hospital Psiquiátrico Fray Bernardino Álvarez. En el grupo considerado como control (CT) se incluyeron un total de 68 individuos no relacionados. Los individuos del grupo CT, fueron reclutados en el Grupo Médico Carracci. Todos los pacientes considerados en el grupo CT fueron evaluados por psiquiatras, para descartar alguna patología psiquiátrica. Tomando como referencia este tamaño de muestra y las enfermedades mentales como un conjunto, una frecuencia alélica de 5%, una prevalencia de la enfermedad del 1% y bajo un modelo aditivo, obtenemos un poder estadístico del 38.57% ^{92,93}.

Para ser considerados en el análisis genético, todos los participantes firmaron consentimiento informado para individuos mayores de edad o un asentimiento informado en caso de menores de edad. El protocolo fue aprobado por el comité de Ética del INMEGEN (No. de aprobación **23/2015/I**).

4.2.- Criterios de Inclusión y Criterios de Exclusión de los Pacientes.

4.2.1.- Criterios de Inclusión.

- Casos: Pacientes con diagnóstico confirmado dentro del TEA, TB, EZQ o TNM.
- Controles: no presentar diagnóstico de TEA, TB, EZQ o TNM.

4.2.2.- Criterios de Exclusión.

- Controles: todos aquellos individuos que tuvieron intentos suicidas, adicción a drogas o algún diagnóstico confirmado de alguna patología psiquiátrica.
- En lo referente al DNA, muestras que no cumplieran el control de calidad para el DNA.
- En lo referente a la calidad de genotipificación, individuos que no cumplieran con más del 90% de genotipificación.

4.3.- Extracción y Control de Calidad de DNA genómico.

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica y/o a partir de células de epitelio bucal. Para la extracción del ADN genómico se utilizó un método modificado de salting – out, implementado en el kit de extracción de DNA Genra Puregen Cell® (Quiagen, Basel, Switzerland). El protocolo de extracción del DNA, se realizó de acuerdo a lo establecido por el proveedor. Una vez extraído el DNA genómico, se realizaron controles de calidad para el DNA extraído de todas las muestras que se incluyeron en el análisis. Los controles de calidad implementados, se basan en dos metodologías: la cuantificación espectrofotométrica del DNA y la calificación cualitativa de la integridad del DNA. La cuantificación espectrofotométrica se realizó en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados

Unidos), para determinar la concentración de DNA; así como la absorbancia a 230 nm, 260 nm y 280 nm. Las absorbancias a las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm y 280 nm se utilizan para calcular dos índices: **260/230** y **260/280**. Los índices 260/230 y 260/280 son el cociente de las absorbancia registrada a las longitudes de onda 230 nm, 260 nm y 280 nm; para cada muestra. El cálculo de los índices indica una referencia de posibles contaminantes presentes en el DNA. Ambos índices debieron tener un valor **igual o mayor de 1.8** para ser considerados en el análisis. El segundo control de calidad del DNA, la calificación cualitativa de la integridad del DNA, se realizó mediante un análisis electroforético en un gel de agarosa al 2.0% corrido durante 2 hrs a 110V con un marcador de peso molecular FastRuler High Range No. SM 1123 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). El DNA de los pacientes **no debería presentar signos de degradación, o como mínimo presentar DNA genómico**, para ser considerados en el análisis. Todo el procesamiento de las muestras se realizó en el LGEPNyA del INMEGEN.

4.4.- Genotipificación.

La genotipificación de todos los individuos se realizó en la Unidad de Microarreglos (UMi) del INMEGEN. La plataforma utilizada para la genotipificación fue el microarreglo comercial Infinium® PsychArray 24 BeadChip (Illumina, San Diego, USA). El protocolo de Genotipificación se realizó de acuerdo a lo establecido por el proveedor. El Infinium® PsychArray 24 BeadChip cuenta con un total de 588,628 polimorfismos distribuidos a lo largo de todo el genoma humano, por lo cual se extrajeron los genotipos de los polimorfismos incluidos en el microarreglo que se encontraban en la región que comprende los genes *TOMM40/APOE/APOC1*. Del total de polimorfismos en el microarreglo, se

extrajeron todos los polimorfismos que se encontraron en la región de *TOMM40/APOE/APOC1*, presentes en el PsychArray. Del total de polimorfismos, 22 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se encontraron en la región *TOMM40/APOE/APOC1*. Las características de los 22 SNP's, en la región de *TOMM40/APOE/APOC1*, se encuentran en la **Tabla 2**. Además también se extrajeron del PsychArray, 200 SNP's para el análisis de ancestría. Los 200 SNP's forman parte de un panel de marcadores informativos de ancestría (AIM's) previamente reportados para poblaciones de origen latinoamericano ⁹⁴, pero que se encuentran incluidos en el diseño del PsychArray.

4.5.- Análisis Estadísticos.

4.5.2.- Determinación de ancestría.

La determinación de ancestría se realizó mediante dos métodos, el primero fue mediante un análisis de componentes principales (PCA), implementado en el software GCTA (Genome Wide Complex Trait Analysis ⁹⁵), así como, un análisis de clusterización supervisado, implementado en el software Admixture ⁹⁶. Los dos análisis se realizaron utilizando el panel de AIM's, previamente extraídos del conjunto de polimorfismos genotipados con el microarreglo.

4.5.3.- Análisis de Asociación genética.

4.5.3.1- Análisis de Asociación genética basada en polimorfismos puntuales.

Debido a las diferentes estructuras familiares de los individuos incluidos en el análisis, las asociaciones genéticas se realizaron con la prueba DFAM (family-based association for disease traits) implementada en el software PLINK versión

1.07⁹⁷, en el caso de que individuos con relación familiar fueran considerados para el análisis. En el caso de que para el análisis de las asociaciones genéticas individuos sin relación filial fueran considerados, se realizaron modelos de regresión logística multivariada, implementados también en el software PLINK versión 1.07. Todos los modelos de regresión fueron ajustados mediante edad, género y 2 eigenvectores calculados a partir del análisis de PCA. Se consideró un valor de significancia estadística, si el valor de p corregido por FDR (False Discovery Rate) y 1000 pruebas de permutaciones, era menor o igual a **0.05**.

Tabla 2. Polimorfismos incluidos en el Infinium® PsychArray que se encuentran dentro de la región *TOMM40/APOE/APOC1*.

Chr ^a	SNP ^b	BP ^c	Gene	Predicción del efecto	Alelos
19	rs71352238	45394336	<i>TOMM40</i>	Variante Río Arriba (140 pb)	C/T
	rs157580	45395266		Intron1	G/A
	rs2075650	45395619		Intron1	G/A
	rs34404554	45395909		Intron2	G/C
	rs157582	45396219		Intron3	A/G
	rs8106922	45401666		Intron5	G/A
	rs1160985	45403412		Intron5	C/T
	rs142412517	45404058		R[Arg]239W[Trp]	T/C
	rs769449	45410002	<i>APOE</i>	Intron1	A/G
	rs769452	4541110		L[Leu]46P[Pro]	C/T
	rs429358	45411941		C[Cys]130R[Arg]	C/T
	rs769455	45412040		R[Arg]163C[Cys]	T/C
	rs376170967	45412056		R[Arg]168H[His]	A/G
	rs7412	45412079		R[Arg]176C[Cys]	T/C
	exm1479367	45412097		A[Ala]182S[Ser]	T/G
	rs72654473	45414399		Variante Intergénica	A/C
	rs439401	45414451		Variante Intergénica	C/T
	rs445925	45415640	<i>APOC1</i>	Variante Río Arriba (1863 pb)	T/C
	rs584007	45416478		Variante Río Arriba (1025 pb)	G/A
	rs72654456	45419555		K[Lys]56R[Arg]	G/A
	rs142372275	45422446		T[Thr]71S[Ser]	T/A

^a Cromosoma, ^b SNP: polimorfismo de un solo nucleótido, ^c BP: posición en pares de bases basado en el hg19

Los SNP's en la región de *TOMM40/APOE/APOC1*, fueron aquellos que se encontraron bajo equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), para considerarse en HWE los valores de p debieron ser mayores a 0.0001, calculados a partir de una prueba de χ^2 . Además del HWE, solo se consideraron SNP's con un porcentaje de genotipificación mayor al 90% y que tuvieran una frecuencia del alelo menor (MAF) mayor al 5%.

4.5.4.1.- Formación de haplotipos en la región *TOMM40/APOE/APOC1*.

Para analizar el LD en la región en las poblaciones YRI (Yoruba en Ibadan, Nigeria), CEU (Utah Residents with Northern and Western European Ancestry), NAT y en la población de estudio se utilizaron los genotipos presentes en la base de 1000 genomas para las poblaciones CEU y YRI, fueron tomados directamente de la base de datos ⁹⁸. Mientras que, para la población nativa mexicana, que consta de 43 individuos con ancestría NAT, genotipados en el Laboratorio de Genómica de Poblaciones del Instituto Nacional de Medicina Genómica, con el microarreglo comercial de Illumina Infinium Multi-Ethnic Global®, se utilizaron los marcadores genotipados directamente. Los valores de r^2 , se utilizaron para medir el desequilibrio de ligamiento (LD) entre cada par de polimorfismos ⁹⁹. La construcción de los mapas de calor de los valores de la comparación entre cada polimorfismo de los valores de r^2 de LD, se realizó en el paquete de R, LDheatmap, además de la anotación con las coordenadas de cada gen del UCSC Genome Browser ^{100,101}.

Una vez extraídos los polimorfismos en la región de cada una de las poblaciones, los cromosomas fueron faseados con un algoritmo implementado en el programa Beagle ¹⁰². Además de que algoritmos implementados en el software PHASE, se utilizaron para la reconstrucción de los haplotipos en los pacientes y también para los análisis de asociación basados en haplotipos. Un valor de p menor a 0.05, después de 1000 permutaciones fueron considerados estadísticamente significativos, para el análisis de asociación genética basada en haplotipos.

5.- RESULTADOS.

5.1.1.- Análisis de asociación de SNP's individuales en la región *TOMM40/APOE/APOC1* con las enfermedades mentales como un fenotipo común.

En este primer análisis se evaluaron las diferencias en las frecuencias alélicas de los SNP's, ubicados en la región de *TOMM40/APOE/APOC1*, entre los pacientes diagnosticados con alguna enfermedad mental, como un fenotipo común (TEA + EZQ + TB + TNM) y el grupo CT. Los resultados de la prueba DFAM, que incluye individuos emparentados y no emparentados, se encuentran en la **Tabla 3**. En este primer enfoque de análisis ningún polimorfismo en la región *TOMM40/APOE/APOC1*, presentó asociación estadísticamente significativa después de los ajustes por múltiples comparaciones. Sin embargo, cuatro polimorfismos en la región intergénica entre *APOE* y *APOC1* (rs72654473, rs439401, rs445925 y rs584007), mostraron diferencias en las frecuencias alélicas y asociación nominal antes del ajuste ($p < 0.05$).

En el análisis estratificado por sexo, las mujeres presentaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas para los SNP's, rs584007 ($p = 0.04625$), rs439401 ($p = 0.04625$) y rs445925 ($p = 0.04716$) al comparar los casos con fenotipo común y los controles; aunque la asociación no continuó significativa después del ajuste por múltiples comparaciones. Estos SNP's son los mismos que presentaron asociación en la muestra completa. En contraste, en los hombres ninguno de los SNPs se asoció significativamente con el fenotipo común ($p > 0.05$).

5.1.2.- Análisis de asociación de SNP's en la región *TOMM40/APOE/APOC1* con las enfermedades mentales estratificadas por diagnóstico psiquiátrico.

Al evaluar si los SNP's dentro de la región *TOMM40/APOE/APOC1* tenían un efecto sobre las diferentes patologías, la población se dividió para su análisis de acuerdo a su diagnóstico psiquiátrico, además para este análisis se consideraron únicamente individuos sin relación familiar entre ellos. Los resultados de las asociaciones se muestran en la **Tabla 4**. En el análisis de las patologías de forma individual, incluyendo los grupos de TEA, TB y ESQ, ningún polimorfismo se asoció significativamente al compararlos con el grupo control ($p < 0.05$). En lo referente al grupo de TNM, 7 polimorfismos se asociaron con esta patología al compararse con el grupo CT; sin embargo, éstas no permanecieron significativas después de ajustar por comparaciones múltiples.

Tabla 3. Resultados de la asociación de SNP's en la región *TOMM40/APOE/APOC1* sin estratificar por diagnóstico psiquiátrico.

CHR ^a	SNP	BP	GENE	A1	A2	OBS	EXP	CHISQ	Valor de p	Valor de p ajustado
19	rs71352238	45394336	<i>TOMM40</i>	C	T	49	46.1	0.8043	0.3698	1.0000
	rs157580	45395266		G	A	113	111.5	0.1054	0.7455	1.0000
	rs2075650	45395619		G	A	48	44.61	1.129	0.2881	1.0000
	rs34404554	45395909		G	C	47	43.87	0.9785	0.3226	1.0000
	rs157582	45396219		A	G	121	115.7	1.358	0.2438	1.0000
	rs8106922	45401666		G	A	164	168.6	0.8281	0.3628	1.0000
	rs1160985	45403412		C	T	174	166.3	2.357	0.1247	1.0000
	rs769449	45410002	<i>APOE</i>	A	G	41	40.15	0.07808	0.7799	1.0000
	rs7412	45412079		T	C	15	12.64	1.772	0.1832	1.0000
	rs72654473	45414399		A	C	23	18.66	4.172	0.04109	0.1479
rs439401	45414451		C	T	175	162.6	6.182	0.0129	0.09622	
rs445925	45415640	<i>APOC1</i>	T	C	26	20.82	5.295	0.02138	0.09622	
rs584007	45416478		G	A	174	161.7	6.145	0.01318	0.09622	
rs142372275	45422446		T	A	4	5.204	1.099	0.2945	1.0000	

^a Los resultados reportados son de una prueba de DFAM; las abreviaturas de la tabla son CHR: cromosoma, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido, BP: posición en pares de bases, GENE: abreviatura del gene, A1: alelo de frecuencia menor, A2: alelo de frecuencia mayor, OBS: frecuencia observada, EXP: frecuencia esperada, CHISQ: valor de chi cuadrada, Valor de p ajustado: ajustado por FDR y 1000 pruebas de permutación, para corregir por múltiples comparaciones.

Tabla 4. Resultado de la asociación de SNP's en la región TOMM40/APOE/APOC1 estratificado de acuerdo al diagnóstico psiquiátrico.

^a CHR	SNP	GENE	MA	TEA	TB	EZQ	TNM	CT
19	rs71352238	<i>TOMM40</i>	C	0.1136 (1.0000)	0.1000 (0.9931)	0.1090 (1.0000)	0.2097 (0.0926)	0.0956
	rs157580		G	0.2727 (1.0000)	0.3100 (0.9931)	0.2821 (1.0000)	0.2742 (1.0000)	0.2647
	rs2075650		G	0.1818 (0.3808)	0.0900 (0.9931)	0.1090 (1.0000)	0.2097 (0.0871)	0.0882
	rs34404554		G	0.1818 (0.3808)	0.0800 (0.9931)	0.1090 (1.0000)	0.2097 (0.0871)	0.0882
	rs157582		A	0.3864 (0.5051)	0.3000 (0.2687)	0.2692 (1.0000)	0.4194 (0.0942)	0.2463
	rs8106922		G	0.3636 (1.0000)	0.3800 (0.2687)	0.4423 (1.0000)	0.3333 (0.2491)	0.4632
	rs1160985		C	0.3864 (1.0000)	0.4600 (0.3423)	0.4156 (1.0000)	0.4839 (0.1661)	0.3603
	rs769449	<i>APOE</i>	A	0.1136 (1.0000)	0.0700 (0.9931)	0.0833 (1.0000)	0.2097 (0.0926)	0.0956
	rs7412		T	0.0227 (1.0000)	0.0500 (0.2364)	0.0256 (1.0000)	0.0323 (0.6604)	0.0147
	rs72654473		A	0.0682 (0.3808)	0.0700 (0.2148)	0.0321 (1.0000)	0.0645 (0.1549)	0.0149
	rs439401		C	0.3864 (0.7502)	0.4900 (0.2148)	0.4026 (1.0000)	0.4839 (0.0871)	0.3235
	rs445925	<i>APOC1</i>	T	0.0682 (0.3808)	0.0800 (0.2148)	0.0385 (1.0000)	0.0645 (0.1549)	0.0147
	rs584007		G	0.3864 (0.7502)	0.4900 (0.2148)	0.4026 (1.0000)	0.4833 (0.0871)	0.3235
	rs142372275		T	0.0000 (1.0000)	0.0100 (1.0000)	0.0064 (1.0000)	0.0323 (1.0000)	0.0221

^aLos resultados reportados son frecuencias alélicas en cada grupo y entre paréntesis se reportan los valores de p, calculados a partir de una regresión logística multivariable, ajustando por edad, género, FDR y 1000 pruebas de permutación para ajustar por comparaciones múltiples; MA: alelo de frecuencia menor, TEA: trastorno del espectro autista, TB: trastorno bipolar, EZQ: esquizofrenia, TNM: trastorno neurocognitivo mayor, CT: control.

Al realizar el análisis estratificando por sexo, en los hombres ningún SNP mostro diferencias estadísticamente significativas. A diferencia en las mujeres, dos SNP's en la región intergénica entre *APOE* y *APOC1* (rs439401 y rs584007), mostraron asociación nominal en los grupos EZQ, TB y TNM, al compararse con el grupo CT ($p < 0.05$). Sin embargo, ninguna de estas asociaciones continuó significativa después del ajuste por comparaciones múltiples.

5.2.- Análisis de asociación de haplotipos en la región TOMM40/APOE/APOC1.

Al comparar las frecuencias de los haplotipos obtenidos de 12 SNPs, entre los sujetos con diagnóstico de alguna patología psiquiátrica (TEA + EZQ + TB + TNM) y el grupo CT, el haplotipo H5 presentó asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En la **Tabla 5**, se muestran las frecuencias haplotípicas en la muestra total y en cada grupo de estudio.

Mientras, que el análisis estratificado de acuerdo al diagnóstico psiquiátrico, no presentó ningún haplotipo asociado con EZQ, para TNM los haplotipos H1 y H5, mostraron diferencias estadísticamente significativas. Es de llamar la atención, que los grupos de TEA y TB presentaron asociación con H1 y H5, respectivamente.

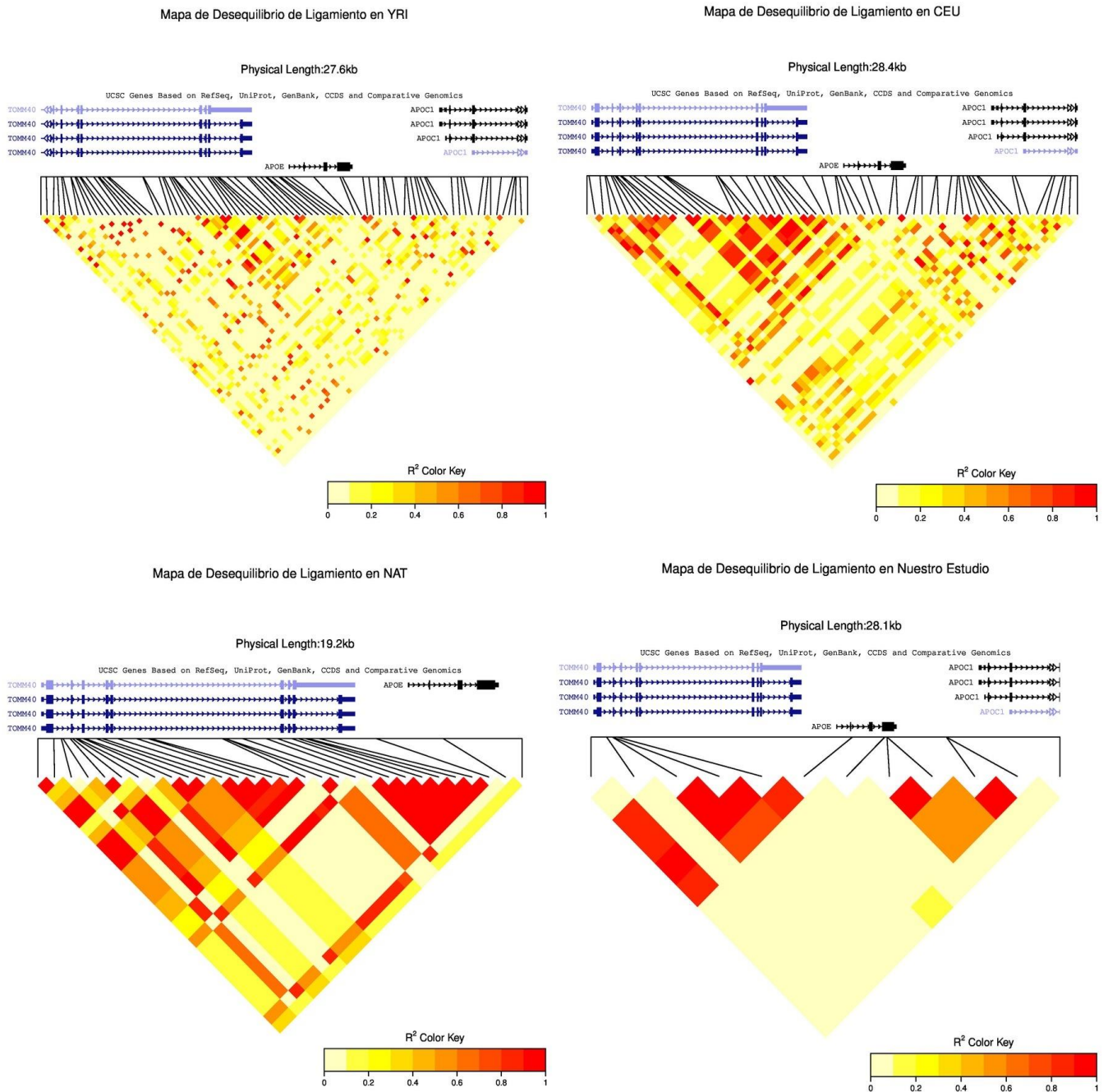
Tabla 5. Resultados de la asociación de haplotipos en la región TOMM40/APOE/APOC1 sin estratificar por diagnóstico psiquiátrico.

Haplotipo ^a	Muestra Total	TEA	EZQ	TB	TNM	CT
H1:CGGAACACCCGA ^b	0.09	0.11^c	0.06	0.07	0.19	0.06
H2:TACAATGCCCAA	0.13	0.19	0.12	0.10	0.16	0.15
H3:TACGACGCCCAA	0.23	0.21	0.25	0.23	0.21	0.21
H4:TACGGTGCCCGA	0.23	0.15	0.24	0.26	0.16	0.18
H5:TACGGTGCCCAA	0.19	0.21	0.22	0.14	0.16	0.29

^a Los resultados reportados son frecuencias haplotípicas. ^b Cada letra representa el alelo en orden, de los siguientes polimorfismos: rs71352238, rs2075650, rs34404554, rs157582, rs8106922, rs1160985, rs769449, rs7412, rs72654473, rs445925, rs584007, rs142372275. ^c En negro se reportan las diferencias en frecuencias haplotípicas estadísticamente significativas ($p < 0.05$, después de 1000 pruebas de permutación). TEA: trastorno del espectro autista, TB: trastorno bipolar, EZQ: esquizofrenia, TNM: trastorno neurocognitivo mayor, CT: control.

Para conocer cómo se encuentra la estructura de los haplotipos en la población estudio compara con otras poblaciones. Para ello, se comparó la estructura del bloque de desequilibrio de ligamiento de la muestra total de estudio y las tres poblaciones de referencia CEU, YRI y NAT. En la **Figura 1**, se muestran los mapas de calor del valor de r^2 de la comparación entre cada SNP en las cuatro poblaciones, como medida del desequilibrio de ligamiento (LD).

Figura 1. Mapas del desequilibrio de ligamiento en las distintas poblaciones.



En la figura se muestran los mapas de calor del valor de r^2 entre cada SNP, como medida del desequilibrio de ligamiento en las distintas poblaciones. Se reportan los valores de r^2 comparando dos SNP's entre sí. Los valores con bajo LD se encuentran más cercanos al color ámbar, mientras que valores de LD grandes se encuentran cercanos al color rojo. Mientras que, en la parte superior de las imágenes, cada línea representa la posición de cada SNP en el gene. CEU: población de ascendencia europea del norte de Utah, YRI: población yoruba de Ibadan, NAT: población nativa mexicana.

De acuerdo a este análisis, el LD observado en los bloques de las diferentes poblaciones es distinto en las cuatro poblaciones. Particularmente, en la población YRI todos los marcadores incluidos en el análisis se encuentran en bajo desequilibrio de ligamiento (promedio de $r^2 = 0.6432$). Mientras que en la población NAT, el bloque se acorta a una longitud de 19.2 kb y solo se encuentran en LD los SNP's ubicados en el gen *TOMM40* (promedio de $r^2 = 0.7915$). Mientras que en la población CEU, el bloque presenta un LD alto en la región que inicia en *TOMM40* hasta *APOE* (promedio de $r^2 = 0.7045$). De manera interesante, la población mexicana mestiza presentó dos bloques con un LD alto, uno que abarca desde el intron 1 de *TOMM40* hasta el intron 1 de *APOE*; y el otro desde el exon4 de *APOE* y hasta la región intergénica entre *APOE-APOC1*.

6.- DISCUSIÓN.

Muchos enfoques distintos de análisis se han desarrollado para tratar de esclarecer la patología de las enfermedades mentales, desde estudios genéticos funcionales en modelos animales hasta el modelado matemático de la sintomatología psiquiátrica ^{103,104}. Mientras que, con el desarrollo de nuevas tecnologías que nos permiten escanear el genoma humano a precios relativamente accesibles, nuevas puertas se están abriendo para el análisis del posible efecto que tienen las variaciones genómicas en las enfermedades mentales. Para tratar de explicar un pequeño aspecto de las variaciones genéticas en las enfermedades mentales, en el presente estudio se realizó un análisis de asociación de gen candidato, con polimorfismos en la región *TOMM40/APOE/APOC1* en población mexicana con diagnóstico de cuatro enfermedades mentales (TEA, EZQ, TB y TNM). En el primer enfoque de análisis se realizó un estudio de asociación de SNP's individuales sin estratificar por diagnóstico psiquiátrico, evaluadas como un "fenotipo común". Mientras que, en el segundo enfoque de análisis, los pacientes fueron separados de acuerdo al diagnóstico psiquiátrico.

La asociación encontrada en los dos enfoques de análisis, fue con polimorfismos en la región intergénica de *APOE* y *APOC1* (rs439401 y rs584007) en pacientes de sexo femenino de los grupos de EZQ, TB y TNM. En estudios funcionales en líneas celulares, la región donde se encuentran estos SNP's, es una región que tiene efectos en *cis* sobre *APOE* y *TOMM40*, conocida como el ME1. Se sabe que alelos de frecuencia menor en el ME1 pueden aumentar la expresión de *TOMM40* y *APOE*, en líneas de origen neuronal y hepático ⁶⁰. Mientras que, al evaluar los haplotipos con asociación H1 Y H5, los SNP's con

frecuencia menor dentro de los haplotipos se encuentran en la región del ME1 y el IVS2-4 ¹⁰⁵. La región IVS2-4, se encuentra en el intron 2 de *TOMM40* y se sabe que también presentan efectos en *cis* sobre la expresión de *TOMM40* y *APOE*. En el caso de líneas celulares de origen neuronal, el efecto de las variaciones en la región IVS2-4, aumentan la expresión de *APOE*, mientras que en la línea celular de origen hepático aumentan la expresión de *TOMM40*.

El efecto de variantes genéticas en la región de *TOMM40/APOE/APOC1* principalmente en regiones que actúan en *cis* y que encontramos que confieren un mayor riesgo al desarrollo de alguna patología mental, podría correlacionar con estudios a nivel de estructura cerebral realizados recientemente en la Universidad de Arizona. En este estudio se evaluó si las isoformas de *APOE* podrían tener un efecto no sólo en la progresión hacia deterioro neurocognitivo, sino que también podrían estar modulando el desarrollo cerebral temprano. El estudio fue realizado en niños de 2 a 25 meses, donde los portadores del alelo E4 presentaban una disminución de la materia gris en regiones temporo-mediales y temporo-laterales del cerebro, regiones del cerebro principalmente dañadas durante el deterioro cognitivo. Los cambios estructurales cerebrales en este grupo de niños los llevó a concluir que posiblemente los niños portadores del alelo E4, presentan una mayor predisposición a desarrollar deterioro neurocognitivo incluso desde etapas tempranas del desarrollo ¹⁰⁶. Al analizar la estructura de LD en la población de estudio, la región donde se encuentran las variantes que codifican las isoformas de *APOE* se encuentran en alto LD con las variantes reguladoras en *cis* que se encuentran en el ME1. Por lo que variaciones en las regiones reguladoras de la expresión de *APOE* de forma sinérgica a las isoformas proteicas de *APOE*, podrían estar apuntando a un mecanismo de

neurodesarrollo deficiente dependiente de *APOE* desde el TEA hasta el TNM. Los hallazgos encontrados en estos estudios podrían estar sustentando una de las hipótesis más fuertes para tratar de explicar la etiología de las enfermedades mentales, "la hipótesis del neurodesarrollo" ¹⁰⁷.

La hipótesis del neurodesarrollo establece de manera general que las alteraciones estructurales cerebrales observadas en las enfermedades mentales, provienen desde incluso etapas muy tempranas del desarrollo embrionario cerebral ¹⁰⁷. En estudios recientes en modelos animales de ratón que tratan de sustentar la hipótesis del neurodesarrollo, se expuso que en un ratón knock-out de la proteína dependiente de la actividad neuroprotectora (activity-dependent neuroprotective protein, *ADNP*), una de las proteínas con mayor asociación en TEA, regula de forma diferencial la expresión de ApoE dependiendo del género durante el desarrollo embrionario ^{108,109}. Se sabe que *ADNP* es esencial para el desarrollo cerebral, incluso juega un papel fundamental para el desarrollo embrionario, debido a que la completa deficiencia de *ADNP* en el ratón provoca que no exista cierre del tubo neural y una muerte embrionaria en las etapas E8.5-E9.5 del desarrollo embrionario del ratón ¹¹⁰. En relación al desarrollo diferencial del cerebro de acuerdo al género la proteína *ADNP* y ApoE podrían tener un papel sinérgico fundamental. En el mismo modelo de ratón, las hembras presentaron un efecto diferencial en la expresión de ApoE en el hipocampo incluso independientemente del genotipo en *ADNP*. Las hembras sin la mutación de *ADNP* durante el desarrollo embrionario, presentaron niveles al doble de mRNA de *ApoE* en el hipocampo en comparación a los machos sin la mutación, además de que en las hembras heterocigotas para la mutación de *ADNP* la concentración del mRNA se duplica nuevamente al

compararse con la concentración en las hembras sin la mutación de ADNP. Los cambios en los niveles de expresión de *ApoE* dependientes de *ADNP*, podrían relacionar a *ApoE* con un desarrollo cerebral dimórfico entre mujeres y hombres, lo cual podría apuntar a la correlación que existe entre las diferencias observables en la incidencia de las enfermedades mentales entre ambos sexos ¹¹¹. Como se expuso anteriormente las variantes en las regiones reguladoras del gen *APOE* con asociación en las mujeres, se encuentran en dos regiones conocidas como IVS2-4 y ME1. Las variaciones genéticas en estas regiones reguladoras de la expresión de *APOE* podrían estar modulando de forma diferencial la actividad transcripcional de este gen en momentos claves durante el desarrollo embrionario, lo cual conllevaría a establecer patrones de conexiones neuronales distintas entre hombres y mujeres, además de un posible cambio en los patrones de conexión neuronal durante el desarrollo de las enfermedades mentales entre hombres y mujeres.

El mecanismo molecular por el cuál la región IVS2-4 podría modular la expresión de *APOE* aún no ha sido caracterizado. Sin embargo, para la región ME1 se cuentan con varias hipótesis de su mecanismo molecular. La región ME1 es blanco de unión de un conjunto de receptores conocidos como receptores hepáticos tipo X (LXR), los cuales regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de esteroides, como la ApoE ¹¹². Los LXR son factores de transcripción activados por la unión de oxisteroides. En su estado basal los LXR forman heterodímeros con otro conjunto de receptores conocidos como receptores retinoides X (RXR), el heterodímero se une al DNA mediante unas secuencias conocidas, como elementos de respuesta a LXR (LXRE), con lo cual los LXR en su estado basal inhiben la expresión de sus genes blanco. Sin

embargo, cuando existe unión de un ligando de LXR, como el 24S-hydroxycholesterol, los LXR cambian su conformación y este cambio conformacional activa la transcripción de los genes blanco, como *APOE* y *ABCA1* ^{113–116}. Como se mencionó anteriormente, en el presente estudio las principales diferencias en frecuencias alélicas se encontraron a nivel del ME1, lugar de unión del complejo LXR-RXR, el cual regula la expresión de *APOE*. Es ampliamente conocido que los enhancer son una parte fundamental de la regulación de la expresión génica ^{117–119}. En este sentido las variantes asociadas en las regiones reguladoras podrían estar influenciando la expresión diferencial dependiente del género de *APOE* mediante la formación de complejos con conformaciones distintas entre el ME1-LXR y ADNP. Los posibles cambios conformacionales de los complejos de inicio de la transcripción podrían cambiar el patrón de expresión de *APOE*, durante el desarrollo del cerebro, lo cual estaría influenciando la manifestación de sintomatología psiquiátrica desde etapas tempranas del desarrollo, de forma diferencial dependiendo del género del paciente. Sin embargo, aún se deben de realizar más estudios, para poder caracterizar de forma funcional y a nivel de expresión espacio temporal los genes en el clúster *TOMM40/APOE/APOC1* durante el desarrollo embrionario cerebral en población mexicana para poder caracterizar las posibles influencias que tendrían estas variantes.

7.- CONCLUSIONES.

En el presente estudio se estableció una asociación nominal de polimorfismos en la región de *TOMM40/APOE/APOC1* con un mayor riesgo a desarrollar TEA, EZQ, TB o TNM, en pacientes de sexo femenino. La asociación dependiente del género de las variantes presentes en la región intergénica entre *APOE-APOC1*, como se expuso anteriormente se encuentran principalmente en una región que regula la expresión de *APOE*. Aún, cuando el tamaño de muestra confiere una limitante al presente estudio, la asociación nominal dependiente del género encontrada nos abre las puertas para poder plantear más estudios dirigidos a estudiar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de *APOE* durante el desarrollo cerebral normal y como los posibles cambios en la expresión podrían llevar a estados patológicos.

8.- REFERENCIAS.

1. Kessler, R. C. *et al.* The global burden of mental disorders: An update from the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. *Epidemiologia e psiquiatria sociale* **18**, 23–33 (2009).
2. Berenzon, S. & Juárez, F. Atención de pacientes pobres con trastornos afectivos de la ciudad de México. *Rev Saúde Pública* **39**, 619–626 (2005).
3. Benjet, C., Casanova, L., Borges, G. & Medina-Mora, M. E. [The impact of common mental and physical health conditions on days out of role: costs for the individual and society]. *Salud Publica Mex.* **55**, 248–256 (2013).
4. Medina-Mora, M. E. *et al.* Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Ment.* **24**, 1–16 (2003).
5. Benassin, O. LA ATENCIÓN PSIQUIÁTRICA EN MÉXICO HACIA EL SIGLO XXI. *Salud Ment.* **24**, 62–73 (2001).
6. Cuthbert, B. N. & Insel, T. R. Toward the future of psychiatric diagnosis: the seven pillars of RDoC. *BMC Med.* **11**, 126 (2013).
7. Gould, J. Social communication and imagination in children with cognitive and language impairments. (University of London, 1982).
8. Wing, L. & Gould, J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *J. Autism Dev. Disord.* **9**, 11–29 (1979).
9. Wing, L. Language, social, and cognitive impairments in autism and severe mental retardation. *J. Autism Dev. Disord.* **11**, 31–44 (1981).
10. Wing, L., Gould, J. & Gillberg, C. Autism spectrum disorders in the DSM-V: better or worse than the DSM-IV? *Res. Dev. Disabil.* **32**, 768–773 (2011).
11. Fischer, B. A. & Carpenter, W. T. J. Will the Kraepelinian dichotomy survive DSM-V? *Neuropsychopharmacology* **34**, 2081–2087 (2009).
12. Bleuler, E. *Dementia praecox or the group of schizophrenias.* (1950).
13. Tandon, R. *et al.* Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophr. Res.* **150**, 3–10 (2013).
14. Vieta, E. & Phillips, M. L. Deconstructing bipolar disorder: a critical review of its diagnostic validity and a proposal for DSM-V and ICD-11. *Schizophr. Bull.* **33**, 886–892 (2007).
15. Severus, E. & Bauer, M. The impact of treatment decisions on the diagnosis of bipolar disorders. *International Journal of Bipolar Disorders* **2**, (2014).
16. Lopez, O. L., McDade, E., Riverol, M. & Becker, J. T. Evolution of the diagnostic criteria for degenerative and cognitive disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **24**, 532–541 (2011).
17. Simpson, J. R. DSM-5 and neurocognitive disorders. *J. Am. Acad. Psychiatry Law* **42**, 159–164 (2014).
18. Lobo, D. M. & Agius, M. The mental illness spectrum. *Psychiatr. Danub.* **24 Suppl 1**, S157-60 (2012).
19. Aboraya, A. The Reliability of Psychiatric Diagnoses: Point—Our psychiatric Diagnoses are Still Unreliable. *Psychiatry (Edgmont)* **4**, 22–25
20. Doherty, J. L. & Owen, M. J. Genomic insights into the overlap between psychiatric disorders: implications for research and clinical practice. *Genome Med.* **6**, 29 (2014).
21. Amann, B. L. *et al.* Brain structural changes in schizoaffective disorder compared to schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* **133**, 23–33 (2016).
22. Mitchell, K. J. What is complex about complex disorders? *Genome Biol.* **13**, 237 (2012).
23. van Loo, K. M. J. & Martens, G. J. M. Genetic and environmental factors in complex neurodevelopmental disorders. *Curr. Genomics* **8**, 429–444 (2007).
24. Motulsky, A. G. Genetics of complex diseases. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **7**, 167–168 (2006).
25. Shih, R. A., Belmonte, P. L. & Zandi, P. P. A review of the evidence from family, twin and adoption studies for a genetic contribution to adult psychiatric disorders. *Int. Rev. Psychiatry* **16**, 260–283 (2004).
26. Wray, N. R. & Gottesman, I. I. Using summary data from the danish national registers to estimate heritabilities for schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Front. Genet.* **3**, 118 (2012).
27. Burmeister, M., McInnis, M. G. & Zollner, S. Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 527–540 (2008).
28. Kendler, K. S., Kuhn, J. W., Vittum, J., Prescott, C. A. & Riley, B. The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch. Gen. Psychiatry* **62**, 529–535 (2005).
29. Gatt, J. M., Burton, K. L. O., Williams, L. M. & Schofield, P. R. Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies. *J. Psychiatr. Res.* **60**, 1–13 (2015).
30. Rapoport, J., Chavez, A., Greenstein, D., Addington, A. & Gogtay, N. Autism spectrum disorders and childhood-onset schizophrenia: clinical and biological contributions to a relation revisited. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **48**, 10–18 (2009).
31. King, B. H. & Lord, C. Is schizophrenia on the autism spectrum? *Brain Res.* **1380**, 34–41 (2011).
32. Sullivan, P. F. *et al.* Family history of schizophrenia and bipolar disorder as risk factors for autism. *Arch. Gen. Psychiatry* **69**, 1099–1103 (2012).
33. Cole, J., Ball, H. A., Martin, N. C., Scourfield, J. & McGuffin, P. Genetic overlap between measures

- of hyperactivity/inattention and mood in children and adolescents. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **48**, 1094–1101 (2009).
34. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet (London, England)* **381**, 1371–1379 (2013).
 35. Green, E. K. *et al.* The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **15**, 1016–1022 (2010).
 36. Ferreira, M. A. R. *et al.* Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat. Genet.* **40**, 1056–1058 (2008).
 37. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat. Genet.* **43**, 969–976 (2011).
 38. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat. Genet.* **43**, 977–983 (2011).
 39. Lee, S. H. *et al.* Estimating the proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs. *Nat. Genet.* **44**, 247–250 (2012).
 40. Marshall, C. R. *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 477–488 (2008).
 41. Sanders, S. J. *et al.* Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* **70**, 863–885 (2011).
 42. Pinto, D. *et al.* Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**, 368–372 (2010).
 43. Sebat, J. *et al.* Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* **316**, 445–449 (2007).
 44. Malhotra, D. *et al.* High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuron* **72**, 951–963 (2011).
 45. Malhotra, D. & Sebat, J. CNVs: Harbinger of a Rare Variant Revolution in Psychiatric Genetics. *Cell* **148**, 1223–1241 (2012).
 46. Small, B. J., Rosnick, C. B., Fratiglioni, L. & Backman, L. Apolipoprotein E and cognitive performance: a meta-analysis. *Psychol. Aging* **19**, 592–600 (2004).
 47. Ihle, A., Bunce, D. & Kliegel, M. APOE epsilon4 and cognitive function in early life: a meta-analysis. *Neuropsychology* **26**, 267–277 (2012).
 48. Suarez, B. K. & Schonfeld, G. Characterization of apolipoprotein E (ApoE) apoprotein levels in the various ApoE phenotypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**, 435–438 (1981).
 49. Delano-Wood, L. *et al.* APOE genotype predicts depression in women with Alzheimer's disease: a retrospective study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **23**, 632–636 (2008).
 50. Vila-Rodriguez, F., Honer, W. G., Innis, S. M., Wellington, C. L. & Beasley, C. L. ApoE and cholesterol in schizophrenia and bipolar disorder: comparison of grey and white matter and relation with APOE genotype. *J. Psychiatry Neurosci.* **36**, 47–55 (2011).
 51. Tovilla-Zarate, C. *et al.* APOE-epsilon3 and APOE-219G haplotypes increase the risk for schizophrenia in sibling pairs. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **21**, 440–444 (2009).
 52. Garcia-Pena, C. *et al.* Depressive symptoms and APOE polymorphisms in an elderly population-based sample. *Psychiatr. Genet.* **20**, 215–220 (2010).
 53. Gonzalez-Castro, T. B. *et al.* No association between ApoE and schizophrenia: Evidence of systematic review and updated meta-analysis. *Schizophr. Res.* **169**, 355–368 (2015).
 54. Harold, D. *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. *Nature genetics* **41**, 1088–1093 (2009).
 55. Tosto, G. & Reitz, C. Genome-wide Association Studies in Alzheimer's Disease: A Review. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **13**, (2013).
 56. Kamboh, M. I. *et al.* Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry* **2**, e117- (2012).
 57. Hollingworth, P. *et al.* Genome-wide Association Study of Alzheimer's disease with Psychotic Symptoms. *Molecular psychiatry* **17**, 1316–1327 (2012).
 58. Grosso, A. R. *et al.* Tissue-specific splicing factor gene expression signatures. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4823–4832 (2008).
 59. Yu, C.-E. *et al.* Comprehensive analysis of APOE and selected proximate markers for late-onset Alzheimer's disease: patterns of linkage disequilibrium and disease/marker association. *Genomics* **89**, 655–665 (2007).
 60. Bekris, L. M., Lutz, F. & Yu, C.-E. Functional analysis of APOE locus genetic variation implicates regional enhancers in the regulation of both TOMM40 and APOE. *J. Hum. Genet.* **57**, 18–25 (2012).
 61. Lyall, D. M. *et al.* Alzheimer's disease susceptibility genes APOE and TOMM40, and brain white matter integrity in the Lothian Birth Cohort 1936. *Neurobiol. Aging* **35**, 1513.e25-33 (2014).
 62. McFarquhar, M. *et al.* TOMM40 rs2075650 May Represent a New Candidate Gene for Vulnerability to Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology* **39**, 1743–1753 (2014).
 63. Devi, L., Prabhu, B. M., Galati, D. F., Avadhani, N. G. & Anandatheerthavarada, H. K. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* **26**, 9057–9068 (2006).
 64. Devi, L. & Anandatheerthavarada, H. K. Mitochondrial trafficking of APP and alpha synuclein:

- Relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 11–19 (2010).
65. Strittmatter, W. J. *et al.* Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1977–1981 (1993).
 66. Corder, E. H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921–923 (1993).
 67. Mahley, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622–630 (1988).
 68. Mahley, R. W. & Rall, S. C. J. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **1**, 507–537 (2000).
 69. Shore, V. G. & Shore, B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* **12**, 502–507 (1973).
 70. Mahley, R. W. Development of accelerated atherosclerosis. Concepts derived from cell biology and animal model studies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **107**, 393–399 (1983).
 71. Mahley, R. W. & Huang, Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**, 207–217 (1999).
 72. Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A. & Weisgraber, K. H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 445–454 (2006).
 73. Zhong, N. & Weisgraber, K. H. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. *J. Biol. Chem.* **284**, 6027–6031 (2009).
 74. Smith, L. C., Pownall, H. J. & Gotto, A. M. J. The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 751–757 (1978).
 75. Herz, J. & Bock, H. H. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 405–434 (2002).
 76. Zannis, V. I. *et al.* Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J. Lipid Res.* **23**, 911–914 (1982).
 77. Zhang, H., Wu, L.-M. & Wu, J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm.* **2011**, 949072 (2011).
 78. Mauch, D. H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354–1357 (2001).
 79. Pfrieger, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1158–1171 (2003).
 80. Dietschy, J. M. & Turley, S. D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* **45**, 1375–1397 (2004).
 81. Saher, G. *et al.* High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* **8**, 468–475 (2005).
 82. Honer, W. G. *et al.* Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness. *Neuroscience* **91**, 1247–1255 (1999).
 83. Rosoklija, G. *et al.* Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 349–356 (2000).
 84. Beasley, C. L. *et al.* Reductions in cholesterol and synaptic markers in association cortex in mood disorders. *Bipolar Disord.* **7**, 449–455 (2005).
 85. Tkachev, D. *et al.* Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet (London, England)* **362**, 798–805 (2003).
 86. Tierney, E. *et al.* Abnormalities of cholesterol metabolism in autism spectrum disorders. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **141B**, 666–668 (2006).
 87. Vance, J. E. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Model. Mech.* **5**, 746–755 (2012).
 88. de Chaves, E. P. & Narayanaswami, V. Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. *Future Lipidol.* **3**, 505–530 (2008).
 89. Zhou, Q. *et al.* APOE and APOC1 gene polymorphisms are associated with cognitive impairment progression in Chinese patients with late-onset Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.* **9**, 653–660 (2014).
 90. Abildayeva, K. *et al.* Human apolipoprotein C-I expression in mice impairs learning and memory functions. *J. Lipid Res.* **49**, 856–869 (2008).
 91. Silva-Zolezzi, I. *et al.* Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8611–8616 (2009).
 92. Gauderman, W. J. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *Am. J. Epidemiol.* **155**, 478–484 (2002).
 93. Gauderman, W. J. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Stat. Med.* **21**, 35–50 (2002).
 94. Galanter, J. M. *et al.* Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS Genet.* **8**, e1002554 (2012).
 95. Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E. & Visscher, P. M. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 76–82 (2011).

96. Liu, Y. *et al.* Softwares and methods for estimating genetic ancestry in human populations. *Human Genomics* **7**, 1 (2013).
97. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
98. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
99. Pritchard, J. K. & Przeworski, M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 1–14 (2001).
100. Rosenbloom, K. R. *et al.* The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* **43**, D670–81 (2015).
101. Speir, M. L. *et al.* The UCSC Genome Browser database: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, D717–25 (2016).
102. Stephens, M., Smith, N. J. & Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 978–989 (2001).
103. Wang, X.-J. & Krystal, J. H. Computational psychiatry. *Neuron* **84**, 638–654 (2014).
104. Adams, R. A., Huys, Q. J. M. & Roiser, J. P. Computational Psychiatry: towards a mathematically informed understanding of mental illness. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **87**, 53–63 (2016).
105. Tilghman, S. M., Curtis, P. J., Tiemeier, D. C., Leder, P. & Weissmann, C. The intervening sequence of a mouse beta-globin gene is transcribed within the 15S beta-globin mRNA precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 1309–1313 (1978).
106. Dean, D. C. 3rd *et al.* Brain differences in infants at differential genetic risk for late-onset Alzheimer disease: a cross-sectional imaging study. *JAMA Neurol.* **71**, 11–22 (2014).
107. O'Donnell, K. J. & Meaney, M. J. Fetal Origins of Mental Health: The Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis. *Am. J. Psychiatry* **174**, 319–328 (2017).
108. Mandel, S., Rechavi, G. & Gozes, I. Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) differentially interacts with chromatin to regulate genes essential for embryogenesis. *Dev. Biol.* **303**, 814–824 (2007).
109. Van Dijck, A., Helsmoortel, C., Vandeweyer, G. & Kooy, F. ADNP-Related Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorder. in (eds. Adam, M. P. *et al.*) (1993).
110. Pinhasov, A. *et al.* Activity-dependent neuroprotective protein: a novel gene essential for brain formation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **144**, 83–90 (2003).
111. Malishkevich, A. *et al.* Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) exhibits striking sexual dichotomy impacting on autistic and Alzheimer's pathologies. *Transl. Psychiatry* **5**, e501 (2015).
112. Liang, Y. *et al.* A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *J. Neurochem.* **88**, 623–634 (2004).
113. Fu, X. *et al.* 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 38378–38387 (2001).
114. Svensson, S. *et al.* Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J.* **22**, 4625–4633 (2003).
115. Wagner, B. L. *et al.* Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5780–5789 (2003).
116. Yang, C. *et al.* Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **281**, 27816–27826 (2006).
117. Ong, C.-T. & Corces, V. G. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 283–293 (2011).
118. Lelli, K. M., Slattery, M. & Mann, R. S. Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 43–68 (2012).
119. Spitz, F. & Furlong, E. E. M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 613–626 (2012).