

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y QUÍMICA TERAPÉUTICA

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES  
*COMT*, *MAO-A*, *MAO-B* Y *DAT* CON EL RIESGO DE ESQUIZOFRENIA  
Y DE APARICIÓN DE EFECTOS EXTRAPIRAMIDALES  
EN PACIENTES TRATADOS CON ANTIPSICÓTICOS**

PATRICIA GASSÓ ASTORGA

2008



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y QUÍMICA TERAPÉUTICA

PROGRAMA DE DOCTORADO: MEDICAMENTOS, ALIMENTACIÓN Y SALUD

BIENIO 2004-2006

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES  
*COMT, MAO-A, MAO-B Y DAT* CON EL RIESGO DE ESQUIZOFRENIA  
Y DE APARICIÓN DE EFECTOS EXTRAPIRAMIDALES  
EN PACIENTES TRATADOS CON ANTIPSICÓTICOS**

Memoria presentada por Patricia Gassó Astorga para optar al título de doctor por la  
Universidad de Barcelona

Directora: Amalia Lafuente Flo



Director: Sergi Mas Herrero



Doctoranda: Patricia Gassó Astorga



PATRICIA GASSÓ ASTORGA

2008



A mis padres, hermanos y a Enric

## **AGRADECIMIENTOS**

*Parece que fue ayer cuando estaba a punto de acabar la carrera de Biología y no tenía nada claro cuál era el mejor camino a seguir. A pesar de que las ganas de investigar era algo indudable en mí, también existían dudas y miedos que hacían plantearme el realizar o no un doctorado. Finalmente decidí que dedicaría cuatro años de mi vida a investigar en el equipo de la Dra. Lafuente. Ahora que ha pasado el tiempo y estoy a las puertas de leer mi tesis y de ser Doctora sé que he escogido el camino correcto.*

*Para realizar una tesis doctoral se requiere paciencia, esfuerzo y devoción, pero lo más importante, en muchas ocasiones, es el apoyo de las personas que nos rodean. Por esta razón quiero dar las gracias a todas esas personas que me han ayudado desde el principio hasta el final y que han hecho posible la elaboración de esta tesis doctoral.*

*En primer lugar, agradecer a la Dra. Amalia Lafuente, directora de esta tesis, que me haya brindado la oportunidad de trabajar en su grupo, la confianza que ha depositado en mí durante todo este tiempo y el apoyo recibido en los momentos difíciles.*

*También quiero dar las gracias al Dr. Sergi Mas, director de esta tesis doctoral, por haberme ayudado siempre que se lo he pedido y porque gracias a su experiencia he podido aprender todo lo necesario para llevar a cabo esta tesis.*

*A los miembros del grupo, Santi Álvarez, Dra. Anna Crescenti y Dr. José Manuel Vidal, porque siempre he contado con su ayuda y porque con ellos he pasado muy buenos momentos.*

*Al resto de miembros de la unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina ya que cada uno de ellos me ha aportado algo positivo en el periodo de formación predoctoral.*

*A los miembros del Servicio de Psiquiatría del Hospital Clínico que han participado en este proyecto, especialmente al Dr. Miquel Bernardo y al Dr. Eduard Parellada, ya que sin el trabajo de todos ellos no hubiera sido posible la realización de esta tesis.*

*A las enfermeras de la sala de Hospitalización del Servicio de Psiquiatría del Hospital Clínico, por su colaboración en el reclutamiento de los pacientes.*

*A todos mis amigos por haber estado conmigo tanto en los buenos momentos como en los malos haciendo que la vida sea más divertida.*

*A Enric, por ser una de las personas más importantes de mi vida, por haber estado a mi lado desde el principio dándome fuerza, cariño, consejo y esperanza, y también por su paciencia en los momentos difíciles que hemos vivido.*

*También quiero dar las gracias a toda la familia Puig, ya que ha sido para mí como una segunda familia.*

*Y como no, a toda mi familia. A mis padres, Ramón y Natalia, por el apoyo y el amor incondicional que me han dado durante toda mi vida. A mis hermanos, Alberto, Natalia y Ramón, porque en todos ellos he tenido un modelo a seguir y porque me han ayudado siempre, siempre que los he necesitado. A Lourdes, Antonio y Ester, por ser tan buenos cuñados. A mis sobrinos, Myriam y David, por devolverme los momentos más divertidos de mi infancia. A mi burlaña, porque me lo ha dado todo y todavía me lo sigue dando.*

*Gracias a todos.*



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADFA	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
ADN	Ácido Desoxiribonucleico (DNA, siglas en inglés de <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )
AHV	Ácido Homovalínico
AIMS	<i>Abnormal Involuntary Movement Scale</i>
AP	Antipsicótico
APA	<i>American Psychiatric Association</i>
ASO	<i>Allele Specific Oligonucleotide</i>
BAS	<i>Barnes-Akathisia Scale</i>
Bp	<i>Base pair</i>
CEDD	Dosis Diaria Equivalente de Clorpromazina
COMT	Catecol-O-MetilTransferasa
DAT	<i>Dopamine Active Transporter</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition</i>
EPS	<i>Extrapyramidal Symptoms</i>
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision</i>
LAIR	<i>Long Acting Injectable Risperidone</i>
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
MAO	Monoamino Oxidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO, siglas en inglés de <i>World Health organization</i> )
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SAS	<i>Simpson-Angus Scale</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
STR	<i>Simple Tandem Repeats</i>
TD	<i>Tardive Diskinesia</i>
TEC	Terapia Electroconvulsiva
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>
WGA	<i>Whole Genome Association</i>



## ÍNDICE



Agradecimientos.....	vi
Abreviaturas y acrónimos .....	ix
<b>1. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TRABAJOS PRESENTADOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>➤ ESQUIZOFRENIA Y SUS BASES GENÉTICAS</b>	
3.1 Definición.....	11
3.2 Diagnóstico.....	11
3.3 Sintomatología.....	12
3.3.1 Tipos de síntomas	
3.3.2 Subtipos de esquizofrenia	
3.4 Epidemiología.....	15
3.4.1 Incidencia y prevalencia	
3.4.2 Mortalidad y comorbilidad	
3.4.3 Factores de riesgo	
3.5 Tratamiento.....	18
3.6 Etiopatogenia .....	19
3.6.1 Hipótesis dopaminérgica	
3.7 Otras enfermedades mentales .....	26
3.7.1 Trastornos mentales relacionados con la esquizofrenia	
3.7.2 Trastorno bipolar	
3.8 Genética de la esquizofrenia.....	29
<b>➤ FARMACOGÉNÉTICA DE LOS ANTIPSICÓTICOS</b>	
3.9 Definición de farmacogenética y polimorfismo genético .....	33
3.9.1 Farmacogenómica y farmacogenética	
3.9.2 Polimorfismos genéticos	
3.10 Fármacos antipsicóticos .....	37
3.10.1 Historia y clasificación	
3.10.2 Mecanismo de acción	

3.10.3 Eficacia de los antipsicóticos	
3.10.4 Efectos secundarios de los antipsicóticos	
3.10.5 Selección del fármaco antipsicótico	
➤ <b>PAPEL DE LOS GENES <i>COMT</i>, <i>MAO</i> Y <i>DAT</i> EN EL RIESGO DE ESQUIZOFRENIA Y RIESGO DE EPS</b>	
3.11 <i>COMT</i> (Catecol-O-MetilTransferasa).....	52
3.11.1 Polimorfismos de la <i>COMT</i> y riesgo de esquizofrenia	
3.11.2 Polimorfismos de la <i>COMT</i> y riesgo de EPS	
3.12 <i>MAO</i> (Monoamino Oxidasa).....	55
3.12.1 Polimorfismos de la <i>MAO</i> y riesgo de esquizofrenia	
3.12.2 Polimorfismos de la <i>MAO</i> y riesgo de EPS	
3.13 <i>DAT</i> (Transportador de dopamina).....	57
3.13.1 Polimorfismos del <i>DAT</i> y riesgo de esquizofrenia	
3.13.2 Polimorfismos del <i>DAT</i> y riesgo de EPS	
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
4.1 Hipótesis.....	63
4.1.1 Riesgo de esquizofrenia	
4.1.2 Riesgo de desarrollar EPS	
4.2 Objetivos.....	64
4.2.1 Objetivos principales	
4.2.2 Objetivos secundarios	
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
5.1 Diseño del estudio.....	69
5.2 Sujetos.....	69
5.2.1 Reclutamiento de pacientes	
5.2.2 Consentimiento informado	
5.2.3 Correcciones para homogeneizar el tratamiento	
5.3 Métodos analíticos.....	73
5.3.1 Aislamiento y cuantificación de ADN	
5.3.2 Metodología del genotipado de los polimorfismos	
5.3.3 Análisis estadístico	

<b>6. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES.....</b>	<b>85</b>
6.1 Estudio N° 1 .....	87
<i>Polimorfismos genéticos en la Catecol-O-MetilTransferasa y riesgo de esquizofrenia en población española.</i>	
6.2 Estudio N° 2 .....	95
<i>Asociación del polimorfismo A/G intrón 13 en el gen de la Monoamino Oxidasa B (MAO-B) con el riesgo de esquizofrenia en una población española.</i>	
6.3 Estudio N° 3 .....	105
<i>Asociación entre polimorfismos de los genes COMT, MAO y DAT y el riesgo de desarrollar esquizofrenia y efectos extrapiramidales en pacientes tratados con antipsicóticos.</i>	
6.4 Estudio N° 4.....	111
<i>Polimorfismos del receptor de dopamina D2 (TaqIA, TaqIB, y -141C Ins/Del) y de la enzima metabolizadora de la dopamina (COMT G158A, A-278G) y síntomas extrapiramidales en pacientes esquizofrénicos y bipolares.</i>	
6.5 Estudio N° 5 .....	127
<i>Falta de asociación entre efectos extrapiramidales inducidos por antipsicóticos y polimorfismos en genes que participan en el metabolismo y transporte de la dopamina.</i>	
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>149</b>
7.1 Estudio de riesgo de esquizofrenia .....	151
7.1.1 Estudio N° 1	
7.1.2 Estudio N° 2	
7.1.3 Estudio N° 3	
7.1.4 Estudio N° 1, N° 2 y N° 3: Diseño del estudio	
7.2 Estudio de riesgo de EPS.....	158
7.2.1 Estudio N° 4	
7.2.2 Estudio N° 5	
7.2.3 Estudio N° 4 y N° 5: Diseño del estudio	
7.3 Diseño y puesta a punto del método de genotipado multiplex .....	165
7.4 Importancia de los estudios genéticos de riesgo de enfermedades y de los estudios farmacogenéticos.....	166
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>173</b>



# **1. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS**



La esquizofrenia es una enfermedad mental que, a pesar de tener una baja incidencia, tiene una elevada prevalencia debido a su carácter crónico. El 1% de la población mundial padece esquizofrenia y, por esta razón, es uno de los trastornos psiquiátricos más importante y en el que se está llevando a cabo una investigación más extensa. Por otro lado, el tratamiento con fármacos antipsicóticos que reciben los pacientes esquizofrénicos da lugar a efectos secundarios no deseados, entre los que se incluyen los síntomas extrapiramidales. Debido a que el tratamiento es de por vida, la aparición de estos efectos adversos es crítica, por lo que se están realizando muchos estudios para intentar prever y prevenir su aparición y así poder realizar una terapia más eficaz.

Parece ser que factores genéticos participan tanto en el riesgo de esquizofrenia como en el de aparición de efectos extrapiramidales. En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de polimorfismos genéticos situados en genes que codifican enzimas que participan en el metabolismo y en el transporte de la dopamina, y que por lo tanto pueden influir en la disponibilidad de este neurotransmisor en la sinapsis. Dado que tanto en la esquizofrenia como en el desarrollo del extrapiramidalismo los niveles de dopamina tendrían un papel crítico, estas variantes genéticas podrían determinar un mayor o menor riesgo de ambos sucesos.

Todos los estudios que se presentan en esta tesis doctoral pertenecen a una línea de investigación destinada a la identificación de factores genéticos de riesgo de esquizofrenia y de aparición de efectos extrapiramidales en pacientes tratados con antipsicóticos. Los resultados obtenidos han aportado información relevante y novedosa al campo de la farmacogenómica y de la farmacogenética.



## **2. TRABAJOS PRESENTADOS**



Los resultados de los estudios que forman la base de esta tesis doctoral se han recogido en los siguientes artículos científicos y comunicaciones orales:

- Polimorfismos genéticos en la Catecol-O-MetilTransferasa y riesgo de esquizofrenia en población española. Sergi Mas, **Patricia Gassó**, Anna Crescenti, Eduard Parellada, Miquel Bernardo, Amalia Lafuente. *Med Clin (Barc)*. 2008; 130(00):000-0.  
(Localizador Web: Artículo 251.273). Aceptado para su publicación el 17-6-2008.  
IF: 1.337.  
2º Cuartil del área científica *Medicine, General and Internal* (Posición 50 de 100)
- Association of A/G polymorphism in Intron 13 of the Monoamine Oxidase B (MAO-B) gene with schizophrenia in a Spanish population. **Patricia Gassó**, Miquel Bernardo, Sergi Mas, Anna Crescenti, Clemente Garcia, Eduard Parellada, Amalia Lafuente. *Neuropsychobiology*. 2008 Oct 3;58(2):65-70.  
IF: 1.992  
3er Cuartil del área científica *Psychology* (Posición 31 de 61)
- Association of polymorphisms in *COMT*, *MAO* and *DAT* genes with the risk of developing extrapyramidal symptoms in patients treated with antipsychotics and with the risk of schizophrenia. **Patricia Gassó**, Sergi Mas, Anna Crescenti, Jose Manuel Vidal, Santiago Álvarez, Miquel Bernardo, Amalia Lafuente.  
Comunicación oral del XXI Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica (SEFC) que tuvo lugar en Barcelona del 22 al 25 de Octubre de 2008.  
1<sup>er</sup> premio a la mejor comunicación oral.
- Polymorphism of Dopamine D2 receptor (TaqIA, TaqIB, and -141C Ins/Del) and Dopamine degradation enzyme (COMT G158A, A-278G) genes and extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia and bipolar disorders. Amalia Lafuente, Miquel Bernardo, Sergi Mas, Anna Crescenti, Mónica Aparici, **Patricia Gassó**, Ramón Deulofeu, Anna Mane, Rosa Catalán, Xavier carne. *Psychiatry Res*. 2008 Nov 30;161(2):131-41.  
IF: 2.298  
2º Cuartil del área científica *Psychiatry* (Posición 41 de 94).

- Lack of association between antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms and polymorphisms in dopamine metabolism and transport genes. **Patricia Gassó**, Sergi Mas, Anna Crescenti, Gemma Parramon, Clemente Garcia-Rizo, Eduard Parellada, Miquel Bernardo, Amalia Lafuente. *Psychiatry Res.* (Pendiente de evaluación).

Artículo enviado en septiembre de 2008.

IF: 2.298

2º Cuartil del área científica *Psychiatry* (Posición 41 de 94).

### **3. INTRODUCCIÓN**



## ➤ ESQUIZOFRENIA Y SUS BASES GENÉTICAS

### 3.1 DEFINICIÓN

El concepto de esquizofrenia es relativamente reciente dentro de la historia de la medicina. Emil Kraepelin, a finales del siglo diecinueve, fue el primero en diferenciar la esquizofrenia de otros trastornos mentales como el trastorno bipolar, y la definió como *dementia praecox* o demencia precoz. Sin embargo, no fue hasta 1911 cuando un colaborador de Kraepelin, Eugen Bleuer, introdujo por primera vez el término de esquizofrenia en el lenguaje médico. La palabra esquizofrenia proviene del griego *skizeb* (escindir, dividir) y *phrenos* (intelecto, mente). Bleuer definió la esquizofrenia como un trastorno caracterizado por una escisión en la asociación de las ideas y una retirada de la realidad y de la vida social.

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la esquizofrenia como una enfermedad mental, o grupo de enfermedades mentales, de causas todavía desconocidas, caracterizada por trastornos del pensamiento, de la percepción, de la afectividad y del comportamiento social (*WHO, 1998*).

### 3.2 DIAGNÓSTICO

La ausencia de un marcador biológico y de pruebas citogenéticas o neurofisiológicas hace que el diagnóstico de esta enfermedad se base en el examen del estado mental, normalmente a través de la entrevista clínica, y en la observación del comportamiento de los pacientes (*WHO, 1998*). Además, el hecho de que no exista una sintomatología clínica exclusiva de la esquizofrenia y de que determinados síntomas estén compartidos por diferentes trastornos psicóticos, hace que su diagnóstico sea una tarea difícil en la que, en ocasiones, los límites entre las diferentes patologías no estén bien definidos. Por esta razón, tanto la OMS como la Sociedad Americana de Psiquiatría (APA, siglas en inglés de *American Psychiatric Association*) han establecido criterios diagnósticos que se recogen en manuales utilizados actualmente en la clínica. Los más utilizados son el DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition*) y el ICD-10 (*International Statistical*

*Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision*). Según los criterios diagnósticos del DSM-IV, la esquizofrenia consiste en la persistencia de una serie de signos y síntomas característicos durante un periodo de 6 meses o durante un tiempo menor si se ha tratado satisfactoriamente (APA, 2000).

Para un correcto diagnóstico es importante obtener una historia clínica detallada y realizar un seguimiento meticuloso del paciente, ya que existen trastornos mentales que dan lugar a una sintomatología muy parecida a la de la esquizofrenia, como por ejemplo: trastornos del estado del ánimo con síntomas psicóticos, trastornos de la personalidad, trastorno de despersonalización, trastorno de angustia, trastorno psicótico agudo, trastorno esquizoafectivo, trastorno esquizotípico y trastorno de ideas delirantes (Ho B-Ch et al., 2005). Es importante también realizar pruebas físicas exploratorias que puedan descartar otras causas de la sintomatología psicótica del paciente como por ejemplo, el consumo de sustancias de abuso (alucinógenos, anfetaminas, alcohol y cocaína), la intoxicación inducida por determinados fármacos (corticoides y anticolinérgicos), trastornos infecciosos, metabólicos o endocrinos, tumores o epilepsia del lóbulo temporal. De todas formas, es probable que cualquier población de pacientes esquizofrénicos sea en realidad una combinación de pacientes con diferentes subtipos de esquizofrenia (Sullivan P et al., 2006).

### **3.3 SINTOMATOLOGÍA**

---

Ningún síntoma es patognomónico de la esquizofrenia. Existen múltiples combinaciones de diferentes síntomas que determinan la clínica de un paciente esquizofrénico. Esta variabilidad es tanto interindividual como intraindividual, ya que a lo largo de la vida, el paciente puede presentar diferentes sintomatologías.

Aunque puede seguir varios patrones, la esquizofrenia es una enfermedad crónica que generalmente se manifiesta en la adolescencia tardía y que presenta un mal pronóstico a largo plazo (Ho B-Ch et al., 2005). La aparición de la primera crisis puede ser de forma abrupta o de manera gradual, en donde el individuo puede presentar algunas manifestaciones prodrómicas, como alteraciones del sueño, ansiedad, irritabilidad, depresión, falta de concentración o fatiga. Aproximadamente, entre el 20 y el 30% de los esquizofrénicos no sufrirá nuevas crisis, aunque la mayoría de ellos sí que las padecen a lo largo de sus vidas, e incluso entre un 10 y un 15% permanecen severamente incapacitados por la enfermedad debido a un estado psicótico crónico (APA, 2004). En función de diferentes variables, un

paciente puede presentar un mejor o peor pronóstico. El aislamiento social, una duración larga del episodio, antecedentes de tratamiento psiquiátrico previo, la soltería y un historial de problemas de comportamiento en la infancia (como absentismo escolar o rabieta), son cinco de los más sólidos predictores de mal pronóstico.

En 1980, Crow clasificó los síntomas más característicos de la esquizofrenia en dos grandes grupos: síntomas positivos, que hacen referencia a síntomas que aparecen de nuevo y que no estaban presentes en el pasado, y síntomas negativos, que definen la pérdida de una capacidad o característica previamente adquirida. Recientemente, se ha considerado una tercera categoría de síntomas desorganizados que estaba incluida anteriormente en el grupo de síntomas positivos. Tanto los síntomas desorganizados como los negativos se han asociado con un peor pronóstico (APA, 2004; Ho B-Ch et al., 2005).

### 3.3.1 TIPOS DE SÍNTOMAS

#### a) Síntomas positivos

- *Alucinaciones*: El paciente presenta percepciones sensoriales en ausencia de estímulos externos. Las más frecuentes son las alucinaciones auditivas, que pueden ser simples (ruidos o silbidos) o complejas (una o varias voces que hablan con el paciente, le insultan o le ordenan). En menor frecuencia, presentan alucinaciones visuales (destellos luminosos, personas, animales u objetos), táctiles o hápticas (sensación de ser tocado o pinchado), gustativas y olfativas (sabores y olores desagradables).
- *Ideas delirantes*: Son creencias falsas, sostenidas firmemente como reales, que gobiernan el pensamiento y la conducta. Existe una gran variedad de delirios como por ejemplo, delirios de persecución (creer ser perseguido por amigos o vecinos o ser vigilado por la policía), delirios de perjuicio (creer que un miembro de la familia le envenena) o delirios hipocondríacos (creer que no funciona un órgano vital).

#### b) Síntomas negativos

- *Alogia*: Los pacientes experimentan una disminución del lenguaje espontáneo, tienden a hablar poco y a contestar de una manera concreta utilizando un lenguaje pobre.
- *Deterioro emocional*: El paciente presenta *indiferencia afectiva* (no experimenta las emociones o lo hace con una menor intensidad) que le conduce a un *aplanamiento afectivo* (no expresa las emociones) con el que mantienen una expresión facial invariable y una reducción de la gesticulación espontánea.

- *Deterioro motivacional*: Caracterizado por la presencia de *apatía*, *abulia* (pérdida de la iniciativa o voluntad) o *deterioro atencional* (incapacidad de concentrarse). También pueden presentar un deterioro del comportamiento social en el que los pacientes se vuelven descuidados o desaseados.

#### c) Síntomas desorganizados

- *Desorganización del pensamiento*: se manifiesta con alteraciones del lenguaje tanto hablado como escrito. Los pacientes cambian de un tema a otro sin ninguna lógica, utilizando palabras sin sentido en el contexto y, en algunos casos, el habla se hace totalmente incomprensible.
- *Comportamiento desorganizado*: incluye diversas alteraciones motoras y cambios en el comportamiento social. Las conductas motoras oscilan desde el estupor catatónico, donde el paciente puede permanecer inmóvil, mudo y arreactivo, hasta la agitación. También pueden presentar otras conductas extrañas como exhibir comportamientos groseros en la mesa, rebuscar en las bolsas de basura o gritar obscenidades en público.
- *Incongruencia afectiva*: donde los pacientes pueden sonreír de manera inapropiada cuando se habla de temas neutros o tristes, o reírse tontamente sin ninguna razón aparente.

Actualmente se piensa que la esquizofrenia es un trastorno que tiene como déficit fundamental un *deterioro cognitivo*. Los pacientes con esquizofrenia presentan alteraciones en la función neurocognitiva que incluyen defectos en la llamada memoria de trabajo o “working memory” (tipo de memoria a corto plazo que nos permite mantener y manejar temporalmente la información necesaria para realizar un trabajo mental), disfunciones en la capacidad de atención y en las funciones ejecutivas (procesos mentales que permiten responder y adaptarse de modo apropiado al entorno e incluyen la capacidad de planificación, la resolución de problemas y la toma de decisiones). Estos síntomas son unos de los más discapacitantes ya que, además de causar un gran trastorno emocional, a menudo interfieren en la habilidad del paciente para trabajar y para llevar una vida normal (*Tamminga CA and Holcomb HH, 2005*).

### 3.3.2 SUBTIPOS DE ESQUIZOFRENIA

En función de los síntomas predominantes que presentan los pacientes, se han definido diferentes subtipos de esquizofrenia (*APA, 2000; Ho B-Ch et al., 2005*):

- Paranoide: Los síntomas característicos son las ideas delirantes y las alucinaciones. Es la forma menos severa de la enfermedad y la que presenta un mejor pronóstico.
- Desorganizado: Se caracteriza por una desorganización en el lenguaje y en el comportamiento y por una afectividad aplanada o inapropiada. Acostumbra a ser el subtipo más severo.
- Tipo catatónico: En este subtipo los pacientes presentan un trastorno psicomotor evidente, con rigidez y disminución marcada de la actividad motora, con ocasionales episodios de hiperactividad.
- Tipo indiferenciado: En este subtipo se incluyen los pacientes que cumplen criterios de esquizofrenia sin cumplir criterios para su inclusión en los subtipos paranoide, desorganizado o catatónico.
- Tipo residual: Se diagnostica en pacientes que ya no presentan signos psicóticos prominentes pero continúan mostrando evidencias de la enfermedad como síntomas negativos o síntomas positivos de forma atenuada.

## 3.4 EPIDEMIOLOGÍA

---

### 3.4.1 INCIDENCIA Y PREVALENCIA

Los resultados de un meta-análisis de estudios publicados entre el 1965 y el 2001 indican una incidencia media anual de 15.2 casos por cada 100.000 habitantes (*McGrath J et al., 2004*). El carácter crónico de la esquizofrenia le confiere una elevada prevalencia, cerca del 1%, que se mantiene estable entre los diferentes países y culturas (*APA, 2004*). No obstante, parece que vivir en ciudad, la migración y el sexo masculino están asociados a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (*Tandon R et al., 2008*). Además, la prevalencia es mayor en clases con una socioeconomía baja, probablemente debido a que el 10% de padres esquizofrénicos sufren también la enfermedad, lo que limita la adaptación social, el empleo y los ingresos económicos (*Gastó C, 2007*). La esquizofrenia puede manifestarse a cualquier edad pero entre el 20 y el 40% de los pacientes experimentan los primeros signos psicóticos

antes de los 20 años, siendo la incidencia máxima en los hombres entre los 15 y los 25 años y en las mujeres entre los 25 y los 35 años (APA, 2004).

#### 3.4.2 MORTALIDAD Y COMORBILIDAD

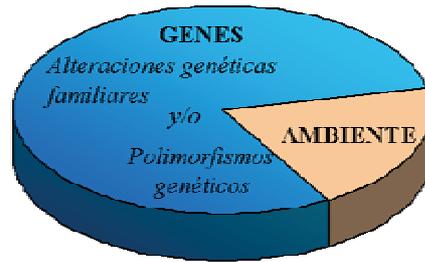
Tener esquizofrenia conlleva una reducción de 10 años en la esperanza media de vida. El riesgo de suicidio y de sufrir accidentes mortales es, respectivamente, 4 y 1.5 veces mayor que en la población general. De hecho, una de las causas de muerte más comunes entre los pacientes esquizofrénicos es el suicidio (10%), que explica el 28% del exceso de mortalidad. El 65-70% de las muertes de estos pacientes se debe a enfermedades cardiovasculares, respiratorias e infecciosas, como consecuencia de ser una población vulnerable a tener hábitos poco saludables (Rossler W et al., 2005). Un 25% de los pacientes consumen drogas de abuso, un 30% alcohol y el 80% son fumadores (Batel P, 2000).

La diabetes, la arteriosclerosis y la cardiopatía isquémica son algunas de las enfermedades comórbidas de la esquizofrenia. Otra enfermedad común entre los pacientes esquizofrénicos es la depresión. Se ha estimado que al menos un 25% de los pacientes esquizofrénicos presentan signos depresivos y, aunque es más frecuente al principio de las recaídas psicóticas o en los períodos de recuperación, estos pueden aparecer en cualquier fase de la enfermedad (Kelly DL et al., 2005).

#### 3.4.3 FACTORES DE RIESGO

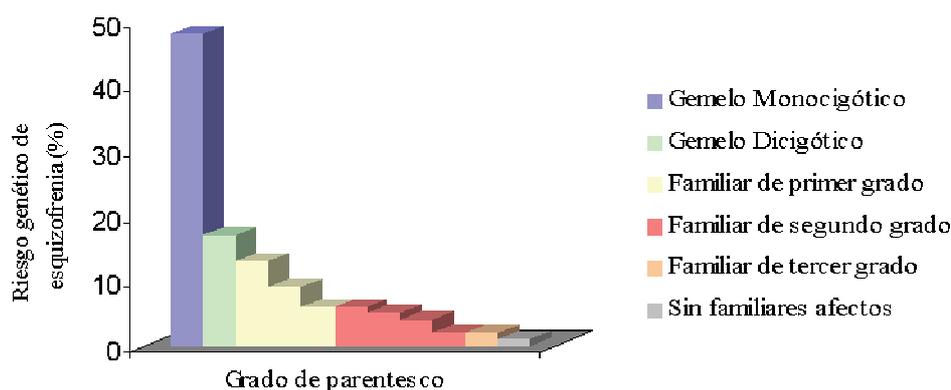
A diferencia de las enfermedades monogénicas (causadas por la alteración de un único gen), en la esquizofrenia no existe una única causa que pueda explicar la aparición de la enfermedad. Es la combinación de múltiples factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, lo que determina su desarrollo. Dentro de los genéticos, encontraríamos tanto alteraciones genéticas familiares como polimorfismos genéticos (variaciones genéticas presentes en la población con una frecuencia mayor al 1%) (Figura 1).

Se estima que la heredabilidad de la esquizofrenia es de un 80% (Harrison PJ and Owen MJ, 2003), lo que indica el fuerte componente genético de esta enfermedad. Mediante estudios con familias, con gemelos y de adopción, se ha demostrado que el riesgo de padecer esquizofrenia en los parientes se correlaciona con el número de genes compartidos y con el grado de parentesco (Figura 2).



**Figura 1. Contribución de los factores genéticos y ambientales al riesgo de esquizofrenia.**

Se calcula que el riesgo de esta enfermedad a lo largo de la vida en la población general es del 1%, mientras que para los familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos) de un paciente con esquizofrenia es de entre el 6 y 13%, para los de segundo grado (tíos, sobrinos o nietos) de un 2 a un 6%, y para los de tercer grado (primos) cerca del 2%. Entre los gemelos, la concordancia de esquizofrenia es de un 17% en los dicigóticos de individuos afectos y cerca del 50% para los monocigóticos (*Gottesman II, 1991*). Además, estudios de adopción han demostrado que el riesgo está relacionado con la presencia del trastorno en los parientes biológicos y no en los adoptivos (*Lewis DA and Lieberman JA, 2000*).



**Figura 2. Riesgo genético de sufrir esquizofrenia de un individuo en función del parentesco que tenga con un paciente esquizofrénico (adaptado de *Gottesman II, 1991*).**

Aunque los factores de riesgo genético representan un papel importante en la etiología de la esquizofrenia, el hecho de que los gemelos monocigóticos no presenten una concordancia del 100% indica que los genes no son determinantes, sino que ejercen un papel de susceptibilidad, más que de causalidad directa. Se ha observado que eventos que afectan al desarrollo fetal pueden ser dianas potenciales para la vulnerabilidad genética, aunque también es posible que actúen ellos mismos como factores de riesgo ambientales. Entre ellos destacan las complicaciones obstétricas (como la hipoxia, la diabetes materna y las infecciones víricas) y el estrés materno durante el embarazo. Los daños cerebrales infantiles también se han relacionado con el riesgo de desarrollar esquizofrenia. Además, se han asociado otros factores ambientales como la clase social, el estrés, el consumo de sustancias de abuso (cocaína, derivados anfetamínicos y alucinógenos), crecer en un medio urbano, la inmigración, sufrir infecciones víricas y el nacimiento durante los meses de invierno (*McGrath J et al., 2004*).

### **3.5 TRATAMIENTO**

---

En la actualidad no existe ningún tratamiento que cure la enfermedad, por lo que la terapia se centra en el uso de fármacos antipsicóticos (APs) que disminuyen o eliminan la sintomatología de la misma (*National Institute of Mental Health, 2005*). No obstante, la medicación constituye sólo una parte del tratamiento del enfermo. Es extremadamente importante que el paciente reciba apoyo no sólo por parte de la familia, sino también por parte de amigos, compañeros de trabajo, y de todas las personas de su entorno en general, por lo que las intervenciones psicosociales son otra parte importante del tratamiento del paciente. Los déficits cognitivos, como la incapacidad para concentrarse, que sufren los enfermos les dificulta mantener o encontrar trabajo. Existen terapias, basadas en la recuperación de estas habilidades cognitivas, para ayudar a los pacientes a su reintegración en la comunidad y a recuperar su funcionamiento ocupacional (*Buckley PF, 2008*). La terapia electroconvulsiva (TEC) se puede utilizar para el tratamiento de algunos síndromes específicos como la catatonia, y para pacientes que no respondan a los fármacos antipsicóticos (*Ho B-Ch et al., 2005*).

### **3.6 ETIOPATOGENIA**

---

La complejidad y heterogeneidad de la esquizofrenia dificultan el estudio de su etiología. Como ya se ha comentado anteriormente, existen diferentes combinaciones de múltiples factores de riesgo (tanto genéticos como ambientales) que determinan la aparición de la esquizofrenia (Figura 1) (*Buckley PF, 2008*). Gracias a la evolución que en los últimos años han sufrido las técnicas de neuroimagen, se ha observado diferentes anomalías estructurales, como la dilatación de los ventrículos, la disminución del volumen del tálamo, de la corteza prefrontal, del lóbulo temporal y en general disminución global del tamaño cerebral. También se han observado alteraciones funcionales, como la disminución de la actividad de la corteza prefrontal, y alteraciones químicas, como las alteraciones en la concentración de determinados neurotransmisores (dopamina, serotonina y glutamato) o en la densidad de sus receptores.

El problema es que no todos los pacientes presentan algunas de estas alteraciones, ni todas las personas que las presentan sufren esquizofrenia. No obstante, a partir de estos cambios estructurales, funcionales y químicos, y en base al mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos y de otros principios activos que producen síntomas parecidos a los cuadros psicóticos, se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la fisiopatología de la esquizofrenia (*Miyamoto S et al., 2003; Weinberg D, 2003; Abi-Dargham A and Laruelle M, 2005; Flórez J, 2008*) (Tabla 1).

En una enfermedad tan compleja es difícil pensar que la alteración de un único sistema es suficiente para su desarrollo. En el momento actual los investigadores parecen estar de acuerdo en que la esquizofrenia no se debe a una alteración limitada a una única región cerebral, sino que se debe a un problema de conexiones entre distintas regiones del cerebro (*Sullivan P et al., 2006*).

Puesto que las hipótesis generadas en esta tesis doctoral están basadas en la teoría dopaminérgica, se prestará una especial atención a este punto.

#### **3.6.1 HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA**

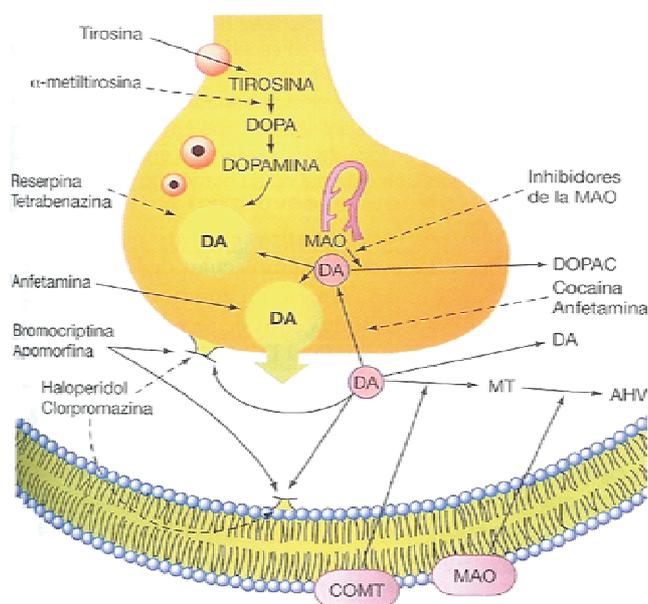
Durante muchos años, ha sido la hipótesis más aceptada, y actualmente continúa siendo la teoría neuroquímica predominante. Para entender mejor las alteraciones propuestas de este sistema, que explicarían la sintomatología esquizofrénica, es importante dar un breve repaso de los conocimientos existentes sobre este neurotransmisor.

Tabla 1. Hipótesis fisiopatológicas de la esquizofrenia

Hipótesis	Alteración	Evidencias
Dopaminérgica	Desequilibrio en la función dopaminérgica: - Hipofunción en la corteza prefrontal (receptores D <sub>1</sub> ), contribuyendo a los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad. - Hiperfunción en la zona subcortical (receptores D <sub>2</sub> ), contribuyendo a la aparición de los estados psicóticos.	- Capacidad de los antipsicóticos de controlar los síntomas positivos mediante el bloqueo de los receptores D <sub>2</sub> . - Capacidad de dopaminérgicos indirectos (anfetaminas) de inducir psicosis en sujetos sanos y síntomas psicóticos en esquizofrénicos a dosis muy bajas. - Estudios de neuroimagen muestran anomalías en la función dopaminérgica presináptica.
Serotonérgica	Alteraciones en la neurotransmisión serotonérgica	- El LSD es un agonista del receptor de la serotonina y tiene una acción alucinógena y psicotomimética. - Elevadas afinidades de los antipsicóticos atípicos por los receptores de la serotonina. - Estudios post-mortem muestran alteraciones en el número de receptores de la serotonina en el cerebro de pacientes esquizofrénicos, con una menor expresión del receptor 5-HT <sub>2A</sub> y una mayor presencia de los receptores 5-HT <sub>1A</sub> en la corteza frontal.
Glutamatérgica	Hipofunción del receptor de glutamato NMDA	- La fenciclidina y la ketamina (antagonistas del receptor del glutamato) producen síntomas psicóticos y negativos en individuos sanos y empeoran los síntomas en pacientes esquizofrénicos. - Disminución de la actividad de los receptores glutamatérgicos en la corteza prefrontal, en el hipocampo y en el tálamo de pacientes esquizofrénicos. - Estudios post-mortem con cerebros de pacientes esquizofrénicos, han hallado índices anormales de glutamato.
Neurodesarrollo	Alteraciones en el desarrollo de las neuronas provocando posicionamientos celulares anómalos y dando lugar a patrones aberrantes en las conexiones entre diferentes regiones del cerebro. Estos circuitos anormales explicarían que los síntomas de la enfermedad se iniciaran cuando las estructuras implicadas alcanzan su madurez funcional.	Alteraciones estructurales en cerebros de pacientes esquizofrénicos: dilatación del sistema ventricular, atrofia del hipocampo, alteraciones microscópicas en la arquitectura y disposición de las neuronas en el lóbulo frontal y regiones temporolímbicas como la amígdala y el hipocampo.
Neurodegeneración	Expresión anormal de proteínas y sustancias bioquímicas tóxicas que dañarían determinadas regiones dando lugar a una pérdida en la función fisiológica. Esto afectaría la conectividad entre estructuras diencefálicas, talámicas, límbicas y corticales dando lugar a la sintomatología esquizofrénica.	- Semejanza de la esquizofrenia con otras enfermedades neurodegenerativas. - Aparición progresiva de la sintomatología - Aparición y progresión de las alteraciones cognitivas

### a) Dopamina

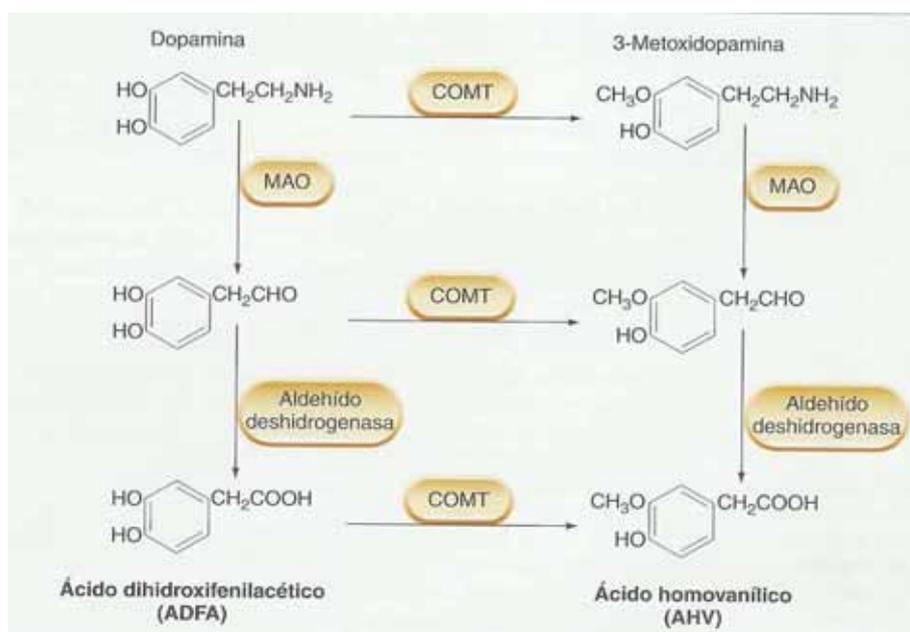
La dopamina interviene, a parte de en la esquizofrenia, en varios trastornos como el Parkinson, el trastorno por déficit de atención o en procesos de dependencia a drogas, por lo que es un neurotransmisor de gran interés biológico. En la mayoría de neuronas del sistema nervioso central actúa como precursor de la noradrenalina. Sólo una de cada  $10^6$  neuronas son deficientes en la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, encargada de transformar la dopamina en noradrenalina, y es en éstas donde la dopamina actúa como neurotransmisor. El precursor de la dopamina es la tirosina (Figura 3) que se transforma en L-DOPA (paso limitante de la reacción) y ésta a su vez se descarboxila para formar dopamina. Una vez sintetizada, la dopamina se almacena en vesículas hasta que la neurona recibe un potencial de acción y la libera a la sinapsis mediante exocitosis.



**Figura 3. Terminación nerviosa dopaminérgica. Síntesis, almacenamiento y liberación de dopamina. Se indican los lugares de acción donde actúan algunos fármacos. La línea discontinua indica inhibición o antagonismo (García-Sevilla JA y Meana JJ, 2008).**

La homeostasis del neurotransmisor se lleva a cabo mediante su recaptación y su metabolismo. En las terminales dopaminérgicas existen transportadores de membrana, conocidos con el nombre de DAT (*Dopamine Active Transporter*), que permiten transportar la dopamina liberada al interior de la neurona donde se almacena nuevamente en las vesículas. Este proceso produce un ahorro metabólico importante ya que evita la degradación

extraneuronal de la dopamina y permite su reutilización. En el metabolismo de la dopamina intervienen dos enzimas: la Monoamino Oxidasa (MAO) y la Catecol-O-MetilTransferasa (COMT). Ambas se encuentran ampliamente distribuidas por todo el organismo, incluido el cerebro. La MAO es una enzima oxidativa mitocondrial y su actividad se centra en la fracción citoplasmática de la dopamina que no se encuentra protegida en el interior de las vesículas. La COMT es una enzima de la fracción soluble citoplasmática e incluso puede estar asociada a la membrana celular. La acción de ambas enzimas da lugar mayoritariamente a dos metabolitos: el ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (ADFA) y el ácido homovanílico (AHV) (Figura 4). La determinación de AHV encefálico se emplea a menudo como índice de recambio de dopamina. Existen diferentes sustancias que inhiben o estimulan la neurotransmisión dopaminérgica, como por ejemplo los fármacos antipsicóticos y las anfetaminas, respectivamente (Figura 3) (García-Sevilla JA y Meana JJ, 2008; Rang HP et al., 2008b).

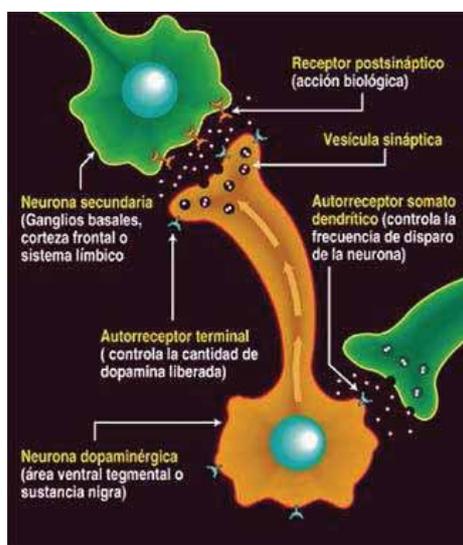


**Figura 4. Principales vías del metabolismo de la dopamina (Rang HP et al., 2008b).**

### b) Receptores dopaminérgicos

En los años 80 se propuso la existencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos,  $D_1$  y  $D_2$ , relacionados respectivamente con la activación y la inhibición de la adenilato ciclasa. La clonación de genes amplió el número de receptores hasta cinco, los cuales fueron clasificados en dos familias  $D_1$  y  $D_2$  (manteniendo la nomenclatura de los dos primeros receptores identificados). La familia  $D_1$  incluye los receptores  $D_1$  y  $D_5$ , mientras que la familia  $D_2$

incluye el D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Todos los receptores presentan una elevada homología y pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G estimuladoras (D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>) o inhibitoras (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>). Su localización puede ser presináptica y postsináptica (Figura 5). Los presinápticos, o autorreceptores, se localizan alrededor de toda la neurona dopaminérgica y su estimulación da lugar a una reducción de la actividad espontánea de la neurona (autorreceptores somatodendríticos) o bien una inhibición de la liberación de dopamina (autorreceptores presentes en las terminaciones nerviosas), por lo que constituyen uno de los principales mecanismos de regulación de la transmisión. Los postsinápticos son los responsables de la acción biológica de la dopamina. Existen dos isoformas del receptor D<sub>2</sub>, D<sub>2S</sub> y D<sub>2L</sub>, ambas codificadas por el mismo gen. Se ha sugerido que el D<sub>2L</sub> actuaría como receptor mayoritariamente postsináptico y el D<sub>2S</sub> como presináptico (*García-Sevilla JA y Meana JJ, 2008*).



**Figura 5. Localización presináptica y postsináptica de los receptores de dopamina**

(<http://www.iladiba.com>).

Los receptores dopaminérgicos se expresan en áreas encefálicas delimitadas, pero superpuestas, y presentan diferentes afinidades con la dopamina, otros agonistas y antagonistas (Tabla 2). Los D<sub>1</sub> son los receptores más abundantes y dispersos en las zonas que reciben inervación dopaminérgica (estriado, sistema límbico, tálamo e hipotálamo), y lo mismo sucede con los receptores D<sub>2</sub>, aunque éstos también se encuentran en la hipófisis. Los D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> se expresan mayoritariamente en el límbico y, a comparación de los D<sub>2</sub>, se expresan en mucho menor grado en el estriado. Dado que los antagonistas de la dopamina utilizados como antipsicóticos deben su acción a los efectos sobre los sistemas mesolímbico y mesocortical, pero producen a menudo efectos secundarios por el bloqueo de receptores en el

estriado, sería interesante desarrollar fármacos que bloquearan a estos receptores de forma selectiva.

Los receptores de dopamina también se expresan en la periferia donde intervienen en varios efectos periféricos como la vasodilatación renal o el aumento de la contractibilidad del miocardio (Rang HP et al., 2008b).

**Tabla 2. Receptores de dopamina (Rang HP et al., 2008b).**

	Familia D1		Familia D2		
	D1	D5	D2	D3	D4
<b>Gen y localización</b>	DRD1 / Chr 5	DRD5 / Chr 4	DRD2 / Chr 11	DRD3 / Chr 3	DRD4 / chr 11
<b>Sistema efector</b>	Gs	Gs	Gi/o	Gi/o	Gi/o
<b>Traducción de la señal</b>	↑ AMPc	↑ AMPc	↓AMPc / ↑IP <sub>3</sub>	↓AMPc / ↑IP <sub>3</sub>	↓AMPc / ↑IP <sub>3</sub>
<i>Distribución y funcionalidad</i>					
<b>Corteza</b> (Alerta, estado de ánimo)	+++	-	++	-	+
<b>Sistema límbico</b> (Emoción, conductas estereotipadas)	+++	+	++	+	+
<b>Estriado</b> (Control motor)	+++	+	++	+	+
<b>Hipotálamo e hipófisis anterior</b> (secreción de prolactina)	-	-			-
<i>Agonistas</i>					
<b>Dopamina</b>	Micromolar	Submicromolar	Micromolar	Nanomolar	Submicromolar
<b>Apomorfina</b>	Baja potencia		Alta potencia		
<b>Bromocriptina</b>	Baja potencia		Alta potencia		
<i>Antagonistas</i>					
<b>Clorpromacina</b>	+	+	+++	+++	+
<b>Haloperidol</b>	++	+	+++	+++	+++
<b>Espiperona</b>	-	-	+++	+++	+++
<b>Sulpirida</b>	-	-	+++	++	-
<b>Clozapina</b>	+	+	+	+	++
<b>Ariprazol</b>	-	-	++	+	-

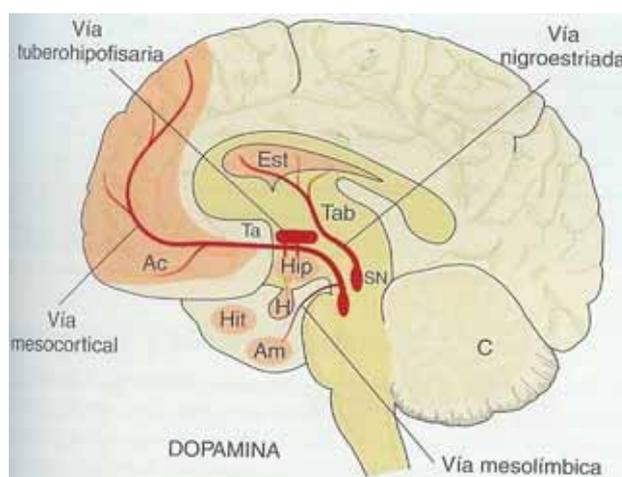
### c) Vías dopaminérgicas

La distribución de la dopamina en el encéfalo es bastante limitada. Aunque existen interneuronas dopaminérgicas en otras regiones encefálicas y en la retina, la dopamina abunda principalmente en el cuerpo estriado, en el sistema límbico y en el hipotálamo, formando tres sistemas principales (Figura 6):

→ Sistema nigroestriado: donde se encuentra alrededor del 75% de toda la dopamina del encéfalo. Se origina en los cuerpos celulares de la sustancia negra compacta (localizada en el mesencéfalo) y sus axones se proyectan hasta el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen). Este sistema está implicado en la regulación motora y la ejecución de tareas (García-Sevilla JA y Meana JJ, 2008; Rang HP et al., 2008b).

→ Sistema mesolímbico-mesocortical: Se origina en los cuerpos celulares localizados en el área tegmental ventral (mesencéfalo) y sus fibras se proyectan hacia el sistema límbico y a la corteza frontal, respectivamente. La vía mesolímbica se distribuye por diferentes áreas del sistema límbico, especialmente al núcleo accumbens y a la amígdala, y con excepción del hipocampo. Ambos sistemas están implicados en los procesos de atención, motivación, control del pensamiento, evaluación correcta de la realidad. También están relacionados con los sistemas de premio o recompensa, circuitos que al activarse producen un efecto placentero. La mayoría de sustancias que provocan adicción interaccionan con neuronas dopaminérgicas de este sistema provocando un incremento de la liberación de dopamina. Cuando se interrumpe la administración de estas sustancias aparecen sensaciones desagradables, depresión o falta de motivación (García-Sevilla JA y Meana JJ, 2008; Rang HP et al., 2008b).

→ Sistema tuberohipofisario: es un grupo de neuronas cortas que se dirigen desde la porción ventral del hipotálamo a la eminencia media y la hipófisis, regulando algunas de sus secreciones. La dopamina provocaría una inhibición de la secreción de la prolactina y estimularía la secreción de la hormona de crecimiento (Rang HP et al., 2008b).



**Figura 6. Vías dopaminérgicas. Ac: Núcleos accumbens; Am: Amígdala; C: Cerebelo; Est: Cuerpo estriado; H: Hipófisis; Hip: Hipocampo; Hit: Hipotálamo; SN: Sustancia negra; Ta: Tálamo; Tab: Tabique (Rang HP et al., 2008b).**

#### **d) Implicaciones de la dopamina en la esquizofrenia**

Existen múltiples evidencias de que la dopamina juega un papel importante en el desarrollo de la sintomatología esquizofrénica (Tabla 1). Las anfetaminas provocan un aumento de la liberación de dopamina y dan lugar en individuos sanos a cuadros psicóticos muy parecidos a los que tienen los pacientes esquizofrénicos en un episodio agudo. Agonistas del receptor D<sub>2</sub> (apomorfina, bromocriptina) empeoran la sintomatología de los pacientes. Antagonistas dopaminérgicos controlan la sintomatología positiva, de hecho la eficacia clínica de los antipsicóticos es constante cuando provocan un bloqueo del 80% de los receptores D<sub>2</sub> y la potencia de éstos guarda una estrecha relación con la capacidad de bloquear dichos receptores. Un estudio realizado mediante técnicas de imagen y ligando radioactivo demostró una mayor liberación de dopamina (inducida por anfetamina) en esquizofrénicos que en controles. Además el efecto era aún mayor en brotes agudos y desaparecía en periodos de remisión espontánea (*Rang HP et al., 2008b*).

Todas estas evidencias llevaron a la formulación de la teoría de la hiperactividad dopaminérgica (*Miyamoto S et al., 2003; Ho B-Ch et al., 2005*) mediada por una hiperestimulación de los receptores D<sub>2</sub>. Sin embargo, existe otra variante de la hipótesis de la dopamina (*Abi-Dargham A and Laruelle M, 2005*) que sugiere que la sintomatología esquizofrénica sería debida a un desequilibrio en la neurotransmisión dopaminérgica. En ella se propone que existe un desequilibrio entre un déficit persistente de la función dopaminérgica, asociada a una hipofunción glutamatérgica, en la corteza prefrontal, implicando a los receptores D<sub>1</sub> y contribuyendo a los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad; y un exceso intermitente en la zona subcortical, implicando a los receptores D<sub>2</sub> y contribuyendo a la aparición de los estados psicóticos.

### **3.7 OTRAS ENFERMEDADES MENTALES**

---

En este apartado se comentará únicamente aquellos trastornos mentales en los que se utilizan fármacos antipsicóticos como parte de su tratamiento.

#### **3.7.1 TRASTORNOS MENTALES RELACIONADOS CON LA ESQUIZOFRENIA**

Como ya se ha comentado anteriormente, el hecho de que la sintomatología de la esquizofrenia y de otras enfermedades mentales sea similar, hace que muchas veces los criterios diagnósticos de estas patologías estén muy próximos. Entre dichas enfermedades

destacaremos el trastorno esquizoafectivo, el trastorno esquizotípico, el trastorno de ideas delirantes y el síndrome psicótico.

- En el trastorno esquizoafectivo los pacientes experimentan síntomas característicos tanto de la esquizofrenia (psicosis) como de los trastornos afectivos. Los síntomas psicóticos y afectivos pueden estar presentes al mismo tiempo o de modo alternante. A diferencia de la esquizofrenia, en el trastorno esquizoafectivo los síntomas afectivos se dan en una parte sustancial de la duración total de la enfermedad, y a diferencia del trastorno bipolar, los síntomas psicóticos, no se resuelven necesariamente con el tratamiento del trastorno del estado del ánimo (*WHO, 2003*).

Se desconoce la causa exacta de esta enfermedad, pero los factores que afectan el desarrollo tanto de la psicosis como del trastorno del estado del ánimo pueden jugar un papel importante. Las estrategias farmacológicas para el tratamiento de esta enfermedad pueden consistir en una monoterapia antipsicótica, una monoterapia estabilizadora del estado del ánimo, una monoterapia antidepresiva o combinaciones de ellas. El tratamiento agudo requiere generalmente antipsicóticos, ya que normalmente predominan los síntomas psicóticos (*Ho B-Ch et al., 2005*).

- Según el DSM-IV, el trastorno esquizotípico (o de personalidad esquizotípica) se caracteriza por presentar un patrón general de déficit social e interpersonal asociado a un malestar agudo y a una capacidad reducida para las relaciones personales, así como distorsiones cognitivas o perceptivas y excentricidades del comportamiento. Los pacientes con este trastorno presentan alteraciones peculiares del habla, la conducta, el pensamiento y la percepción pero no están totalmente desconectados de la realidad y generalmente no tienen alucinaciones. Aunque este trastorno comparta muchas características con la esquizofrenia, carece de la manifiesta cronicidad de las psicosis (*WHO, 2003*).

Aún se desconoce la verdadera etiología de la enfermedad, pero se cree que la personalidad esquizotípica tiene un componente genético ya que existe una incidencia mayor en los familiares de esquizofrénicos. El tratamiento del trastorno esquizotípico suele consistir en la combinación de una terapia de apoyo junto con fármacos APs. Se ha visto que los APs mejoran la ansiedad y las características pseudopsicóticas asociadas a este trastorno, y están particularmente indicados en el tratamiento de las descompensaciones psicóticas que pueden experimentar estos pacientes (*Ho B-Ch et al., 2005*).

- El trastorno de ideas delirantes se define, según el criterio DSM-IV, como un grupo de alteraciones caracterizadas por la aparición de un único tema delirante o de un grupo de ideas delirantes relacionadas entre sí, que normalmente son muy persistentes y que incluso pueden durar hasta el final de la vida del individuo. El contenido de estas ideas es muy variable y a menudo es de persecución, hipocondríaco o de grandeza. Normalmente no se presenta otra psicopatología, pero pueden aparecer de modo intermitente síntomas depresivos y, en algunos casos, alucinaciones olfatorias y táctiles. Fuera del comportamiento directamente relacionado con el tema de las ideas delirantes, los pacientes con este trastorno presentan una afectividad, un lenguaje y una conducta normales (APA, 2000).

El tratamiento del trastorno de ideas delirantes a menudo incluye psicoterapia y medicación en donde suelen haber fármacos APs para reducir la agitación y la ansiedad que acompañan a las ideas delirantes, así como su intensidad (Ho B-Ch et al., 2005).

- El síndrome psicótico es un término general que se refiere a la pérdida de contacto con la realidad, incluyendo particularmente delirios y alucinaciones. Aunque en muchas ocasiones el comportamiento psicótico va asociado a la esquizofrenia, estos síntomas pueden ser independientes, pudiendo estar asociados a tumores cerebrales, a epilepsia, a alcohol y/o a la dependencia a tóxicos, al trastorno bipolar, a la depresión psicótica y a la demencia relacionada con trastornos cerebrales degenerativos como el Alzheimer.

El tratamiento de la reacción psicótica varía según la causa de la psicosis. Normalmente se utilizan los APs para disminuir las alucinaciones y delirios, pero también terapia de grupo (APA, 2000; WHO, 2003).

#### **3.7.2 TRASTORNO BIPOLAR**

El trastorno bipolar, conocido también con el nombre de trastorno afectivo bipolar o depresión maníaca, se caracteriza por elevaciones y descensos del estado del ánimo de carácter patológico. Los pacientes presentan alternancia de episodios depresivos y episodios maníacos, en los que muestran una euforia exagerada. Los episodios de euforia pueden variar desde la hipomanía (la forma menos intensa) hasta la manía con síntomas psicóticos (la forma más grave). En algunos pacientes bipolares los dos episodios se presentan a la vez, lo que se conoce como estado bipolar mixto.

El DSM-IV diferencia dos subtipos de trastorno bipolar: el de tipo I, que se caracteriza por episodios recurrentes de depresión y de manía graves, con o sin episodios de hipomanía; y el de tipo II, donde episodios depresivos se alternan con uno a más episodios hipomaniacos.

El trastorno ciclotímico se caracteriza por la presencia de síntomas depresivos leves e hipomaníacos recurrentes. Es la forma más leve del trastorno bipolar.

La duración media de un episodio maníaco es de 5-10 semanas, pudiendo variar entre 2 semanas y 4-5 meses, mientras que la de un episodio de depresión es de 19 semanas (*Dubovsky SL et al., 2005*). La esquizofrenia y el trastorno bipolar comparten características comunes y de hecho no fue hasta finales del siglo XIX cuando se empezaron a considerar enfermedades mentales diferentes. El trastorno bipolar aparece en la adolescencia o al inicio de la época adulta y tiene una prevalencia superior a la de la esquizofrenia, cerca del 3.5%. Al igual que la esquizofrenia, el trastorno bipolar es una enfermedad multifactorial donde los factores genéticos juegan un papel muy importante (*Buckley PF, 2008*). Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión serotoninérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos y acetilcolinérgicos estarían implicadas en su etiología (*Dubovsky SL et al., 2005*). Tampoco en este caso existe un marcador biológico que determine la presencia de este trastorno, por lo que la sintomatología del paciente, el curso de la enfermedad y la historia familiar son las herramientas utilizadas en la clínica para llevar a cabo el diagnóstico, que en ocasiones se puede confundir con otros trastornos que comparten sintomatología, como la ansiedad, la esquizofrenia o el trastorno esquizoafectivo (*Kahn DA et al., 2004*).

Se ha comprobado que la mejor estrategia para el tratamiento del paciente bipolar es la combinación de los fármacos estabilizadores del ánimo junto a la terapia psicosocial y al apoyo de familiares y amigos. El litio es el fármaco más común utilizado como estabilizador del ánimo. Anticonvulsivos, como el valproato o la carbamazepina, también son ampliamente utilizados. Antidepresivos, para las fases depresivas, antipsicóticos, para las maníacas, y benzodiazepinas para tratar el insomnio, la agitación y la ansiedad, se combinan con los estabilizadores del ánimo en el tratamiento de muchos pacientes (*Buckley PF, 2008*).

### **3.8 GENÉTICA DE LA ESQUIZOFRENIA**

---

Como ya se ha comentado en anteriores apartados, la esquizofrenia es una enfermedad multifactorial donde la suma de varios factores ambientales y genéticos desencadena su aparición. Los estudios realizados en familias han demostrado la importancia de la base genética en la esquizofrenia. Según las teorías más actuales, no estaría causada por la alteración de un único gen sino que sería la presencia de un número de genes alterados lo que daría predisposición a desarrollar la enfermedad. A pesar del gran número de genes

estudiados, hasta el momento no se ha detectado ningún gen que despunte sobre los demás en conferir un mayor riesgo de esquizofrenia. En cambio, si que se han descrito múltiples genes de efectos moderados que confieren cierta susceptibilidad (Tabla 3).

**Tabla 3. Genes de susceptibilidad a la esquizofrenia.**

Gen candidato	Localización cromosómica	Función biológica
DISC1/2 (Disrupted In Schizophrenia 1 y 2)	1q42.1	Papel en el desarrollo neuronal
COMT (Catechol-O-MethylTransferase)	22q11.21	Degradación de catecolaminas Implicación neurotransmisión dopaminérgica
PRODH (Proline dehydrogenase)	22q11.21	Catabolismo de la prolina Implicación neurotransmisión glutamatérgica
NRG1 (Neuregulin 1)	8p12	Estimulación del receptor erbB4 Disminuye la expresión del receptor NMDA Implicación neurotransmisión glutamatérgica
DTNBP1 (Dystrobrevin-binding protein 1)	6p22.3	Implicación neurotransmisión glutamatérgica
DAO (D-amino-acid oxidase)	12q24	Oxidación de la D-Serina (agonista del receptor NMDA). Implicación neurotransmisión glutamatérgica
DAOA (D-amino acid oxidase activator)	13q34	Activación de la DAO Implicación neurotransmisión glutamatérgica
RGS4 (Regulator of G-protein signaling 4)	1q23.3	Regulador negativo de los receptores acoplados a proteína G Implicación neurotransmisión dopaminérgica, serotoninérgica y glutamatérgica
DRD1 (Dopamine receptor D <sub>1</sub> ) DRD2 (Dopamine receptor D <sub>2</sub> ) DRD3 (Dopamine receptor D <sub>3</sub> )	5q35.1 11q22-23 3q13.3	Receptores de dopamina Implicación neurotransmisión dopaminérgica
TH (Tyrosine hydroxylase)	11p15.5	Síntesis de dopamina (enzima limitante) Implicación neurotransmisión dopaminérgica
SLC6A3 (Solute carrier family 6 member 3)	5p15.3	Transportador de la dopamina Implicación neurotransmisión dopaminérgica
5-HTR2A (5-hydroxytryptamine receptor 2A)	13q14-q21	Receptores de serotonina Implicación neurotransmisión serotoninérgica
5-HTR2C (5-hydroxytryptamine receptor 2C)	Xq24	
TPH1 (Tryptophan hydroxylase 1)	11p15.3-p14	Síntesis de serotonina (enzima limitante) Implicación neurotransmisión serotoninérgica
SLC6A4 (Solute carrier family 6 member 4)	17q11.1-q12	Transportador de serotonina Implicación neurotransmisión serotoninérgica
GRM3 (Glutamate receptor metabotropic 3)	7q21.1-q21.2	Receptor de glutamato Implicación neurotransmisión glutamatérgica
SLC1A3 (Solute carrier family 1 member 3)	15p13	Transportador de glutamato Implicación neurotransmisión glutamatérgica
MAOA (Monoamine oxidase A) MAOB (Monoamine oxidase B)	Xp11.3 Xp11.23	Degradación de dopamina y serotonina Implicación neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica
NOTCH4 (Notch homolog 4 (Drosophila))	6p21.3	Diferenciación celular Hipótesis del neurodesarrollo
APOE (Apolipoprotein E)	19q13.2	Catabolismo lipoproteínas Hipótesis de la neurodegeneración
AKT1 (V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)	14.p32.32	Proteína cinasa B Transmisión sináptica y plasticidad neuronal

La participación de múltiples genes seguiría el modelo del múltiple loci propuesto por Risch en 1990 (*Risch N, 1990*). Sin embargo, queda un largo camino para llegar a determinar el número de genes involucrados, el grado de interacción entre ellos y la contribución individual de cada uno en la susceptibilidad de padecer este trastorno mental.

En el caso de enfermedades Mendelianas, causadas por la alteración de un único gen, el uso de diferentes técnicas genéticas ha sido de gran ayuda para la identificación rápida de las bases genéticas y moleculares de estas enfermedades. En el caso de las complejas, como la esquizofrenia, la identificación de alteraciones genéticas responsables de la enfermedad está siendo un proceso lento y en ocasiones desalentador. Gracias a los recientes avances tecnológicos y al aumento de los recursos genéticos disponibles, el número de genes candidatos identificados está creciendo considerablemente (Tabla 3), lo que motiva a pensar que en un futuro cercano seremos capaces de identificar las principales variables genéticas responsables de la enfermedad con el objetivo de mejorar su diagnóstico y su tratamiento.

Se han utilizado diferentes estrategias para la detección de genes candidatos de la esquizofrenia (*Kirov G et al., 2005*). Sin embargo, se observa discrepancia en los resultados obtenidos en los diferentes estudios, que probablemente sea debida al efecto parcial que confiere cada uno de los posibles genes de susceptibilidad, así como al inadecuado tamaño muestral, a la poca homogeneidad de las muestras y al uso de un número insuficiente de marcadores genéticos.

Los estudios realizados en familias han permitido identificar regiones cromosómicas implicadas en el riesgo de esquizofrenia. Mediante estudios citogenéticos para observar anormalidades cromosómicas, se detectó una translocación balanceada entre los cromosomas 1 y 11 (t(1;11)(q43;q21)) que estaba asociada a los pacientes esquizofrénicos de una familia (*St Clair D et al., 1990*). Posteriormente, se vio que la translocación afectaba a dos genes del cromosoma 1: *DISC1* y *DISC2* (*Disrupted in Schizophrenia 1y 2*), los cuales siguen siendo en la actualidad genes candidatos para la esquizofrenia.

Los estudios de ligamiento también son una buena estrategia para identificar posiciones cromosómicas asociadas a la esquizofrenia. El uso de marcadores polimórficos de ADN (ácido desoxiribonucleico) que cosegregan con la enfermedad permite definir estas posiciones, donde es probable que se encuentren genes de susceptibilidad. Mediante esta estrategia, científicos han encontrado ligamiento con las regiones cromosómicas 2q, 3q, 5p, 6p, 8p, 11q, 13q,14p y 22q (*Badner JA and Gershon ES, 2002; Lewis CM et al., 2003*), y también han podido identificar numerosos genes candidatos. Un ejemplo sería el gen *DTNBP1* (Dystrobrevin-binding protein 1). Después de mostrar evidencia de ligamiento de un

segmento del cromosoma 6 (6p24-p22) con la esquizofrenia, se reportaron evidencias de asociación del gen *DTNBPI*, localizado en esa región cromosómica (6p22.3), con la enfermedad (*Straub RE et al., 2002*).

Los estudios de asociación entre casos y controles no emparentados es otra de las estrategias utilizadas por los investigadores. En este caso, a partir de las hipótesis fisiopatológicas (Tabla 1) de la esquizofrenia, se estudian genes implicados en ellas. Por ejemplo, en base a las hipótesis de las alteraciones en los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico, se han estudiado genes que codifican para receptores (*DRD2, 5-HTR2A, GRM3*), transportadores (*SLC6A3, SLC6A4, SLC1A3*) o metabolizadores (*COMT, MAO*) de estos neurotransmisores (Tabla 3). En los estudios de asociación se comparan las frecuencias de uno o varios polimorfismos genéticos (variaciones en la secuencia de ADN presentes en la población con una frecuencia mayor al 1%), entre pacientes esquizofrénicos (casos) y controles poblacionales. Existen diferentes tipos de polimorfismos genéticos: deleciones e inserciones (pérdida o ganancia de nucleótidos, respectivamente), duplicaciones, etc., siendo los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), variaciones de un único nucleótido, los polimorfismos más frecuentes.

Recientemente se ha publicado un estudio de asociación con 1900 casos (pacientes con esquizofrenia o trastorno esquizoafectivo) y 2000 controles, en el cual se han estudiado 648 SNPs situados en 14 genes candidatos previamente asociados a la enfermedad (*Sanders AR et al., 2008*). A pesar del gran tamaño muestral, de la gran cantidad de SNPs y de la razonable elección de los genes estudiados, ninguno de los SNPs se pudo asociar a la esquizofrenia. Este estudio muestra la complejidad que los investigadores se encuentran en la búsqueda de factores genéticos de riesgo. La posible heterogeneidad de la misma enfermedad y de su genética, sumado al efecto de los diferentes factores ambientales, dificultan la homogeneidad de los estudios realizados.

Por otro lado, es posible que no se esté utilizando la estrategia más adecuada. Actualmente se está desarrollando una nueva conocida con el nombre de *Whole Genome Association* (WGA), que estudia una gran cantidad de SNPs marcadores que cubren todo el genoma, analizando las diferencias entre casos y controles. Se podría considerar un estudio de ligamiento donde todos somos considerados miembros de una gran familia. Esta estrategia junto con otras, como el estudio de los CNV (Copy number variation), segmentos de ADN que se encuentran repetidos a lo largo del genoma, permitirá detectar nuevos genes que hasta el momento no se han asociado a la esquizofrenia, ampliando así el conocimiento sobre otras posibles vías etiopatológicas de la enfermedad (*Hyman SE, 2008*).

## ➤ FARMACOGÉNÉTICA DE LOS ANTIPSICÓTICOS

### **3.9 DEFINICIÓN DE FARMACOGENÉTICA Y POLIMORFISMO GENÉTICO**

#### **3.9.1 FARMACOGENÓMICA Y FARMACOGENÉTICA**

A menudo los términos farmacogenómica y farmacogenética se confunden. La farmacogenómica estudia las bases genéticas y moleculares de las enfermedades con la finalidad de identificar nuevas dianas terapéuticas y marcadores periféricos para su diagnóstico y pronóstico. La farmacogenética, en cambio, estudia las variaciones genéticas que determinan la respuesta a los fármacos.

Existe una elevada variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos. Las causas de esta variación pueden ser de origen genético, ambiental, fisiológico y patofisiológico (*Ingelman-Sundberg M, 2001*). La relación entre las reacciones adversas de los fármacos y las variaciones genéticas fue demostrada por primera vez en los años cincuenta. Posteriormente, en 1959, *Vogel* introdujo el término “Farmacogenética” para este nuevo campo de investigación.

Los estudios de farmacogenética se basan en la investigación de variaciones genéticas presentes en genes candidatos implicados en los procesos farmacocinéticos o farmacodinámicos de los fármacos. El objetivo final de esta disciplina es identificar variables genéticas que ayuden a predecir el riesgo individual de un paciente a desarrollar un efecto adverso o a desarrollar resistencia a un determinado tratamiento para poder realizar terapias más individualizadas y por lo tanto más eficaces y menos tóxicas (*Shastry BS, 2006*).

Los fármacos antipsicóticos utilizados en pacientes esquizofrénicos y bipolares, entre otros, actúan mejorando o suprimiendo los estados psicóticos de estos pacientes. Sin embargo, existe una elevada variabilidad interindividual en la respuesta a los diferentes tipos de fármacos antipsicóticos, encontrando pacientes que no responden a un determinado tratamiento o pacientes que desarrollan ciertos efectos adversos, como por ejemplo extrapiramidalismo o depresión. La poca consciencia de enfermedad que tienen los pacientes, en especial los esquizofrénicos, hace que la aparición de efectos adversos sea crítica, ya que esto conlleva que abandonen la terapia con mayor frecuencia (*Lieberman JA et al., 2005*).

Actualmente, la capacidad de predecir la eficacia o seguridad de un antipsicótico para un determinado paciente es limitada y se espera que la farmacogenética ayude a realizar un mejor tratamiento de los pacientes. Diferentes polimorfismos, localizados en genes que participan en procesos farmacocinéticos (transportadores y enzimas metabolizadoras) o farmacodinámicos (receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos) de los antipsicóticos, se han asociado tanto a la respuesta al tratamiento como al riesgo de aparición de efectos adversos (*Nnadi CU and Malhotra AK, 2007*). Hay que tener en cuenta que un test genético nunca dará una respuesta absoluta, pero sí ayudará a realizar una mejor predicción de la eficacia o la toxicidad que un determinado antipsicótico puede tener en un paciente en particular.

En los estudios de farmacogenética, los fenotipos clínicos que se quieren estudiar son complejos y responden a la interacción de varios genes cada uno de ellos con un efecto parcial sobre la respuesta. Esto hace que la asociación entre genotipo y fenotipo sea una tarea difícil, por lo que en la actualidad se tiende a realizar estudios de asociación entre genotipo y endofenotipo. Los endofenotipos o fenotipos intermedios son variables que se encuentran entre el genotipo y el fenotipo complejo (*Owen MJ et al., 2005*). En las enfermedades neuropsiquiátricas, donde el fenotipo determina el diagnóstico, un endofenotipo podría ser cualquier característica neurofisiológica, bioquímica, endocrinológica, neuroanatómica, cognitiva o neuropsicológica. Otra estrategia para facilitar la identificación de dicha asociación será seleccionar los extremos de los fenotipos farmacológicos (como por ejemplo, respondedores versus no respondedores o resistentes versus sensibles), ya que es donde se encontrarán con mayor frecuencia los genotipos adversos o favorables.

Hay que destacar que gracias a la secuenciación del genoma humano, la simplificación de los métodos para la detección de nuevos polimorfismos, el avance en las tecnologías de genotipado de alto rendimiento o “*high-throughput*”, como los *arrays*, la espectrometría de masas o la minisequenciación, así como los avances en el campo de la bioinformática, se está potenciando enormemente el desarrollo de la farmacogenética.

#### 3.9.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

##### a) Definición

Un polimorfismo genético se define cuando existen diferentes variantes alélicas para un mismo locus, con una frecuencia, en la población general, mayor o igual al 1% (*Lewin B, 2004*). Se debe diferenciar los polimorfismos genéticos de las mutaciones espontáneas, las cuales se dan con una frecuencia mucho menor (entre el  $1 \times 10^{-6}$  y el  $1 \times 10^{-8}$  %).

## b) Tipos de polimorfismos

- SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Corresponde al tipo más común de variación genética, representando aproximadamente un 90% del total de variaciones del genoma humano. Este polimorfismo de un único nucleótido hace que la secuencia de ADN entre los individuos difiera en una única base. Se ha estimado una frecuencia de un SNP por cada 1.250 pares de bases, por lo que se calcula que existe un total de 2.5 millones de SNPs en el genoma humano (*Ingelman-Sundberg M, 2001*).

Existen grupos de SNPs vecinos en un mismo cromosoma cuyos alelos muestran diferentes patrones de desequilibrio de ligamiento o LD (del inglés, *Linkage Disequilibrium*). En ocasiones, la presencia de un alelo en un determinado locus conlleva una elevada probabilidad de que otro alelo particular esté presente en un sitio vecino del mismo cromosoma. Estos alelos relacionados se heredan en bloques llamados haplotipos. Los haplotipos, aunque pueden contener un gran número de SNPs, se pueden identificar utilizando un número reducido de éstos, lo que permite maximizar el contenido de información, reduciendo el número de análisis, tanto en los estudios de ligamiento como en los de asociación (*Schmith VD et al., 2003*).

- Inserción / Delección

Estos polimorfismos genéticos resultan de la adición o eliminación de uno o varios nucleótidos en la secuencia de ADN. El tipo más común son las repeticiones de un número variable de bases. Los microsatélites, a menudo referidos como “*simple tandem repeats*” (STRs), consisten en la repetición de un número variable de veces de dos, tres o cuatro nucleótidos. En cambio, las repeticiones de los VNTRs (*variable number of tandem repeat*) o minisatélites pueden contener desde cinco a cerca de cien nucleótidos.

Otro tipo de polimorfismo de inserción/delección incluye la presencia o ausencia de segmentos Alu en una determinada localización genética. Estos fragmentos consisten en dos secuencias de una longitud de aproximadamente 120-150 bases separadas por un segmento rico en adenina. Las inserciones Alu son fáciles de identificar y de genotipar dadas las grandes diferencias en los fragmentos amplificados. Las inserciones de este tipo se dan en un promedio de aproximadamente 3 Kb y se encuentran mayoritariamente en regiones no codificantes. No se conoce la función de estas secuencias altamente representadas en el genoma humano (más de un millón) y aunque algunos las han descrito como ADN “junk”

(basura), otros las consideran como un sistema auténtico, equivalente a plásmidos de bacterias o a genes transponibles (*Schmith VD et al., 2003*).

#### **c) Funcionalidad**

Existen diferentes consecuencias funcionales dependiendo del tipo de cambio genético que produzca el polimorfismo (*Strachan T and Read AP, 2004b*):

- *Cambio sinónimo o silencioso*: cuando el cambio resulta en un nuevo codón que codifica para el mismo aminoácido. Son los que se observan más frecuentemente en la secuencia codificante de ADN.
- *Cambio sin sentido*: en este caso, un codón que codificaba para un aminoácido es reemplazado por un codón stop, produciendo en la mayoría de los casos una importante reducción en la función del gen.
- *Cambio de pérdida de sentido (“missense”)*: donde el codón alterado codifica un aminoácido diferente. Estos pueden ser conservativos, cuando el aminoácido es sustituido por otro que es similar químicamente, o no conservativos, cuando no son similares. Normalmente el primer tipo tiene un efecto mínimo en la función de la proteína.

La funcionalidad vendrá marcada por la localización del polimorfismo en la secuencia de ADN. Los que se encuentran en la región codificante pueden ser funcionales ya que en ocasiones alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. En los estudios de farmacogenética, los polimorfismos funcionales, es decir los que provocan una consecuencia visible y diferencial en el fenotipo, tienen un interés especial. No obstante, también pueden tener un gran impacto en el fenotipo los polimorfismos que se encuentran en intrones, regiones de “splicing” o “de corte y empalme”, en regiones no codificantes del mRNA, en la región 5’flanqueante (o región promotora) y al menos 150 pares de bases después del último exón. Por último, los polimorfismos intergénicos, localizados entre los genes a lo largo del genoma, son los más abundantes y, en general, no producen ningún cambio en el fenotipo (*Strachan T and Read AP, 2004b*).

## **3.10 FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS**

---

### **3.10.1 HISTORIA Y CLASIFICACIÓN**

En el año 1947, gracias a las observaciones realizadas por Laborit con diversas sustancias, como la prometazina (una fenotiazina), que fueron utilizadas a modo de anestésicos por su efecto sedativo, se llevó a cabo la modificación de la estructura de la fenotiazina produciendo el primer antipsicótico utilizado, la clorpromazina. Su efecto antipsicótico fue demostrado por Delay y Deniker en 1953 al observar que estos fármacos controlaban los síntomas de los pacientes psicóticos sin provocarles una excesiva sedación (*Rang HP et al., 2008a*). Al descubrimiento de la clorpromazina le siguió el desarrollo de nuevas sustancias entre las que destacó, por su extensísimo uso, el haloperidol (*Flórez J, 2008*).

No obstante, el término antipsicótico aparece por primera vez en el año 1963, gracias a las investigaciones realizadas por Carlsson sobre el efecto clínico de la clorpromazina y el haloperidol. Carlsson observó que estas sustancias producían un incremento en el recambio de las monoaminas, que se traducía en un incremento de los niveles de sus metabolitos, y sugirió que podría ser un efecto compensatorio debido al bloqueo de los receptores de estas monoaminas. Posteriormente, Seeman postuló que los fármacos antipsicóticos ejercían su acción interaccionando con receptores de dopamina, y dicha acción estaba estrechamente relacionada con la respuesta antipsicótica (*Seeman P, 1987*).

En la década de los 70 se desarrollaron otros fármacos antipsicóticos en respuesta a los problemas existentes con los neurolépticos utilizados hasta el momento, como por ejemplo, la falta de eficacia en algunos pacientes, la pobre mejoría de los síntomas negativos y cognitivos o los efectos secundarios que producían, entre los que destacan un grupo de alteraciones motoras conocidas con el nombre de síntomas extrapiramidales o EPS (del inglés, *extrapyramidal symptoms*). A estos nuevos fármacos se los denominó antipsicóticos atípicos, para diferenciarlos de los ya existentes (antipsicóticos típicos). La clozapina fue el primer AP atípico sintetizado. A pesar de presentar una elevada eficacia en el tratamiento de los síntomas variados de la esquizofrenia y de reducir la incidencia de los EPS, su utilización quedó limitada debido a sus serios efectos adversos, como la agranulocitosis. A partir de los años 90 se empezaron a desarrollar una segunda generación de APs atípicos imitando el perfil farmacodinámico de la clozapina. Esto permitió obtener fármacos efectivos en el tratamiento

tanto de los síntomas positivos como de los negativos, reduciendo el riesgo de desarrollar alteraciones motoras y obviando la agranulocitosis (*Kapur S and Remington G, 2001*).

En la actualidad existe una multitud de APs típicos y atípicos utilizados en clínica. En la tabla 4 podemos encontrar algunos de estos APs agrupados en función del grupo químico al que pertenecen. Aunque la distinción entre los dos grupos no está claramente definida, ésta depende del perfil farmacodinámico, la incidencia de efectos secundarios extrapiramidales (menor en los de segunda generación), la eficacia en el grupo de pacientes resistentes al tratamiento (especialmente de la clozapina) y la eficacia sobre los síntomas negativos (superior en los atípicos) (*Rang HP et al., 2008a*).

**Tabla 4. Clasificación de los principales fármacos antipsicóticos** (*Flórez J, 2008*).

<b>Antipsicóticos típicos</b>
Fenotiazinas:
Alifáticas: clorpromazina y trifluopromazina
Piperidínicas: tioridazina, metopimazina y pipotiazina
Piperazínicas: flufenazina, perfenazina y trifluoperazina
Tioxantenos: clorprotixeno, tiotixeno, zuclopentixol
Butiferas: haloperidol y droperidol
Difenilbutilpiperidinas: pimozida
Análogos de fenotiazinas: loxapina y clotiapina
<b>Antipsicóticos atípicos</b>
Benzamidas: sulpiride, tiaprida y racloprida
Dibenzodiazepinas: clozapina y olanzapina
Dibenzotiazepinas: quetiapina y metiapina
Benzisoxazol: risperidona

### 3.10.2 MECANISMO DE ACCIÓN

#### a) Bloqueo de los receptores de dopamina D<sub>2</sub>

Los antipsicóticos deben su efecto terapéutico fundamentalmente al bloqueo de los receptores D<sub>2</sub>. Ambos tipos de APs, típicos y atípicos, presentan diferentes afinidades por este receptor. Existe una correlación entre la afinidad de los APs por el receptor D<sub>2</sub> y las concentraciones plasmáticas del fármaco que son clínicamente eficaces, por lo que la ocupación de estos receptores sirve de guía para realizar predicciones de respuesta a los APs. El nivel óptimo para una respuesta farmacológica requiere un bloqueo del 65-70%.

Ocupaciones mayores al 80% están asociadas con un aumento de la incidencia de los EPS (Flórez J, 2008). En el caso de la clozapina, que presenta una elevada afinidad por el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2</sub>, se ha visto que su eficacia se da cuando sus niveles plasmáticos permiten una ocupación del receptor D<sub>2</sub> de entre el 50 y 60% (Kapur S. and Mamo D, 2001; Kapur S and Seeman P, 2001). En el caso de pacientes no respondedores, a pesar de que tengan una ocupación de los receptores D<sub>2</sub> adecuada, el hecho de llevar mucho tiempo medicándose podría haber provocado una *up-regulation* o hipersensibilidad de los receptores D<sub>2</sub>, haciendo que se necesiten aumentos en las dosis para producir los mismos efectos en la transmisión dopaminérgica (Miyamoto S et al., 2005). Posteriormente se observó que el bloqueo de los receptores D<sub>2</sub> y la eficacia clínica no siempre seguían una relación lineal ya que algunos pacientes que respondían bien al tratamiento antipsicótico mostraban niveles bajos de bloqueo D<sub>2</sub> (Jones HM and Pilowsky LS, 2002).

**Tabla 5. Afinidades relativas de los Aps por diferentes receptores, a dosis terapéuticas.**

Receptor	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	5-HT <sub>2c</sub>	α <sub>1</sub>	α <sub>2</sub>	H <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
Clozapina	+	++	+	++	+	+++	++	+++	+	+++	++++
Risperidona	+	++++	++	-	-	++++	++	+++	++	+	-
Olanzapina	++	+++	+	++	-	+++	++	++	+	+++	+++
Quetiapina	-	+	-	-	-	+	-	+++		++	++
Ziprasidona	+	+++	++	++	+++	++++	++++	++	-	+	-
Sertindol	++	+++	++	+		++++		++	+	+	-
Sulpirida	-	++++	++	-		-		-	-	-	-
Amisulpride	-	++++	++	-		-		-	-	-	-
Zotepina	+	++	++	+	++	+++		++	++	++	+
Aripiprazol	+	++++	++	++	+++	++	++	+	+	+	-
Haloperidol	+	++++	++	+++	-	+	-	+++	-	-	-
Flufenazina		++++		+		+++		++			

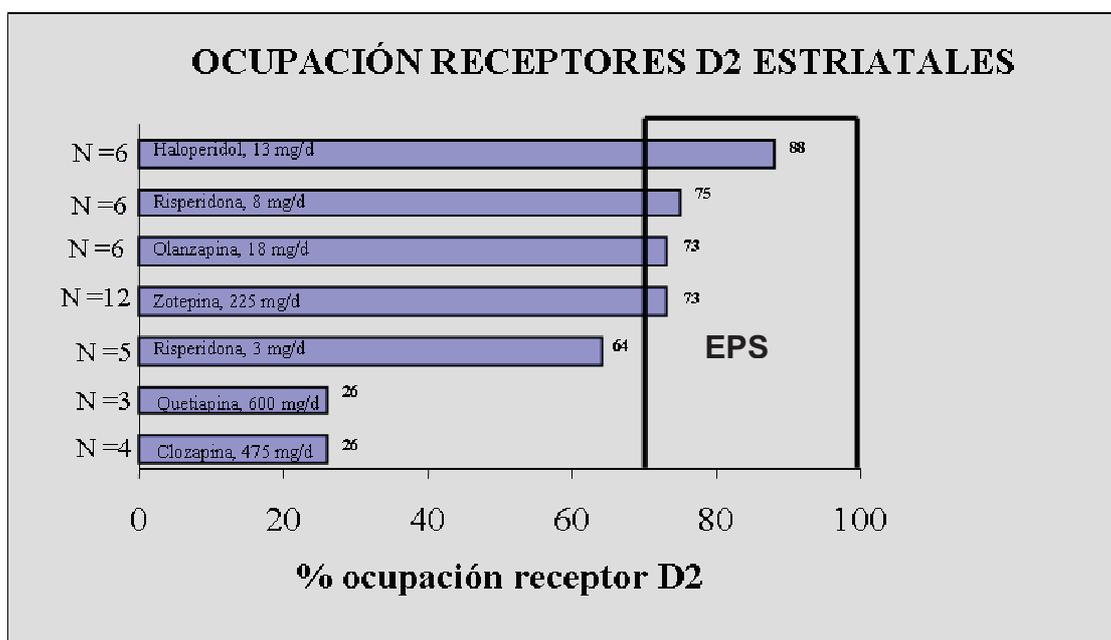
- mínima o ninguna; + baja; ++ moderada; +++ alta; ++++ muy alta (Miyamoto S et al., 2005; Jarskog LF et al., 2007).

Se ha podido demostrar que, aunque todos los APs con una eficacia clínica poseen al menos cierto grado de antagonismo por los receptores D<sub>2</sub>, la mayor parte de ellos también tienen afinidad por distintos receptores de otros sistemas de neurotransmisión (Tabla 5). Por lo que lo más probable es que también haya otros sistemas implicados (Kapur S. and Mamo D, 2001; Flórez J, 2008).

Se ha intentado relacionar el bloqueo dopaminérgico en las vías mesolímbica y mesocortical con la acción sobre los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia. Estudios preclínicos con amisulpride, AP atípico que presenta una elevada afinidad por los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, y que presenta poca afinidad para la familia de receptores D<sub>1</sub> o por receptores no dopaminérgicos, mostraron que no había una relación directa entre su afinidad por estos receptores y su eficacia clínica. Se vio que dosis bajas de amisulpride mejoraban sobretodo los síntomas negativos, relacionando este efecto con un bloqueo de autorreceptores de la familia D<sub>2</sub> presinápticos en regiones corticales, donde la densidad de receptores es baja, llevando a un incremento en la liberación de dopamina y de la neurotransmisión dopaminérgica. Dosis mayores producían una disminución de la actividad de los receptores de dopamina postsinápticos del núcleo accumbens, produciéndose una reducción de la transmisión dopaminérgica y obteniendo una mejoría de la sintomatología positiva (*Pani L et al., 2002*).

Como se ha comentado con anterioridad, uno de los efectos secundarios más importante de los fármacos APs, sobretodo de los típicos, son los síntomas extrapiramidales. La causa más probable del desarrollo de este efecto adverso es el grado de ocupación por los APs de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> de la vía nigroestriada. Las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales ejercen una inhibición sobre las neuronas colinérgicas en esta región, por lo que un bloqueo de los receptores dopaminérgicos por los APs llevaría a un exceso de la actividad colinérgica que se asocia al parkinsonismo. Estudios farmacodinámicos con APs han sugerido que una ocupación de receptores D<sub>2</sub> en el estriado menor al 70% no produciría EPS, una ocupación entre el 70% y el 80% aumentaría el riesgo a padecerlos, y con una ocupación mayor al 80%, el riesgo de aparición de EPS sería muy elevado (*Kasper S et al., 1998*). Resultados obtenidos mediante técnicas de SPECT y PET sugieren que la clozapina y el haloperidol se sitúan en los dos extremos opuestos en cuanto al riesgo de EPS precisamente por sus ocupaciones de los receptores D<sub>2</sub> estriatales baja y elevada, respectivamente. La clozapina y la quetiapina presentan una baja ocupación de receptores D<sub>2</sub> estriatales (26%) que se correlaciona con el bajo riesgo de estos dos APs de producir EPS. El haloperidol presenta un elevado riesgo de EPS por su elevada ocupación de receptores D<sub>2</sub> estriatales (88%). La capacidad de la risperidona y la olanzapina de producir EPS varía en función de la dosis utilizada, presentando una ocupación de los receptores de entre un 60% y un 80% según la dosis. En la figura 7 se muestra la diferente ocupación estriatal de los receptores D<sub>2</sub> y el riesgo de producir EPS por diferentes APs.

El exceso de la actividad colinérgica causante del extrapiramidalismo es más marcado cuando los APs no poseen actividad anticolinérgica inherente. No obstante, se deben considerar otros sistemas de neurotransmisión ya que este mecanismo por bloqueo dopaminérgico no explica que el bloqueo de los receptores se dé en las primeras horas después de haber iniciado el tratamiento, mientras que los síntomas parkinsonianos pueden no aparecer hasta después de días o semanas. Además, puede aparecer una tolerancia a estos efectos adversos a lo largo del tiempo, que se debería a una adaptación a través de otros sistemas de neurotransmisión (*Barnes TRE and Spence SA, 2000*).



**Figura 7. Ocupación de los receptores D<sub>2</sub> estriatales por diferentes APs típicos y atípicos** (*Kasper S et al., 1998*).

#### b) Otros mecanismos

El hecho de que los APs atípicos muestren una elevada heterogeneidad en su perfil farmacológico ha conducido al desarrollo de diversas teorías para poder explicar el mecanismo de acción de estos fármacos.

- Teoría del antagonismo serotonina-dopamina:

En general, todos los APs atípicos, excepto el amisulpride, la sulpirida y el aripiprazol, presentan un elevado cociente de afinidad 5-HT<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> que podría explicar porqué estos fármacos proporcionan cierta protección frente a los EPS y muestran superioridad en el tratamiento de los síntomas negativos (*Abi-Dargham A and Laruelle M, 2005*). Se ha

observado que una estimulación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> actuaría como freno de la transmisión dopaminérgica, por lo que su bloqueo facilitaría la acción dopaminérgica disminuyendo así el riesgo de aparición de EPS (*Mortimer AM, 2004*). Además, se ha observado un efecto sinérgico en el antagonismo de los receptores D<sub>2</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, llevando a un aumento de la función dopaminérgica prefrontal, efecto que no se ha observado cuando se administran antagonistas selectivos para estos receptores específicamente. Sin embargo, existen varias evidencias que contradicen esta teoría como la falta de reproducción del carácter atípico cuando se añade un antagonista del receptor 5-HT<sub>2A</sub> a un fármaco que bloquea los receptores D<sub>2</sub>, o la existencia de varios APs típicos que presentan elevadas afinidades para el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, entre otras. Además de todo esto, el grado de carácter atípico de los APs (considerando la aparición de EPS como indicador) no coincide con el orden de sus cocientes 5-HT<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub>. Por ejemplo, el orden de menor riesgo de aparición de EPS es: quetiapina > olanzapina > risperidona, mientras que sus coeficientes 5-HT<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> están exactamente en el orden opuesto (*Kapur S and Mamo D, 2001; Kapur S and Seeman P, 2001*). Aunque el antagonismo del receptor 5-HT<sub>2A</sub> parece que juega un papel importante en la capacidad antipsicótica de los fármacos, éste no es el único responsable. Parece que el antagonismo de este receptor serotoninérgico complementaría el antagonismo D<sub>2</sub> dando como resultado el efecto antipsicótico.

- Baja afinidad por los receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub>:

La baja afinidad de algunos APs atípicos por los receptores D<sub>3</sub> respecto a los típicos podría ser uno de los mecanismos de acción de estos fármacos. Por otro lado, el hecho de que ratones *knockout* para el gen *DRD3* presenten hiperactividad motora ha llevado a pensar que la aparición de EPS se podría explicar, en parte, por el bloqueo de los receptores D<sub>3</sub> (*Holmes A et al., 2004*).

- Elevada afinidad por los receptores D<sub>4</sub>:

El hecho de que la clozapina presente una elevada afinidad para los receptores D<sub>4</sub> y de que éstos tengan una localización mayoritariamente extraestriatal, propuso la participación de los D<sub>4</sub> en la actividad atípica de los antipsicóticos. No obstante, el hecho de que otros APs, incluyendo APs típicos, también presenten una elevada afinidad para los receptores D<sub>4</sub> y que fármacos con una afinidad selectiva para estos receptores no muestren actividad antipsicótica, ha hecho que esta teoría pierda importancia (*Kapur S and Remington G, 2001*).

- Carácter agonista sobre los receptores dopaminérgicos:

El aripiprazol, a diferencia de los APs típicos y atípicos actualmente comercializados, actúa como agonista parcial de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, es decir que actuará como agonista o antagonista en función de la presencia de dopamina endógena en el entorno del receptor. Los síntomas positivos de la esquizofrenia causados por una hiperactividad dopaminérgica en la vía mesolímbica estarían controlados mediante la acción antagonista del aripiprazol. En cambio, los negativos originados por una hipoactividad dopaminérgica de la vía mesocortical estarían controlados mediante la acción agonista del fármaco. Por eso se conoce como el “estabilizador del sistema dopaminérgico”. Aunque llega a ocupar el 90% de los receptores dopaminérgicos estriatales no suele originar EPS, quizá por esta acción parcial que evita un bloqueo completo (*Flórez J, 2008*).

- Interacción de los APs con el sistema glutamatérgico:

La capacidad de los APs atípicos de antagonizar los efectos de la hipofunción del receptor NMDA, similares a los que se presentan en la esquizofrenia, podría ser otro mecanismo terapéutico de la acción de los APs atípicos. Aunque no se conoce bien el mecanismo, se ha sugerido que el metabolito activo de la clozapina, la N-desmetilclozapina, potencia la función de los receptores NMDA al actuar como agonista de los receptores muscarínicos M<sub>1</sub> (*Miyamoto S et al., 2005*).

- Rápida disociación de los receptores D<sub>2</sub>:

Los APs atípicos presentan una elevada capacidad de disociación de los receptores D<sub>2</sub>. Kapur y Seeman sugirieron que una rápida disociación de los receptores D<sub>2</sub> obligaría al AP a acomodarse a la transmisión dopaminérgica fisiológica. Esto permitiría un efecto antipsicótico sin EPS, hiperprolactinemia y con mayores beneficios cognitivos y afectivos, ya que se daría una atenuación de la transmisión dopaminérgica, pero sin alterar el papel fisiológico del neurotransmisor. Por otra parte, se ha demostrado que un bloqueo intermitente del sistema dopaminérgico hace que éste se haga más sensible, lo que podría explicar que fármacos con una elevada velocidad de disociación, como la clozapina, puedan sensibilizar el sistema dopaminérgico y sean eficaces en algunos pacientes en los que el tratamiento con APs típicos (con velocidad de disociación lenta) ha dejado de funcionar (*Kapur S and Seeman P, 2001*).

- Elevada ocupación en regiones extraestriatales:

Se ha sugerido que algunos APs atípicos como la clozapina, la olanzapina, el sertindol, la risperidona y el amisulpride, presentan un bloqueo preferencial de los receptores de dopamina D<sub>2</sub> extraestriatales relativo a los estriatales. Esto explicaría la menor aparición de EPS que dan los fármacos APs atípicos (*Kapur S. and Mamo D, 2001*).

#### 3.10.3 EFICACIA DE LOS ANTIPSICÓTICOS

Además de las propiedades sedantes o tranquilizantes de estos fármacos (efecto neuroléptico), en general, los antipsicóticos actúan mejorando o suprimiendo el síndrome esquizofrénico, especialmente los síntomas positivos. También son capaces de reducir el riesgo de recaídas, y cuando dicha medicación es interrumpida, incluso tras varios años de terapia efectiva, el riesgo de recaída aumenta entre el 60-70% (*Krausz M, 2002*).

- *Síntomas positivos:* Aproximadamente el 30% de los pacientes con síntomas psicóticos agudos, presentan poca o ninguna respuesta a los APs típicos, más del 60% presentan una respuesta parcial y aproximadamente el 20% pueden sufrir recaídas (*Miyamoto S et al., 2005*). A pesar de las diferencias existentes en la potencia, las propiedades farmacológicas y en la capacidad de inducir efectos adversos, los fármacos APs típicos presentan una eficacia similar en el tratamiento de los síntomas psicóticos de la esquizofrenia y en la prevención de su recurrencia. Muchos APs atípicos parecen ser, como mínimo, tan efectivos para los síntomas psicóticos como los APs típicos (Tabla 6).
- *Síntomas negativos:* Los APs típicos son eficaces en el tratamiento de los síntomas negativos primarios (inherentes a la enfermedad), lo que ocurre es que tienden a provocar síntomas negativos secundarios (resultado de síntomas positivos mal controlados y de la aparición de efectos adversos). Por esta razón, aunque los APs atípicos han mostrado ser más efectivos sobre estos síntomas, existen dudas de si la superioridad observada es un reflejo del menor riesgo de producir EPS o es un efecto independiente en la mejora de los síntomas negativos primarios. No obstante, se ha sugerido que la risperidona y la olanzapina sí que ejercen efectos directos en los síntomas negativos primarios (Tabla 6) (*Miyamoto S et al., 2005*).

- *Síntomas cognitivos y afectivos:* Parece que los APs atípicos, a diferencia de los típicos, darían lugar a una mejora del deterioro cognitivo a nivel de la fluidez verbal, las funciones motoras y las funciones ejecutivas. Sin embargo, no está claro si este efecto se podría deber al menor riesgo de EPS y la posible mayor eficacia en el tratamiento de los síntomas negativos de los APs atípicos (*Krausz M, 2002*).

Existen evidencias de que los APs atípicos podrían tener efectos beneficiosos sobre los trastornos afectivos de la esquizofrenia.

Todos los APs han mostrado mejorar la calidad de vida de los pacientes. Aunque aún se han de llevar a cabo muchos estudios, los datos existentes hasta el momento parecen indicar una mayor eficacia de los APs atípicos. Además, en pacientes refractarios al tratamiento, la clozapina ha mostrado una elevada eficacia en el tratamiento de los síntomas psicóticos de estos pacientes (*Kapur S and Remington G, 2001; Miyamoto S et al., 2005*).

Los fármacos antipsicóticos además han demostrado ser una terapia eficaz en el tratamiento de otras enfermedades con sintomatología psicótica, como el trastorno bipolar. En estos pacientes se ha demostrado que la combinación de antipsicóticos con antidepresivos permite obtener mayor éxito terapéutico que la monoterapia antidepresiva (*Berk M and Seetal D, 2005; Calabrese JR et al., 2005*).

**Tabla 6. Eficacia de los APs típicos y atípicos**

Eficacia	APs atípicos						APs típicos (por potencia <sup>1</sup> )		
	Aripiprazol	Clozapina	Olanzapina	Quetiapina	Risperidona	Ziprasidona	Alta	Media	Baja
Positivos	++	++++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Negativos	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Recaídas	++	++++	+++	?	+++	?	++	++	++

++++ muy alta; +++ alta; ++ moderada; + baja; ? pobremente definido. <sup>1</sup> Ejemplos de APs típicos de elevada potencia son el flupentixol, la flufenazina, el haloperidol y la trifluoperazina; APs de potencia moderada incluyen la loxapina y el zuclopentixol; y APs de baja potencia incluyen a la clorpromazina, la metotrimezina y la tioridazina (*Gardner DM et al., 2005*).

### 3.10.4 EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS ANTIPSICÓTICOS

Como la mayoría de fármacos, los antipsicóticos dan lugar a diferentes efectos secundarios en función de las características del paciente, del tipo de antipsicótico utilizado y de la dosis utilizada, entre otros factores. La clorpromazina, primer antipsicótico utilizado,

actuaba sobre varios receptores colinérgicos y monoaminérgicos dando lugar a una variedad de efectos secundarios como sequedad de boca, problemas de motilidad intestinal y urinarios, sedación y complicaciones cardiovasculares. Cuando se demostró que su eficacia antipsicótica se debía al bloqueo de los receptores D<sub>2</sub>, las investigaciones se dirigieron a desarrollar antagonistas selectivos de estos receptores, como el haloperidol. Sin embargo, el aumento de la potencia hacia los D<sub>2</sub> dio lugar a un aumento del riesgo de desarrollar efectos extrapiramidales. Dada la incapacidad que produce este efecto secundario, se empezaron a desarrollar los APs atípicos, el primero de los cuales, como ya se ha comentado anteriormente, fue la clozapina, que presentó un menor riesgo de EPS pero daba lugar a otro efecto adverso, la agranulocitosis. Aunque sólo un 1% de los pacientes tratados con clozapina desarrollaba este efecto secundario, debido a su gravedad, el uso de este AP quedó restringido a pacientes refractarios. A pesar de que se han desarrollado otros APs atípicos que tienen un menor riesgo de producir EPS, a comparación de los APs típicos, y que no provocan agranulocitosis, éstos dan lugar a otros efectos secundarios no deseados (*Kapur S and Remington G, 2001*).

Dada la importancia de la sintomatología extrapiramidal causada por los antipsicóticos, y dado que esta tesis se basa en el estudio farmacogenético de este efecto secundario, se prestará una especial atención a este punto.

#### **a) Síntomas extrapiramidales**

Los síntomas extrapiramidales son un grupo de alteraciones del movimiento que el paciente puede experimentar al recibir la terapia antipsicótica. Este efecto secundario reduce considerablemente la calidad de vida del paciente, no sólo por la incapacidad física que provoca, sino también por el rechazo social que genera, lo que supone un obstáculo para la rehabilitación y las perspectivas en la búsqueda de empleo. Sin embargo, la peor consecuencia de los EPS en los pacientes es el incumplimiento del tratamiento, ya que da lugar a recaídas con la aparición de nuevos brotes psicóticos.

Existen pacientes que presentan un riesgo más elevado de padecer EPS, entre los que encontramos a ancianos, adolescentes y pacientes con daños neurológicos (demencia o parkinson). Los clínicos utilizan dosis menores de los APs típicos en estas poblaciones de riesgo, pero dado que éstos presentan un elevado riesgo de producir EPS, a menudo estas dosis bajas son subterapéuticas y continúan estando asociadas con la sintomatología extrapiramidal. Por ello, se recomienda tratar a estas poblaciones con APs atípicos. De todas formas la aparición de este efecto secundario depende del tipo de fármaco y de la dosis

administrada. Mientras que la clozapina y la quetiapina tienen un menor riesgo de provocar EPS en todas sus dosis clínicas, la incidencia de EPS para la risperidona y la olanzapina es dependiente de la dosis (*Academic Highlights, 2000*).

La severidad de los EPS se puede evaluar mediante diferentes escalas como la *Abnormal Involuntary Movement Scale* (AIMS), la *Barnes-Akathisia Scale* (BAS) o la *Simpson-Angus Scale* (SAS) (*Kane JM, 2001*).

Podemos diferenciar dos tipos de EPS: los EPS agudos y los síndromes tardíos.

### **EPS agudos**

Los EPS agudos aparecen entre las primeras semanas del inicio del tratamiento y nunca después de los dos meses, además son reversibles con la aplicación de una serie de medidas. Los EPS agudos incluyen el parkinsonismo, la acatisia y la distonía. Si el paciente experimenta cualquiera de estos síntomas, la primera estrategia a seguir será la reducción de la dosis o el cambio de AP por otro de menor potencia o por uno atípico. Un porcentaje muy elevado de pacientes tratados con APs típicos desarrollan EPS agudos, y a pesar de que los APs atípicos tienen un menor riesgo, siguen produciendo esta sintomatología en una proporción importante de pacientes.

- *Parkinsonismo:*

Sus síntomas son muy parecidos a los que se dan en la enfermedad de Parkinson: disminución de la expresión facial, rigidez, enlentecimiento de los movimientos (bradicinesia), sialorrea (secreción excesiva de saliva), temblor y alteración de los reflejos posturales. Los AP típicos producen parkinsonismo en un 50% de los pacientes. En el caso de la risperidona y olanzapina, es proporcional al aumento de la dosis, mientras que con la quetiapina y la ziprasidona este efecto prácticamente no se observa. En pacientes con enfermedad de Parkinson, la quetiapina es el AP de elección para el control de la psicosis (*Kane JM, 2001*). Los clínicos pueden utilizar fármacos anticolinérgicos, como el biperideno, para tratar esta sintomatología, aunque hay que tener en cuenta que aparecerán otros efectos secundarios como la sequedad de boca o la taquicardia, típicos de este tipo de fármacos (*Barnes TRE and Spence SA, 2000*).

- *Acatisia:*

Este efecto secundario se caracteriza por una hiperactividad motora del paciente, que presenta una sensación subjetiva de inquietud, ansiedad y necesidad de moverse (*Academic Highlights, 2000*). Por lo general, aparece al cabo de pocas horas o días de iniciarse el tratamiento, aunque también se puede dar después de una prolongada exposición (acatisia tardía). Un 20-40% de los pacientes tratados con APs desarrollan acatisia, siendo más frecuente con el uso de los típicos (*Barnes TRE and Spence SA, 2000*). Entre los factores de riesgo de acatisia encontramos: el uso de elevadas dosis de AP o de un antipsicótico de elevada potencia, una escalada rápida de dosis, así como el consumo de estimulantes (*Kulisevsky J. and Otermin P, 2003*). El uso de  $\beta$ -bloqueantes como el propanolol o el metoprolol para tratar la acatisia ha resultado ser más eficaz que el uso de anticolinérgicos (*Barnes TRE and Spence SA, 2000*).

- *Distonía aguda:*

Se caracteriza por la presencia de espasmos musculares prolongados y movimientos repetitivos o sostenidos de carácter torsional que hacen que el paciente adopte posturas anómalas (*Barnes TRE and Spence SA, 2000*). Los espasmos se dan en cuello, espalda, lengua, en los músculos que controlan el movimiento lateral de los ojos, etc. Se da en un 2-3% de los pacientes, aunque el porcentaje aumenta en el caso de los APs clásicos. Los jóvenes, el sexo masculino y el consumo de cocaína, son factores de riesgo, a los que se les han de sumar, el haber presentado este efecto anteriormente o el uso de APs de elevada potencia. La aparición de un episodio distónico agudo conlleva un mayor riesgo a padecer episodios distónicos tardíos (*Kulisevsky J. and Otermin P, 2003*). El uso de anticolinérgicos es efectivo tanto para prevenir como para tratar este efecto secundario. Las benzodiazepinas se pueden utilizar como relajantes musculares (*Barnes TRE and Spence SA, 2000*).

#### **Síndromes tardíos**

A diferencia de los agudos, los síntomas tardíos nunca aparecen antes de los 3-6 meses del inicio del tratamiento (aunque lo más frecuente es que aparezcan tras 1-2 años) y generalmente son irreversibles. Estos síntomas incluyen: la discinesia y la distonía tardías.

- *Discinesia tardía o TD (del inglés, Tardive Diskinesia):*

Se caracteriza por la presencia de movimientos y posturas anormales e involuntarias que afectan sobretudo a la musculatura craneal (movimientos bucolinguomasticatorios). Es más frecuente en la población anciana, en mujeres, en pacientes con lesiones cerebrales y en

aquellos que han sufrido otros EPS de forma precoz. Un tratamiento con APs interrumpido o el consumo de alcohol o drogas serían otros factores de riesgo. La clozapina, la risperidona y la olanzapina presentan un bajo riesgo de provocar discinesia tardía (*Barnes TRE and Spence SA, 2000; Kapur S and Remington G, 2001*). A pesar de que el tratamiento antipsicótico combinado con el anticolinérgico no supone un factor de riesgo, el uso de fármacos anticolinérgicos empeora esta sintomatología. Un 25% de los pacientes desarrollan discinesia tardía (*Barnes TRE and Spence SA, 2000*).

- *Distonía tardía:*

Los movimientos sostenidos suelen afectar la musculatura cervicocraneal, aunque también pueden afectar al tronco y a las extremidades. Como ya se ha comentado, el haber sufrido un episodio distónico agudo conlleva un mayor riesgo de padecer uno tardío. Alrededor de un 4% de los pacientes presentan esta sintomatología (*Barnes TRE and Spence SA, 2000; Kapur S and Remington G, 2001*).

#### **b) Otros efectos secundarios de los antipsicóticos**

- *Efectos endocrinos y metabólicos:*

Una de las acciones de la dopamina, a través de los receptores D<sub>2</sub> de la vía tuberohipofisaria, es la inhibición de la secreción de prolactina. El bloqueo de estos receptores por parte de los APs conlleva un incremento en la concentración plasmática de esta hormona. La hiperprolactinemia provoca a corto plazo galactorrea, amenorrea y disfunciones eréctil y de eyaculación. A largo plazo puede desencadenar osteoporosis, trastornos inmunológicos y puede aumentar el riesgo de algunos tipos de cáncer (*Kapur S and Remington G, 2001*). A excepción de la risperidona, los APs atípicos no causan este efecto secundario.

El bloqueo de los receptores de serotonina 5-HT<sub>2C</sub> y de histamina H<sub>1</sub> podría estar involucrado en el aumento de peso que experimentan algunos de los pacientes tratados con APs. Los APs que presentan un mayor tendencia en este sentido son la olanzapina y la clozapina, mientras que la ziprasidona no lo provoca (*Krausz M, 2002*).

Se han observado alteraciones en la tolerancia a la glucosa asociadas sobretodo al tratamiento con APs atípicos, siendo la clozapina y olanzapina fármacos de riesgo para este efecto adverso. También se ha observado aumento en los niveles lipídicos, sobretodo a nivel de los triglicéridos. Estos dos últimos efectos podrían estar relacionados con el aumento de peso (*Kapur S and Remington G, 2001*).

- *Sedación y bloqueo vegetativo:*

Muchos APs causan sedación que tiende a disminuir con un uso continuado de estos fármacos. La actividad antihistamínica ( $H_1$ ) contribuye a este efecto sedante y antiemético, pero no a la acción antipsicótica.

El bloqueo de los receptores muscarínicos origina diferentes efectos periféricos como visión borrosa, estreñimiento o retención urinaria. No obstante, este efecto resultaría beneficioso en lo que a los efectos extrapiramidales se refiere. La acción de la acetilcolina se opone a la de la dopamina y es posible que la relativa ausencia de EPS de la clozapina se deba a su elevada potencia antimuscarínica. El bloqueo de los receptores adrenérgicos  $\alpha$  no parece imprescindible para la acción antipsicótica, en cambio produce hipotensión ortostática y mareos (*Rang HP et al., 2008a*).

- *Síndrome maligno por antipsicóticos:*

Es una complicación rara pero muy grave. Consiste en rigidez muscular acompañada de una rápida elevación de la temperatura corporal y confusión mental. Suele ser reversible, pero en el 10-20% de los casos conduce a la muerte por insuficiencia renal o cardiovascular (*Rang HP et al., 2008a*).

- *Efectos cardiovasculares:*

Algunos APs causan una prolongación de la repolarización ventricular, que se refleja como una prolongación del intervalo QT en un electrocardiograma. La prolongación del intervalo QT se ha asociado con un aumento del riesgo de taquicardia ventricular polimórfica y con la muerte por causa cardíaca repentina. Este efecto junto con una elevada presión arterial, el aumento de peso, la hiperglicemia e hiperlipidemia constituyen los factores de riesgo cardiovascular asociados al consumo de APs (*Gardner DM et al., 2005*).

La depresión inducida por la risperidona, la ictericia asociada a las fenotiazinas, como la clorpromazina, o la leucopenia y agranulocitosis que causa la clozapina, serían otros efectos adversos. Las reacciones cutáneas urticariales son frecuentes pero en general leves. También pueden dar lugar a una sensibilidad excesiva a la luz ultravioleta (*Rang HP et al., 2008a*).

### 3.10.5 SELECCIÓN DEL FÁRMACO ANTIPSICÓTICO

Como hemos podido comprobar, existe una gran variedad de fármacos antipsicóticos y son varios los factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar uno de ellos. En función de las características del paciente (sintomatología, riesgo basal de desarrollar algún efecto secundario propio de algún AP, tratamiento con otros fármacos, etc.), se valorará que fármaco es el más adecuado. Algunas de las variables que se tienen en cuenta son: la potencia del AP, la necesidad o no de producir una sedación inicial, la probabilidad de producir EPS o síntomas vegetativos, o la necesidad de actuar sobre los síntomas negativos.

El haloperidol ha sido el AP más utilizado ya que conjuga su elevada potencia con una sedación débil y con pocas reacciones vegetativas. El grave inconveniente de este AP es su elevada capacidad de provocar EPS. La tendencia actual es iniciar el tratamiento con un AP atípico, ya que mejora la sintomatología negativa, las funciones cognitivas y supone un menor riesgo de EPS, por lo que facilita el cumplimiento de la terapia. Si un fármaco no muestra eficacia en un paciente, se incrementará la dosis del mismo fármaco, o bien se cambiará por otro. La clozapina únicamente estará indicada en caso de que el paciente no responda a otros fármacos antipsicóticos.

Con frecuencia, los pacientes presentan otros síntomas mentales como ansiedad, depresión, obsesión, etc. Esto condicionará la elección del AP ya que se tendrá que tener en cuenta la combinación de distintos fármacos.

Las características genéticas del paciente juegan un papel importante en la eficacia o toxicidad de los APs. Actualmente, se están llevando a cabo numerosos estudios farmacogenéticos para determinar que variaciones genéticas pueden ayudar a predecir tanto la eficacia como la seguridad de un AP para un determinado paciente.

## ➤ PAPEL DE LOS GENES *COMT*, *MAO* Y *DAT* EN EL RIESGO DE ESQUIZOFRENIA Y RIESGO DE EPS.

### 3.11. COMT (CATECOL-O-METILTRANSFERASA)

La COMT es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida por todo el organismo, incluido el cerebro. Se localiza en la fracción soluble citoplasmática, aunque también puede estar asociada a la membrana celular. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil-metionina (SAM) a un grupo hidroxilo del núcleo catecol de las catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina). El gen que codifica la COMT se localiza en la banda 22q11.21 del cromosoma 22 (*Inada T et al., 2003*) y consta de 6 exones separados por 5 intrones. Existen dos promotores, el P1 y el P2, que controlan la transcripción de dos mARNs. El mARN más corto (1.3Kb), sintetizado a partir del promotor P1, codifica una forma soluble de la proteína (S-COMT); y el mARN más largo (1.5Kb), sintetizado a partir del promotor P2, puede dar lugar a una forma de la COMT que se encuentra ligada a membrana (MB-COMT) o a la forma soluble S-COMT. La proteína de membrana consta de 50 aminoácidos más que la forma soluble (*Harrison PJ and Weinberger DR, 2005*) y a pesar de presentar una mayor afinidad para el sustrato, tiene una menor actividad catalítica (*Lotta T et al., 1995*). Ambas enzimas presentan una expresión diferencial, mientras que la MB-COMT se expresa predominantemente en cerebro (*Matsumoto M et al., 2003*), la S-COMT lo hace en otros tejidos y órganos como el hígado, la sangre y el riñón (*Lotta T et al., 1995*). Recientemente se ha identificado una tercera isoforma que parece ser más larga que la MB-COMT, aunque sus propiedades funcionales no se conocen todavía (*Tunbridge EM et al., 2006*).

Se han encontrado varios polimorfismos en el gen *COMT*. El que más ha sido estudiado por su relevancia funcional es el polimorfismo Val158Met (G158A o rs4680). Este polimorfismo consiste en una transición G-A en el exón 4 con el resultado de una sustitución del aminoácido valina (Val) por el aminoácido metionina (Met) en el codón 108 de la proteína soluble o en el 158 de la proteína de membrana. Este polimorfismo es responsable de una elevada variabilidad en la actividad enzimática de la proteína. El genotipo de baja actividad Met/Met (AA o COMT<sup>LL</sup>) presenta entre tres y cuatro veces menos actividad que el genotipo

de alta actividad Val/Val (GG o COMT<sup>HH</sup>). El genotipo Val/Met (GA o COMT<sup>HL</sup>) tiene una actividad enzimática intermedia (*Lotta T et al., 1995; Lachman HM et al., 1996*).

Aunque el polimorfismo Val158Met tiene una clara repercusión en la actividad enzimática de la COMT, es probable que otros polimorfismos participen en la compleja regulación genética de su actividad. Existe otra variante funcional (Ala72Ser o rs6267) que determina en gran parte la actividad de esta enzima. No obstante, este polimorfismo se ha detectado únicamente en población coreana y japonesa. Otros polimorfismos identificados, como por ejemplo el rs737865 del intrón 1 o el rs 165599 del extremo 3'-UTR, a pesar de no variar la secuencia aminoacídica, se ha descrito que forman un haplotipo junto al Val158Met que determina una disminución en la expresión de la COMT (*Bray NJ et al., 2003; Dempster EL et al., 2006*). Últimamente se ha puesto interés en el polimorfismo -278A/G (rs2097603 o rs2075507) dado que se encuentra situado en el promotor P2 del gen que da lugar a la forma predominante del cerebro. Aunque su funcionalidad no está clara, parece que da lugar a un cambio en la actividad enzimática (*Chen J et al., 2004*). Se han llevado a cabo múltiples estudios de haplotipos que incluyen, entre otros, los polimorfismos Val158Met y -278A/G (*Palmatier MA et al., 2004; Funke B et al., 2005, Sanders AR et al., 2005*).

### 3.11.1 POLIMORFISMOS DE LA COMT Y RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

Los estudios de ligamiento genético han identificado la región cromosómica 22q11, donde se localiza el gen *COMT*, como uno de los loci con mayor probabilidad de contener genes implicados en la susceptibilidad a la esquizofrenia (*Badner JA and Gershon ES, 2002*). Deleciones de fragmentos cromosómicos en este nivel dan lugar al síndrome velocardiofacial. El 30% de los pacientes con este síndrome desarrollan esquizofrenia o trastornos psicóticos relacionados (*Sanders AR et al., 2005*). Debido a esto y al papel biológico de la COMT en la degradación de la dopamina, el gen *COMT* representa uno de los genes candidatos para la esquizofrenia, tanto funcional como posicional, más importante en la actualidad. Además, se ha descrito que los pacientes esquizofrénicos presentan una baja actividad de esta enzima (*Wong AH and Van Tol HH, 2003*).

El polimorfismo Val158Met ha sido el más estudiado en psiquiatría debido a su carácter funcional. Se han llevado a cabo más de 15 estudios de asociación de este polimorfismo con la esquizofrenia y los resultados obtenidos son discrepantes. Mientras que un meta-análisis (*Glatt SJ et al., 2003*), llevado a cabo con 14 estudios caso-control y 5 con familias, encontró una leve asociación del alelo Val158 con la esquizofrenia, otros más recientes no han logrado demostrar dicha asociación (*Fan JB et al., 2005; Munafo MR et al.,*

2005). Estos resultados indican que en el caso de que existiese asociación, el efecto del polimorfismo Val158Met sería muy pequeño. Por esta razón se han empezado a estudiar otros polimorfismos en este gen que pudiesen tener un papel en el riesgo de desarrollar esquizofrenia.

Se ha descrito una fuerte asociación entre un haplotipo formado por los polimorfismos rs737865, rs4680 (Val158Met) y rs165599 y el riesgo de esta enfermedad mental (*Shifman S et al., 2002*). Estos haplotipos muestran una elevada heterogeneidad entre las diferentes poblaciones, por lo que los polimorfismos podrían no tener un efecto directo sobre la enfermedad, pero sí estar en desequilibrio de ligamiento con otras variantes genéticas, aún no identificadas, que serían las que realmente predisponen a sufrir la enfermedad (*Palmatier MA et al., 2004*)

El hecho de que el polimorfismo -278A/G esté en desequilibrio de ligamiento con el rs737865 y que se localice en el promotor P2, que origina la forma de la COMT predominante en cerebro, ha generado un interés especial en este polimorfismo (*Palmatier MA et al., 2004; Williams HJ et al., 2007*). Los resultados obtenidos en los escasos estudios de asociación del polimorfismo -278A/G con la esquizofrenia son contradictorios por lo que no se ha podido esclarecer si existe o no dicha asociación (*Norton N et al., 2002; Funke B et al., 2005; Sanders AR et al., 2005*).

#### 3.11.2 POLIMORFISMOS DE LA COMT Y RIESGO DE EPS

En modelos animales se ha visto que la COMT juega un papel importante en el córtex prefrontal, pero menor en el estriado, lugar donde se generan los EPS (*Karoum F et al., 1994; Huotari M et al., 2002*). La inactivación de la dopamina postsináptica prefrontal parece ocurrir principalmente por metilación mediada por la COMT. Matsumoto y col. (*Matsumoto M et al., 2003*) mostraron una mayor densidad del mRNA en el córtex prefrontal que en el estriado. Dado que la actividad prefrontal regula la actividad de la dopamina en el estriado (*Carr DB and Sesack SR, 2000*), polimorfismos de la COMT pueden influir en la actividad de las neuronas dopaminérgicas que se proyectan a la zona estriatal, y por lo tanto puede influir en la susceptibilidad a los EPS. La mayoría de trabajos han estudiado la relación entre el polimorfismo funcional, Val158Met, y discinesia tardía. Aunque hay estudios que muestran asociación (*Srivastava V et al., 2006*), la mayoría de éstos no lo consiguen (*Herken H et al., 2003; Matsumoto C et al., 2004; Lai IC et al., 2005; Kang SG et al., 2008*). Únicamente se ha realizado un estudio con EPS agudos en donde no se ha detectado ningún tipo de asociación con dicho polimorfismo (*Inada T et al., 2003*).

### **3.12 MAO (MONOAMINO OXIDASA)**

---

La Monoamino Oxidasa es una enzima mitocondrial que se encuentra presente tanto en células neuronales y no neuronales del cerebro, como en los órganos periféricos. Participa en la oxidación de aminas entre las que se encuentran la serotonina, noradrenalina y dopamina. En humanos existen dos isoformas: MAO-A, que cataliza preferentemente la desaminación oxidativa de la serotonina y noradrenalina; y MAO-B, que desamina preferentemente la feniletilamina y la benzilamina. Ambas participan en la degradación de la dopamina con una pequeña predominancia de actividad de la MAO-B. Encontramos proporciones diferentes de cada isoforma en función del órgano y de la especie. La MAO-B predomina en cerebro humano mientras que la MAO-A lo hace en el de rata. Dichas isoformas también se encuentran compartimentadas en los diferentes tipos celulares del cerebro con una predominancia de la MAO-A en la glía y neuronas catecolaminérgicas, y de la MAO-B en neuronas serotoninérgicas así como también en las células gliales. Ambas tienen una elevada actividad en tálamo, siendo superior la actividad de la MAO-A en áreas corticales y de MAO-B en subcorticales (*Fowler JS et al., 2005*).

Las dos isoformas están codificadas por dos genes diferentes que se encuentran en posición contigua y orientaciones opuestas en el cromosoma X (Xp11.23-11.4). Tienen la misma organización exón-intrón, con 15 exones cada uno, lo que refleja la existencia de un gen ancestral común, que probablemente sufrió en el pasado una duplicación invertida. La MAO-A está formada por 529 aminoácidos y la B por 520. Ambas comparten un 70% de similitud en sus secuencias aminoácidas. Los promotores de ambos genes comparten elementos reguladores comunes, como los de respuesta a andrógenos (aunque éstos tienen un efecto más pronunciado sobre el promotor de la MAO-A), pero también tienen mecanismos específicos (sólo la MAO-B tiene elementos de respuesta a estrógenos). Las diferencias en la estructura de sus promotores sugieren que estas enzimas tienen diferentes papeles fisiológicos (*Shih JC, 2007*).

Varios polimorfismos se han asociado con variaciones en la expresión génica o en la actividad enzimática de la MAO-A. El polimorfismo 941T/G (rs6323), situado en el exón 8, se ha asociado con una baja (941T) y alta (941G) actividad enzimática de la MAO-A (*Hotamisligil GS and Breakefield XO, 1991*). Otro polimorfismo, el 30-bp VNTR, situado en la zona promotora del gen, se ha asociado con diferentes niveles de transcripción. Este polimorfismo tiene varios alelos en función del número de repeticiones que contenga de un

fragmento de 30 pares de bases. Los dos alelos más comunes son el de 3 y 4 repeticiones, los cuales se han asociado con bajos y altos niveles de transcripción, respectivamente. Los alelos de 3.5 y 5 repeticiones, menos comunes, también se han asociado a una mayor y menor transcripción del gen, respectivamente (*Sabol SZ et al., 1998*). Otro estudio mostró asociación del alelo de 3 repeticiones con una baja expresión de *MAO-A* respecto al resto de alelos (*Deckert J et al., 1999*).

En el gen *MAO-B* también se han descrito varios polimorfismos, el más común (A/G intrón 13 o A644G o rs1799836) corresponde a un cambio de una G por una A localizado a 36 pares de bases *upstream* del límite intrón 13- exón 14 (*Kurth JH et al., 1993; Ho SL et al., 1995*). Aunque esta sustitución no produce ningún cambio en la secuencia de la proteína, se ha asociado a variaciones en la actividad enzimática. *In vitro*, el alelo G se ha asociado con una elevada actividad (*Costa-Mallen P et al., 2005*). *In vivo*, se han encontrado resultados contradictorios en plaquetas: mientras que hay autores que no encuentran asociación, Garpenstrand y col. observaron una mayor actividad de la *MAO-B* en portadores del alelo G (*Garpenstrand H et al., 2000*). Sin embargo, en cerebro humano, el alelo G se ha asociado a una menor actividad de la enzima (*Balciuniene J et al., 2002*). Esta oposición se podría explicar gracias a los resultados de un tercer estudio que demuestran que no existe correlación entre la actividad de la *MAO-B* en plaquetas y en cerebro de los mismos individuos. Evidentemente, un control independiente de la actividad de *MAO-B* específico de cada tejido explicaría mejor los resultados obtenidos (*Costa-Mallen P et al., 2005*).

#### 3.12.1 POLIMORFISMOS DE LA MAO Y RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

Los resultados obtenidos en estudios de desequilibrio de ligamiento, con gemelos y con múltiples familias, demuestran la implicación en la esquizofrenia de la región del cromosoma X donde se localizan los genes *MAO-A* y *MAO-B* (*Hovatta I et al., 1999; Williams NM et al., 1999*). Por lo tanto, ambos genes se consideran candidatos del riesgo de esquizofrenia, no sólo posicionales, sino también funcionales por su papel en el metabolismo de la dopamina.

Polimorfismos en estos genes se han intentado asociar a trastornos mentales como el trastorno bipolar (*Müller DJ et al., 2007; Huang SY et al., 2008*), el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (*Domschke K et al., 2005; Xu X et al., 2007*) o la depresión (*Syagailo YV et al., 2001*). En cuanto a la esquizofrenia, se han llevado a cabo múltiples estudios de asociación y a pesar de que muchos no han conseguido demostrar que estos polimorfismos participen en el riesgo de desarrollar la enfermedad (*Coron B et al., 1996*;

*Syagailo YV et al., 2001; Norton N et al., 2002; Fan JB et al., 2004*), en ocasiones sí se ha podido mostrar asociación (*Jönsson EG et al., 2003*). No obstante, hay que resaltar que un reciente meta-análisis no ha encontrado asociación entre los polimorfismos de la MAO-A y el riesgo de esquizofrenia (*Li D and He L, 2008*).

### **3.12.2 POLIMORFISMOS DE LA MAO Y RIESGO DE EPS**

La actividad de las dos isoformas determina, en parte, la disponibilidad de dopamina en el estriado y puede estar asociada al riesgo de padecer efectos extrapiramidales. Hasta el momento se ha realizado un estudio de asociación, con resultados negativos, de los polimorfismos 30bp-VNTR de la MAO-A y A/G del intrón 13 de la MAO-B con el riesgo de padecer discinesia tardía en población esquizofrénica (*Matsumoto C et al., 2004*). No se ha descrito ningún estudio de asociación con efectos extrapiramidales a corto plazo.

### **3.13 DAT (TRANSPORTADOR DE DOPAMINA)**

El transportador de la dopamina o DAT pertenece a la familia de transportadores sodio-cloro dependiente con 12 dominios transmembrana. Se localiza en la membrana presináptica de las terminaciones nerviosas del sistema nervioso central, principalmente de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y del área tegmental ventral (*Bannon MJ et al., 2001*). Este transportador regula la duración de la actividad dopaminérgica extracelular mediante la recaptación de dopamina al interior de la neurona, donde será nuevamente almacenada en las vesículas (*Tunbridge EM et al., 2006*). El gen *DAT*, también denominado *SLC6A3* (*Solute Carrier Family 6, Member 3*) y *DAT1* está localizado en el cromosoma 5p15.3, se extiende aproximadamente unas 60kb y consta de 15 exones separados por 14 intrones (*Vandenbergh DJ et al., 1992*). La proteína que codifica está formada por 620 aminoácidos y se expresa en la membrana plasmática de las neuronas dopaminérgicas presinápticas. El papel de este transportador en el mantenimiento de los niveles dopaminérgicos ha animado a muchos investigadores a estudiar la posible implicación de este gen en diferentes trastornos neuropsiquiátricos.

El 40bp-VNTR (Variable Number Tandem Repeat) es uno de los polimorfismos del DAT más estudiados. Está localizado en la región no codificante 3' del gen, junto a la cola poliA. Este polimorfismo presenta varios alelos en función del número de repeticiones que tenga de un fragmento de 40 pares de bases. Las repeticiones pueden ir de 3 a 11, siendo las de

9 y 10 repeticiones las más frecuentes (*Vandenbergh DJ et al., 1992*). Este polimorfismo, a pesar de no afectar a la estructura ni a la función de la proteína resultante, se ha postulado que podría regular la expresión génica mediante el control de la estabilidad, la localización subcelular y la eficacia de traducción del mRNA (*Greenwood TA and Kelsoe JR, 2003*). Se han realizado múltiples estudios que han tratado de relacionar este polimorfismo con el fenotipo transportador, aunque los resultados no son concluyentes. Hay estudios en los que un incremento en la expresión del mRNA de *DAT* está asociado al alelo de 10 repeticiones (*Fuke S et al., 2001; Brookes KJ et al., 2007*), y en otros el incremento está asociado al de 9 repeticiones (*Miller GM and Madras BK, 2002; Fuke S et al., 2005*). Un estudio reciente encontró una disminución de la expresión asociada al genotipo homocigoto para el alelo de 10 repeticiones en la población control, mientras que en la población esquizofrénica el mismo genotipo se asoció a un aumento de la expresión (*Wonodi et al., 2008*).

Se ha descrito otro polimorfismo, el -67A/T o rs2975226, que se encuentra situado en la región promotora del gen y que consiste en un cambio de una adenina por una timina (*Rubie C et al., 2001*). Este polimorfismo parece mostrar una expresión diferencial del gen, donde el alelo T duplica la expresión de *DAT* en comparación con el alelo A (*Greenwood TA and Kelsoe JR, 2003*). Además, el hecho de que esté localizado en una región altamente conservada hace que sea un polimorfismo con un interés especial (*Khodayari N et al., 2004*).

#### 3.13.1 POLIMORFISMOS DEL DAT Y RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

En base a la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia, el papel del transportador de la dopamina ha sido y sigue siendo un objetivo de estudio. Recientemente, diferentes polimorfismos del gen se han asociado al riesgo de esquizofrenia (*Talkowski ME et al., 2008*). Tanto el polimorfismo 40bp-VNTR como el -67A/T han sido estudiados como posibles factores de riesgo de diferentes trastornos mentales como el trastorno bipolar (*Keikhaee MR et al., 2005; Ohadi M et al., 2006*) o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (*Cook EH et al., 1995; Ettinger U et al., 2006*). Se han llevado a cabo múltiples estudios de asociación entre el polimorfismo 40bp-VNTR y el riesgo de esquizofrenia, dando lugar a resultados contradictorios. Sin embargo, un meta-análisis que incluía seis de estos estudios no mostró ningún tipo de asociación (*Gamma F et al., 2005*). El papel en el riesgo de esquizofrenia del polimorfismo situado en la región promotora del *DAT* (-67A/T) también ha sido estudiado en diferentes poblaciones (*Khodayari N et al., 2004; Stöber G et al., 2006*) y parece que podría actuar como un factor de riesgo de la enfermedad.

### 3.13.2 POLIMORFISMOS DEL DAT Y RIESGO DE EPS

El *DAT* también se ha considerado un gen candidato para el riesgo de aparición de extrapiramidalismo por su participación en el control de la actividad dopaminérgica del sistema nigroestriado, ya que se localiza principalmente en las terminaciones nerviosas presinápticas de la sustancia nigra. A pesar de que no se ha conseguido asociar el polimorfismo 40bp-VNTR con el riesgo de discinesia tardía (*Segman RH et al., 2003; Srivastava V et al., 2006*), un estudio reciente ha mostrado asociación entre este polimorfismo y el riesgo de EPS (*Güzey C et al., 2007*). En cuanto al polimorfismo -67A/T, por el momento no existen datos sobre su papel en el riesgo de aparición de esta sintomatología secundaria.



## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

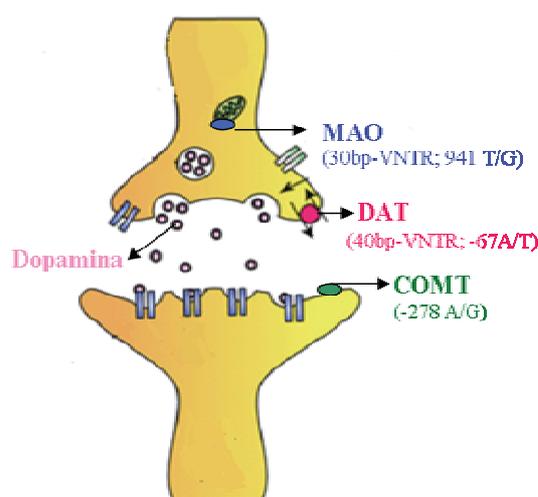


## 4.1 HIPÓTESIS

### 4.1.1 RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

La teoría más aceptada de la esquizofrenia, en la cual nos hemos basamos para el desarrollo de esta tesis, es la de la hiperactividad dopaminérgica. Según esta teoría los pacientes esquizofrénicos tendrían una mayor densidad de receptores dopaminérgicos, una mayor afinidad de estos receptores por la dopamina o simplemente una mayor disponibilidad de dopamina en la sinapsis que la población general. Nuestro grupo ha estudiado la implicación de diferentes factores genéticos en el riesgo de esta enfermedad (*Crescenti A et al., 2008a, Lafuente A et al., 2008*) y en esta tesis nos hemos centrado en el estudio de polimorfismos genéticos que determinan una mayor o menor disponibilidad de dopamina en la sinapsis, la cual depende de la actividad de enzimas como la COMT, la MAO-A y MAO-B y del transportador DAT.

Según nuestra hipótesis, el grupo de pacientes esquizofrénicos mostrará un exceso de los genotipos de los polimorfismos de la COMT (-278A/G), MAO-A (30bp-VNTR y 941T/G) y de la MAO-B (A/G intrón 13) que determinen una menor actividad enzimática y por lo tanto una menor degradación de dopamina, así como un exceso de los genotipos de los polimorfismos del DAT (40bp-VNTR y -67A/T) que determinen un menor transporte del neurotransmisor (Figura 8).



**Figura 8. Sinapsis dopaminérgica: variables a considerar en el riesgo de esquizofrenia y de aparición de EPS que se han estudiado en esta tesis doctoral.**

##### 4.1.2 RIESGO DE DESARROLLAR EPS

Pacientes tratados con fármacos antipsicóticos tienen un riesgo asociado de desarrollar síntomas extrapiramidales como efecto secundario a esta medicación. El riesgo de aparición de EPS depende, en gran parte, de la competencia entre dopamina y fármaco AP por la unión al receptor de dopamina, por lo que existen tres variables importantes a tener en cuenta:

- Características farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco AP.
- Densidad de receptores dopaminérgicos y sus afinidades por los diferentes ligandos.
- Disponibilidad de dopamina.

A lo largo de los últimos años, nuestro grupo ha estudiado diferentes factores genéticos implicados tanto en el metabolismo de los APs (*Crescenti A, 2008b*), así como también en la densidad/afinidad de receptores dopaminérgicos y disponibilidad de dopamina (*Lafuente A, 2007*). En esta tesis doctoral, nos hemos centrado en el estudio polimorfismos genéticos que pueden afectar la disponibilidad de dopamina (Figura 8). Una menor concentración de este neurotransmisor a nivel del estriado sería un factor de riesgo para el desarrollo de EPS ya que el fármaco AP, al tener una menor competencia con la dopamina, produciría un mayor bloqueo de los receptores dopaminérgicos aumentando así la probabilidad de aparición de esta sintomatología secundaria. Según nuestra hipótesis, el grupo de pacientes tratados con AP que presentan EPS mostrará un exceso de los genotipos de los polimorfismos de la COMT (-278A/G), MAO-A (30bp-VNTR y 941T/G) y MAO-B (A/G intrón 13) que determinen una mayor actividad enzimática y por lo tanto una mayor degradación de la dopamina, así como un exceso de los genotipos de los polimorfismos del DAT (40bp-VNTR y -67A/T) que determinen un mayor transporte del neurotransmisor del espacio intersináptico al interior de la neurona.

## 4.2 OBJETIVOS

---

### 4.2.1 OBJETIVOS PRINCIPALES

- a) Estudiar la posible asociación de los polimorfismos de la COMT (-278A/G), MAO-A (30bp-VNTR y 941 T/G), MAO-B (A/G intrón 13) y DAT (40bp-VNTR y -67A/T), y de sus correspondientes haplotipos, con el riesgo de esquizofrenia.

- b) Estudiar la posible asociación de los polimorfismos de la COMT (-278A/G), MAO-A (30bp-VNTR y 941T/G), MAO-B (A/G intrón 13) y DAT (40bp-VNTR y -67A/T), y de sus correspondientes haplotipos, con el riesgo de aparición de EPS en pacientes tratados con APs.

#### 4.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- a) Estudio descriptivo de la prevalencia de los polimorfismos propuestos en nuestra población de referencia.
- b) Diseño y puesta a punto de un método de genotipado multiplex para analizar los polimorfismos VNTR de la MAO-A y del DAT.



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

---

Con el objetivo de estudiar la posible asociación de los distintos polimorfismos genéticos seleccionados con el riesgo de esquizofrenia y de aparición de efectos extrapiramidales en pacientes tratados con antipsicóticos, se llevó a cabo el reclutamiento de 500 pacientes con trastornos psicóticos a partir de los cuales se diseñaron los dos estudios.

Por un lado, mediante el diagnóstico de los pacientes, se diseñó un estudio caso-control de base hospitalaria para estudiar el riesgo de esquizofrenia. Para ello utilizamos un grupo de controles utilizado anteriormente en otros estudios genéticos (*Lafuente MJ, 2000*), incluyendo estudios de riesgo de esta enfermedad mental (*Lafuente A, 2008*).

Por otro lado, se diseñó un estudio de cohortes observacional prospectivo con pacientes que recibían tratamiento antipsicótico (AP) y desarrollaban (casos) o no (controles) síntomas extrapiramidales.

La población control, utilizada en el estudio de riesgo de esquizofrenia, sirvió también para llevar a cabo el estudio descriptivo de las prevalencias genotípicas de los diferentes polimorfismos.

Al tener dos polimorfismos VNTR que genotipar, nos planteamos poner a punto un método de genotipado multiplex que nos facilitara el proceso de genotipado. El método fue validado mediante otras técnicas alternativas anteriormente descritas.

## **5.2 SUJETOS**

---

### **5.2.1 RECLUTAMIENTO DE PACIENTES**

500 pacientes fueron reclutados en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Clínico de Barcelona durante el periodo comprendido entre los años 2002-2004. En la figura 9 se pueden observar los sujetos que participaron en cada uno de los estudios realizados. De todos ellos se recogieron datos sociodemográficos, de hábitos tóxicos y del tratamiento recibido.

- *Estudio de riesgo de esquizofrenia*

Utilizando el criterio DSM-IV (*APA, 2000*) se llevó a cabo el diagnóstico de los pacientes.

243 individuos que padecían esquizofrenia (n=160) y trastornos relacionados (n=83), y 291

controles de nuestra población general de referencia participaron en el estudio de riesgo de esquizofrenia.

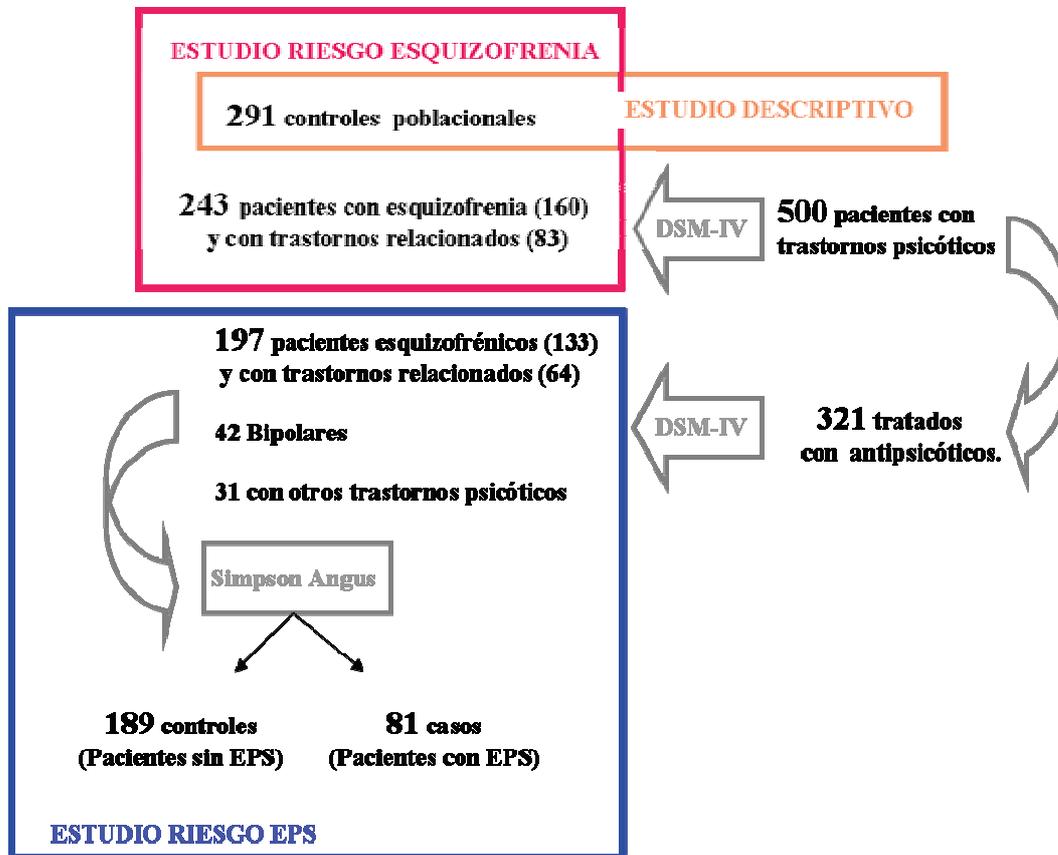


Figura 9. Esquema que muestra el reclutamiento realizado y los sujetos que participaron en cada estudio.

- *Estudio de riesgo de aparición de EPS*

Se reclutaron 321 pacientes tratados con APs. El periodo mínimo de tratamiento fue de 15 días. Mediante la escala Simpson-Angus (*Simpson GM and Angus JW, 1970*) se evaluó la aparición de EPS y permitió incluir en el estudio a 270 sujetos: 189 controles, pacientes que no presentaron EPS (Simpson-Angus  $\leq 3$ ) durante el periodo de tratamiento, y 81 casos, pacientes que presentaron EPS (Simpson-Angus  $> 3$ ) durante el mismo periodo. Mediante los criterios DSM-IV (*APA, 2000*) se realizó el diagnóstico de 197 pacientes esquizofrénicos (n=133) o con trastornos relacionados (21 pacientes con trastorno esquizoafectivo, 29 con trastorno psicótico agudo, 10 con trastorno de ideas delirantes y 4 con trastorno esquizotípico), 42 bipolares y 31 pacientes con otros diagnósticos (que incluían trastorno de la

personalidad, depresión psicótica, trastorno del comportamiento, trastorno obsesivo-compulsivo y deterioro cognitivo leve).

Con el objetivo de homogeneizar nuestra población excluimos a los pacientes que recibían tratamiento anticolinérgico, antidepresivos o estabilizadores del estado de ánimo.

- *Estudio descriptivo*

Nuestra población general de referencia consta de 291 individuos que fueron reclutados en el Servicio de Traumatología del Hospital Clínico de Barcelona durante los años 1996-1997. Estos sujetos fueron ingresados para recibir tratamiento de prótesis de cadera, fracturas pélvicas y de extremidades. De todos ellos se recogieron datos sociodemográficos, descritos con anterioridad en estudios genéticos de riesgo de cáncer colorrectal (*Lafuente MJ, 2000*), de hábitos tóxicos y otros antecedentes patológicos. Ninguno de ellos presentaba esquizofrenia ni ninguna otra enfermedad mental.

- *Método de genotipado multiplex de los polimorfismos VNTR de la MAO-A y del DAT*

Para validar la técnica de genotipado multiplex, se seleccionaron aleatoriamente 100 muestras de nuestra población general de referencia y se genotiparon utilizando métodos de genotipado anteriormente descritos (*Deckert J et al., 1999; Lafuente A, 2007*).

### 5.2.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Previa a la obtención de una muestra de sangre, se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los participantes del estudio. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico, de acuerdo con las siguientes consideraciones éticas:

*El grupo de investigación se comprometió a respetar los principios de la Declaración de Helsinki, debiendo desarrollar el estudio de acuerdo con el protocolo y con procedimientos normalizados de trabajo que aseguren el cumplimiento de la normas de Buena Práctica Clínica (GCP), tal como se describe en las Normas Tripartitas Harmonizadas de la ICH para Buena Práctica Clínica 1996. El protocolo, el formulario de consentimiento informado propuesto, fueron revisados por un Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) / Comité de Ética Independiente (CEI). Cualquier modificación del protocolo, que no fueran cambios administrativos, has sido presentada siempre como una enmienda al protocolo con la debida aprobación de dicho comité. La confidencialidad de los datos de cada paciente ha sido respetada en todo momento. Los datos originales han sido conservados en el centro de salud y sólo han tenido acceso los investigadores del estudio y la/s persona/s encargada/s de su monitorización, o en caso de inspección por parte de la Autoridades Sanitarias Españolas.*

### 5.2.3 CORRECCIONES PARA HOMOGENEIZAR EL TRATAMIENTO

En el estudio de riesgo de EPS inducidos por el tratamiento AP, el tipo de antipsicótico que recibían los pacientes no fue un criterio de exclusión. Con el objetivo de minimizar la variabilidad del tipo de fármaco utilizado se crearon dos nuevas variables: la dosis diaria equivalente de clorpromazina (CEDD) y la capacidad de inducción de EPS, que permitieron homogeneizar el tratamiento recibido por los pacientes, facilitando así la comparación de datos en el análisis estadístico.

#### a) Dosis diaria equivalente de clorpromazina (CEDD)

La CEDD para cada AP (*Woods SW, 2003*) se calculó considerando la dosis mínima diaria efectiva de cada AP. Según este criterio se ha establecido que las dosis equivalentes a 100 mg/día de clorpromazina son 2 mg/día de haloperidol, 2 mg/día de risperidona, 5 mg/día de olanzapina, 75 mg/día de quetiapina y 60 mg/día de ziprasidona. No fue posible realizar la conversión para los fármacos amisulpride (n=4) y LAIR (*Long Acting Injectable Risperidone*) (n=2) debido a que no existen tablas de conversión disponibles en la actualidad. En los casos que recibían dos APs conjuntamente (8 casos y 29 controles) se sumaron sus CEDD. Posteriormente se realizó una categorización de la CEDD en tres grupos: dosis baja  $\leq$  200 mg, media 201-399 mg y alta  $\geq$  400mg. En esta nueva variable se pudo añadir los casos de amisulpride a la categoría correspondiente (baja  $\leq$  25mg, media 25-49 mg y alta  $\geq$  50mg), así como los casos de LAIR (baja  $\leq$  400mg, media 401-599 mg y alta  $\geq$  600mg).

#### b) Capacidad de inducción de EPS

A parte del cálculo de la CEDD también se ha tenido en cuenta el hecho de que los APs no presentan la misma afinidad para los receptores D<sub>2</sub> y, por tanto, no tienen la misma capacidad de producir EPS. Por esta razón se categorizó cada AP en tres categorías en función de su capacidad alta, media o baja de inducción de EPS (*Baldesarini RJ and Tarazi FI, 2006; Gardner DM et al., 2005; Flórez J, 2008*). En los casos que recibían dos APs conjuntamente se consideró el AP de mayor potencia.

### 5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

---

De cada una de las muestras de sangre de los participantes de los diferentes estudios se realizó el aislamiento y la cuantificación de una muestra de ADN a partir de la cual se analizaron los siguientes polimorfismos genéticos:

- Gen *COMT*: polimorfismo -278A/G
- Gen *MAO-A*: polimorfismos 30bp-VNTR y 941T/G
- Gen *MAO-B*: polimorfismo A/G intrón 13
- Gen *DAT*: polimorfismos 40bp-VNTR y -67A/T

#### 5.3.1 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

El aislamiento de ADN se llevó a cabo a partir de 300µl de sangre entera mediante técnicas estándares (Genome DNA isolation Kit, Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). La concentración de ADN se midió por fluorimetría (Hoescht 33258, Hoefer Scientific, San Francisco, CA).

#### 5.3.2 METODOLOGÍA DEL GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS

##### a) Polimorfismo *COMT* -278A/G

Para la detección de este polimorfismo se utilizó la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

A partir de la pareja de oligonucleótidos 5'-TAG TAA CAG ACT GGG CAC GAA-3' y 5'-GTT CAA AGG GCA TTT ATC ATG-3' (Norton *N et al.*, 2002) y mediante la técnica de PCR se amplificó una secuencia genómica de 353 pares de bases que incluía el polimorfismo en cuestión. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 30µl que contenía 24ng de ADN, 0.2mM de cada nucleótido (GeneCraft, Lüdinghausen, Germany), 1.4µmol de cada oligonucleótido, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 unidad de Taq polimerasa (Suprathem, GeneCraft, Lüdinghausen, Germany) con su correspondiente tampón al 1%.

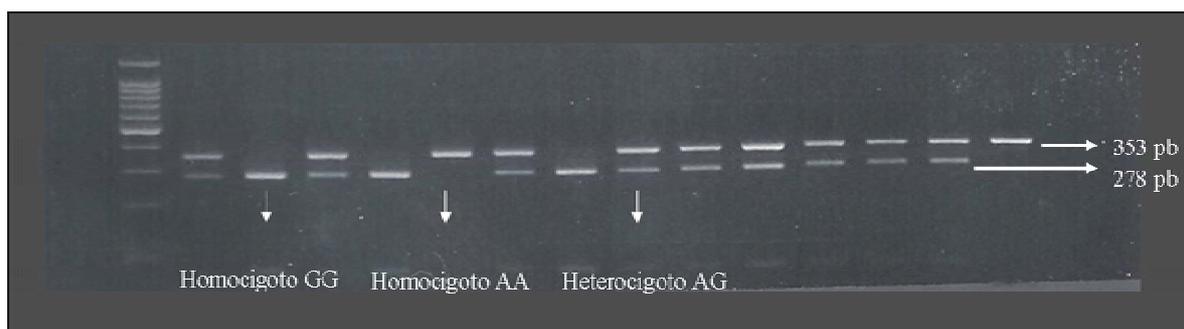
Tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, el ADN fue amplificado mediante 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, seguido de un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. Para visualizar los fragmentos

amplificados, se llevó a cabo una electroforesis de los productos de PCR a 200V durante 45 minutos en un gel de agarosa al 2% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

En un volumen final de 15µl, 7µl del producto de PCR fueron digeridos con 1 unidad del enzima de restricción *Hind*III (New England Biolabs, Ipswich, MA) y su correspondiente tampón al 1%, a 37°C *overnight*. Los productos de la digestión fueron visualizados mediante una electroforesis a 200V durante 45 minutos en un gel de agarosa al 2% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

Se identificaron tres posibles genotipos (Figura 10):

- Homocigoto AA, que muestra un fragmento de 353 pb que corresponde al producto de PCR sin digerir.
- Heterocigoto AG, que tras la digestión presenta tres fragmentos de 353, 278 y 75 pb.
- Homocigoto GG, que como resultado de la digestión muestra dos fragmentos de 278 y 75 pb.



**Figura 10. Patrón de bandas obtenido en el genotipado del polimorfismo -278A/G de la COMT (la banda de 75 pb no presenta intensidad suficiente para ser detectada).**

#### **b) Polimorfismo COMT Val158Met**

El genotipado de este polimorfismo ha formado parte experimental de otra tesis doctoral (*Crescenti A, 2007*). Únicamente se han utilizado los resultados para el análisis de los haplotipos formados por este polimorfismo y el -278A/G.

### c) Polimorfismo MAO-A 30bp-VNTR

Para la detección de este polimorfismo se utilizó la técnica de PCR. Esta técnica se utilizó para el genotipado de 100 muestras, de la población general de referencia, que sirvieron como muestras controles para la puesta a punto del método de genotipado multiplex con el que se genotiparon el resto de muestras.

La amplificación de fragmentos de diferentes tamaños permitió la identificación de los diferentes genotipos. La región que contiene el polimorfismo fue amplificada utilizando los oligonucleótidos 5'-CCC AGC GTG CTC CAG AAA C-3' y 5'- GGA CCT GGG CAG TTG TGC-3' (Deckert *J et al.*, 1999). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µl a partir de 250ng de ADN, 0.2mM de cada nucleótido (GeneCraft, Lüdinghausen, Germany), 0.2µM de cada oligonucleótido, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO y 1 unidad de Taq polimerasa (Suprathem, GeneCraft, Lüdinghausen, Germany) con su correspondiente tampón al 1%.

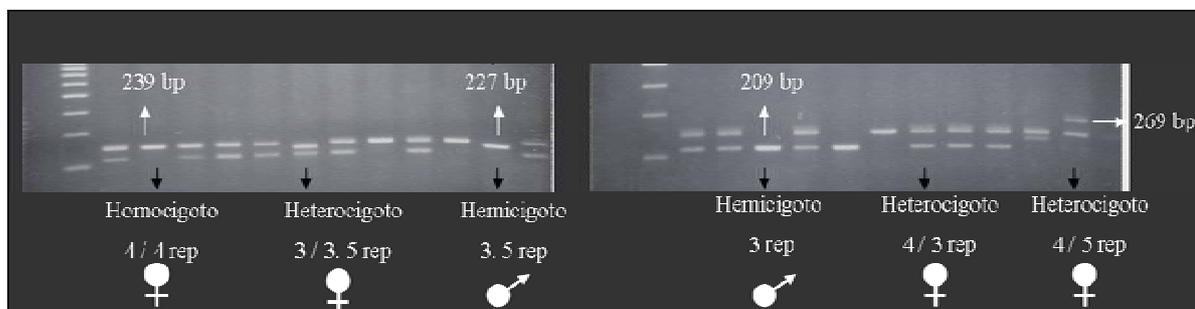
Tras una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, el ADN fue amplificado mediante 36 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 57°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis a 115V durante 2 horas y media en un gel de agarosa al 4.5% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

El tamaño de los diferentes fragmentos dependía del número de repeticiones que tenía el alelo correspondiente: 209 pb (3 repeticiones), 227 pb (3.5 repeticiones), 239 pb (4 repeticiones) y 269 pb (5 repeticiones).

Se identificaron los siguientes genotipos (Figura 11):

- Homocigoto / Hemicigoto de 3 repeticiones: presentaba un único fragmento de 209 pb.
- Homocigoto / Hemicigoto de 3.5 repeticiones: presentaba un único fragmento de 227 pb.
- Homocigoto / Hemicigoto de 4 repeticiones: presentaba un único fragmento de 239 pb.
- Homocigoto / Hemicigoto de 5 repeticiones: presentaba un único fragmento de 269 pb.
- Heterocigoto de 3 y 3.5 repeticiones (únicamente en mujeres): con dos fragmentos de 209 y 227 pb.
- Heterocigoto de 3 y 4 repeticiones (únicamente en mujeres): con dos fragmentos de 209 y 239 pb.
- Heterocigoto de 3 y 5 repeticiones (únicamente en mujeres): con dos fragmentos de 209 y 269 pb.

- Heterocigoto de 3.5 y 4 repeticiones (únicamente en mujeres): con dos fragmentos de 227 y 239 pb.
- Heterocigoto de 4 y 5 repeticiones (únicamente en mujeres): con dos fragmentos de 239 y 269 pb.



**Figura 11. Patrón de bandas obtenido en el genotipado del polimorfismo 30bp-VNTR de la MAO-A.**

#### d) Polimorfismo MAO-A 941T/G

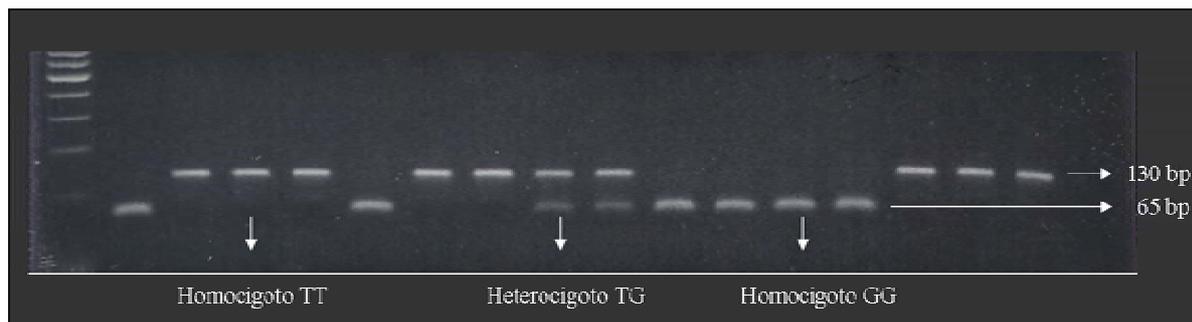
Para la detección de este polimorfismo se utilizó la técnica PCR – RFLP. A partir de la pareja de oligonucleótidos 5’-GAC CTT GAC TGC CAA GAT-3’ y 5’-CTT CTT CTT CCA GAA GGC C-3’ (Norton N et al., 2002) y mediante la técnica de PCR se amplificó una secuencia genómica de 130 pb que incluía el polimorfismo. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl que contenía 200ng de ADN, 0.2mM de cada nucleótido (GeneCraft, Lüdinghausen, Germany), 0.3µM de cada oligonucleótido, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 unidad de Taq polimerasa (Supratherm, GeneCraft, Lüdinghausen, Germany) con su correspondiente tampón al 1%.

Tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, el ADN fue amplificado mediante 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, seguido de un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. Para visualizar los fragmentos amplificados, se llevó a cabo una electroforesis de los productos de PCR a 200V durante 30 minutos en un gel de agarosa al 2% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

En un volumen final de 15µl, 7µl del producto de PCR fueron digeridos con 1 unidad del enzima de restricción *Fnu4HI* (New England Biolabs, Ipswich, MA), y su correspondiente tampón al 1%, a 37°C *overnight*. Los productos de la digestión fueron visualizados mediante una electroforesis a 200V durante 45 minutos en un gel de agarosa al 2% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

Se identificaron tres posibles genotipos (Figura 12):

- Homocigoto TT, que muestra un fragmento de 130 pb que corresponde al producto de PCR sin digerir.
- Heterocigoto TG (únicamente en mujeres), que tras la digestión presenta dos fragmentos de 130 y 65 pb.
- Homocigoto GG, que como resultado de la digestión muestra un único fragmentos de 65 pb.



**Figura 12. Patrón de bandas obtenido en el genotipado del polimorfismo 941T/G de la MAO-A.**

#### e) Polimorfismo MAO-B A/G intrón 13

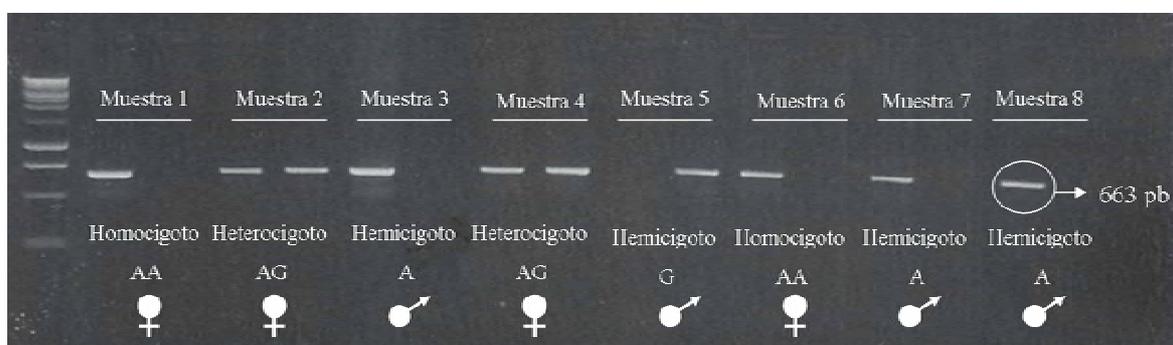
Para la detección de este polimorfismo se utilizó la técnica ASO (Allele Specific Oligonucleotide) - PCR. Para ello, se llevó a cabo dos reacciones de PCR para cada una de las muestras. En cada reacción se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada alelo, lo que permitía la amplificación de un fragmento de 663 pb únicamente cuando el alelo estaba presente en la muestra. Los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación del alelo A y G fueron 5'-CAC TGG CAA ATA GCA AAA GT-3' y 5'-CAC TGG CAA ATA GCA AAA GC-3' (Ho SL et al., 1995), respectivamente. El oligonucleótido común utilizado en ambas reacciones fue 5'-GGA TTT ACT TTG CAG GCA CC-3' (Kurth JH et al., 1993). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µl a partir de 200 ng de ADN, 0.2mM de cada nucleótido (GeneCraft, Lüdinghausen, Germany), 0.6µM de cada oligonucleótido, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO y 1 unidad de Taq polimerasa (Supratherm, GeneCraft, Lüdinghausen, Germany) con su correspondiente tampón al 1%.

Tras una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, el ADN fue amplificado mediante 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a una

electroforesis a 180V durante 45 minutos en un gel de agarosa al 1.5% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

Se identificaron tres posibles genotipos (Figura 13):

- Homocigoto AA: el fragmento de 663 pb se amplificaba en la reacción de PCR que contenía el oligonucleótido específico del alelo A.
- Heterocigoto AG (únicamente en mujeres): el fragmento de 663 pb se amplificaba en ambas reacciones de PCR.
- Homocigoto GG: el fragmento de 663 pb se amplificaba en la reacción de PCR que contenía el oligonucleótido específico del alelo G.



**Figura 13. Patrón de bandas obtenido en el genotipado del polimorfismo A/G intrón 13 de la MAO-B.**

#### f) Polimorfismo DAT 40bp-VNTR

Como parte de otra tesis doctoral (*Aparici M, 2006*), se llevó a cabo la puesta a punto de un método de genotipado mediante PCR para la detección de este polimorfismo, así como el genotipado de 84 muestras de nuestra población general de referencia. Mediante este mismo método se genotiparon 16 muestras más, teniendo así un total de 100 muestras que sirvieron como controles para la puesta a punto del método de genotipado multiplex, con el que se analizaron el resto de muestras.

El tamaño de los diferentes fragmentos dependía del número de repeticiones del fragmento de 40 pb que tenía el alelo correspondiente. En nuestra población se identificaron 5 alelos: 200 pb (3 repeticiones), 320 pb (6 repeticiones), 400 pb (8 repeticiones), 440 pb (9 repeticiones), 480 pb (10 repeticiones) y 520 pb (11 repeticiones).

Se identificaron los siguientes genotipos (Figura 16):

- Homocigoto de 9 repeticiones: presentaba un único fragmento de 440 pb.
- Homocigoto de 10 repeticiones: presentaba un único fragmento de 480 pb.
- Heterocigoto de 9 y 10 repeticiones: con dos fragmentos de 440 y 480 pb.
- Heterocigoto de 9 y 11 repeticiones: con dos fragmentos de 440 y 520 pb.
- Heterocigoto de 10 y 11 repeticiones: con dos fragmentos de 480 y 520 pb.
- Heterocigoto de 3 y 9 repeticiones: con dos fragmentos de 200 y 440 pb.
- Heterocigoto de 3 y 10 repeticiones: con dos fragmentos de 200 y 480 pb.
- Heterocigoto de 6 y 10 repeticiones: con dos fragmentos de 320 y 480 pb.
- Heterocigoto de 8 y 10 repeticiones: con dos fragmentos de 400 y 480 pb.

#### **g) Polimorfismo DAT -67A/T**

Para la detección de este polimorfismo se utilizó la técnica PCR – RFLP. A partir de la pareja de oligonucleótidos 5'- CCA GCC ATC TGC GTC C -3' y 5'- GAT GCC GAG AGC GAC G -3' (Rubie C et al., 2001) y mediante la técnica de PCR se amplificó una secuencia genómica de 264 pb que incluía el polimorfismo. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl que contenía 200ng de ADN, 0.2mM de cada nucleótido (GeneCraft, Lüdinghausen, Germany), 0.4µM de cada oligonucleótido, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO y 1 unidad de Taq polimerasa (Suprathem, GeneCraft, Lüdinghausen, Germany) con su correspondiente tampón al 1%.

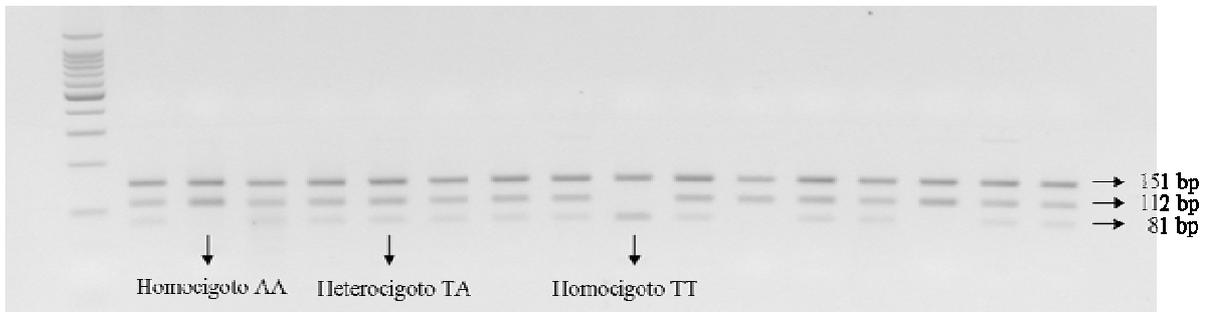
Tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, el ADN fue amplificado mediante 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C y 30 segundos a 72°C, seguido de un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. Para visualizar los fragmentos amplificados, se llevó a cabo una electroforesis de los productos de PCR a 200V durante 30 minutos en un gel de agarosa al 2.5% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

En un volumen final de 20µl, 10µl del producto de PCR fueron digeridos con 2 unidades del enzima de restricción *AspI* (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany), y su correspondiente tampón al 1%, a 37°C overnight. Los productos de la digestión fueron visualizados mediante una electroforesis a 200V durante 45 minutos en un gel de agarosa al 2.5% que contenía 0.65µg/ml de bromuro de etidio.

Se identificaron tres posibles genotipos (Figura 14):

- Homocigoto TT, que después de la digestión muestra tres fragmentos de 151, 81 y 31 pb.

- Heterocigoto TA, que tras la digestión presenta cuatro fragmentos de 151, 112, 81 y 31 pb.
- Homocigoto AA, que como resultado de la digestión muestra dos fragmentos de 115 y 112 pb.



**Figura 14. Patrón de bandas obtenido en el genotipado del polimorfismo -67A/T del DAT.**

#### **h) Genotipado conjunto de los polimorfismos MAO-A 30bp-VNTR y DAT 40bp-VNTR**

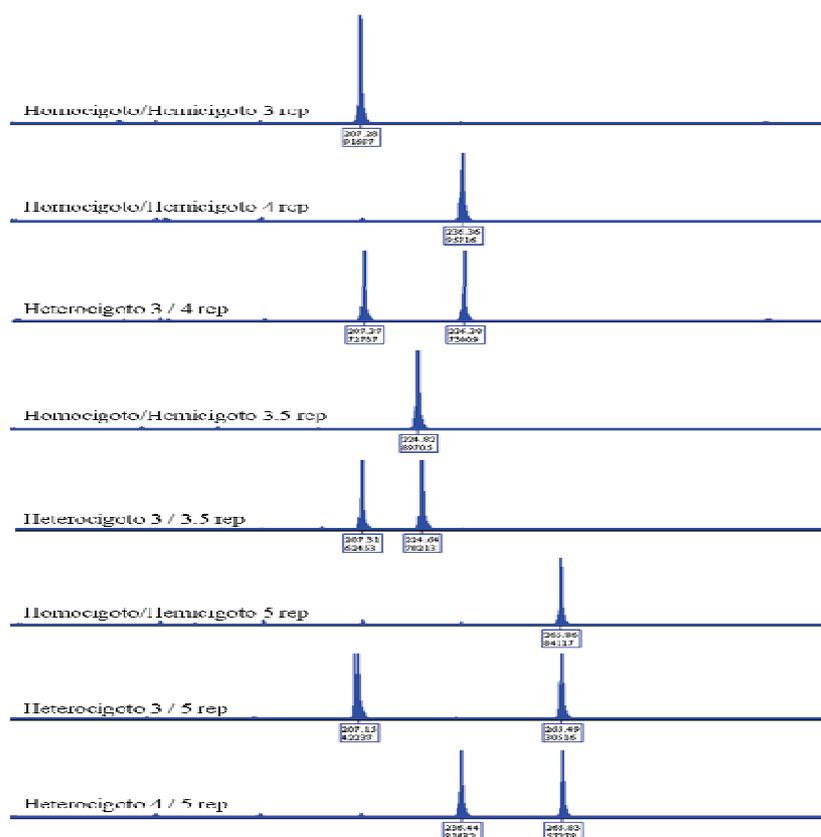
Dado que los procesos de análisis de estos dos polimorfismos implicaban un gasto importante de tiempo y que en ocasiones resultaba difícil discernir unos alelos de otros, nos planteamos diseñar un método de PCR multiplex con electroforesis capilar que permitiera optimizar el genotipado de las muestras. Mediante la PCR multiplex, en un mismo tubo de reacción, se pudo amplificar los diferentes alelos de cada uno de los polimorfismos. Posteriormente, una electroforesis capilar permitió identificar los diferentes genotipos de una manera automatizada, rápida y segura.

Las 100 muestras genotipadas por métodos validados, anteriormente comentados, nos sirvieron de muestras control para validar este nuevo método de genotipado. La amplificación de fragmentos de diferentes tamaños permitió la identificación de los diferentes genotipos. Para la mejor identificación de los fragmentos amplificados, se llevó a cabo la marcación de uno de los oligonucleótidos de cada pareja con dos fluoróforos diferentes: 6-FAM (azul) y VIC (verde). Los oligonucleótidos utilizados fueron: 6-FAM-5'-CCC AGC GTG CTC CAG AAA C-3', 5'- GGA CCT GGG CAG TTG TGC-3' (Deckert J et al., 1999), VIC-5'-TGT GGT GTA GGG AAC GGC CTG AG-3' y 5'-CTT CCT GGA GGT CAC GGC TCA AGG-3' (Vandenbergh DJ et al., 1992). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µl a partir de 200ng de ADN, 0.2mM de cada nucleótido (GeneCraft, Lüdinghausen, Germany), 0.15µM de la pareja de oligonucleótidos que amplifican los fragmentos marcados con 6-FAM, 0.3µM de la pareja de oligonucleótidos que amplifican los fragmentos marcados

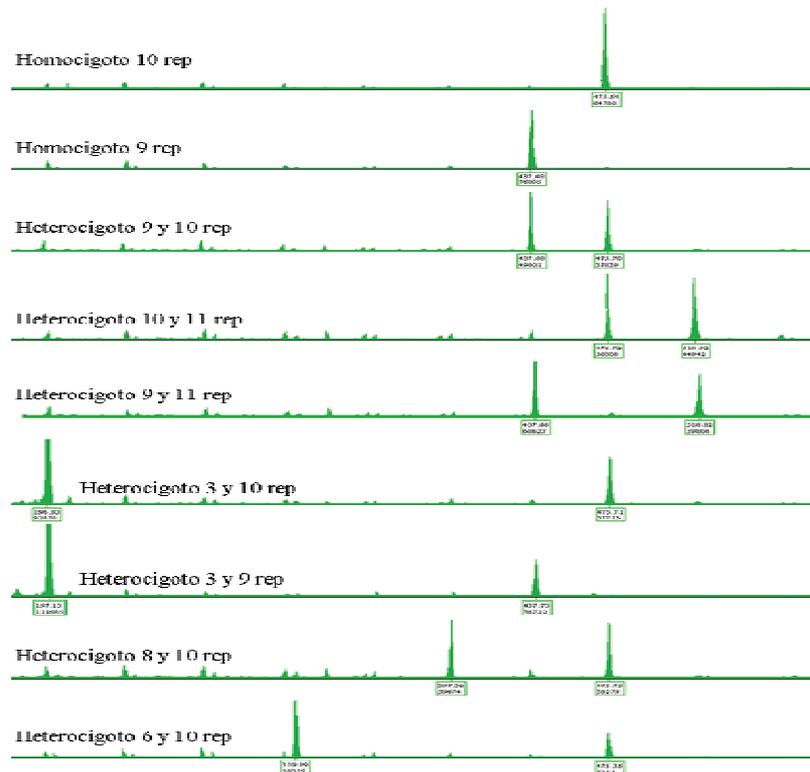
con VIC, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO y 1.5 unidades de Taq polimerasa (Supratherm, GeneCraft, Lüdinghausen, Germany) con su correspondiente tampón al 1%.

Tras una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, el ADN fue amplificado mediante 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 61°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR, diluidos diez veces con formamida desionizada, se sometieron a electroforesis capilar en el analizador genético de ADN ABI Prism® 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando el polímero POP-7™ en capilares de 36 cm. Los datos se recogieron con el Data Collection Software v3.0 con el módulo Fragment Analysis 36POP7 (Applied Biosystems) y se analizaron con el software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

Los diferentes alelos se identificaron automáticamente en función del color y del tamaño. Picos azules de tamaños comprendidos entre 209 y 269 pb correspondían al polimorfismo MAO-A 30bp-VNTR (Figura 15) y picos verdes de tamaños comprendidos entre 200 y 600 pb correspondían al polimorfismo DAT 40bp-VNTR (Figura 16).



**Figura 15.** Patrón de picos del polimorfismo 30bp-VNTR de la MAO-A obtenidos en la electroforesis capilar de la PCR multiplex.



**Figura 16. Patrón de picos del polimorfismo 40bp-VNTR del DAT obtenidos en la electroforesis capilar de la PCR multiplex.**

### 5.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se diseñó una base de datos que contempló todos los aspectos sociodemográficos, clínicos y farmacológicos de los pacientes. A partir de esta base de datos se llevaron a cabo los análisis estadísticos utilizando el programa de análisis estadístico SPSS (versión 14.05).

Los tamaños muestrales se establecieron en base a las frecuencias genotípicas de controles caucásicos de estudios previos. Se asumió un 5% de nivel de significancia, un 80% de poder estadístico y un riesgo de EPS asociado al alelo estudiado de 2. Para las variables continuas se calcularon las medias y las desviaciones estándar. Un análisis univariante (chi-cuadrado para las variables categóricas y t-student para las variables continuas) fue utilizado para identificar variables asociadas con el riesgo de padecer esquizofrenia y factores clínicos relacionados con la aparición de EPS. Los análisis multivariantes (regresiones logísticas) se utilizaron para estimar la contribución independiente de cada variable identificada a través de los análisis univariantes. Para los valores ajustados de odds ratio (OR) se calcularon los intervalos de confianza asociados (IC del 95%) y los errores estándar. Para la corrección de

las múltiples comparaciones realizadas se utilizó la corrección de Bonferroni tanto en los resultados del análisis de alelos como en el de genotipos.

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg y de las relaciones de desequilibrio de ligamiento (LD) entre polimorfismos se realizó con el paquete “*genetics*” del software estadístico R (versión 2.4.0). Se utilizó el algoritmo EM (expectation-maximization) para inferir los haplotipos, y los tests de homogeneidad de probabilidades para comparar su distribución mediante el software UNPHASED 3.07 (*Dudbridge F, 2006*). En el análisis de los haplotipos utilizamos ciclos de 10000 permutaciones para la corrección de las múltiples comparaciones usando el programa Haploview 3.2.



## **6. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES**



## **6.1 ESTUDIO N° 1**

---

**Polimorfismos genéticos en la Catecol-O-MetilTransferasa y riesgo de esquizofrenia en población española.**

**Sergi Mas<sup>a</sup>, Patricia Gassó<sup>a</sup>, Anna Crescenti<sup>a</sup>, Eduard Parellada<sup>b</sup>, Miquel Bernardo<sup>b</sup>,  
Amalia Lafuente<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. IDIBAPS. Barcelona.

<sup>b</sup>Servicio de Psiquiatría, Hospital Clínico Universitario de Barcelona. Barcelona. España.

*Med Clin (Barc)*. 2008; 130(00):000-0

(Localizador Web: Artículo 251.273)

Artículo aceptado para su publicación el 17-6-2008



## ORIGINALES

Original 34744 (eu)

## Polimorfismos genéticos en la *catecol-O-metiltransferasa* y riesgo de esquizofrenia en población española

Sergi Mas<sup>a</sup>, Patricia Gassó<sup>a</sup>, Anna Crescenti<sup>a</sup>, Eduard Parellada<sup>b</sup>, Miquel Bernardo<sup>b</sup> y Amalia Lafuente<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. IDIBAPS. Barcelona.

<sup>b</sup>Servicio de Psiquiatría. Hospital Clínico Universitario de Barcelona. Barcelona. España.



**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** Uno de los genes susceptibles de ser considerado candidato para los estudios de asociación con esquizofrenia es, a priori, el de la *catecol-O-metiltransferasa* (COMT). La variante genética más estudiada (G158A o rs4680) es funcional. Además, se ha propuesto que las variantes genéticas que afectan al P2 podrían producir cambios en los valores de COMT en el cerebro. Recientemente, se ha relacionado una variante en este promotor (-278A/G o rs737866) con los trastornos psicóticos. El objetivo de este trabajo es estudiar si polimorfismos genéticos del gen COMT (G158A) y su promotor (-278A/G) influyen en la susceptibilidad a la esquizofrenia en la población española.

**PACIENTES Y MÉTODO:** Participaron en este estudio de asociación 243 pacientes diagnosticados de esquizofrenia y trastornos relacionados según los criterios del DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, cuarta edición) y 291 sujetos de un grupo control de base hospitalaria.

**RESULTADOS:** No se encontraron diferencias significativas entre casos y controles para las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados, ni tampoco cuando se analizaron los genotipos del polimorfismo COMT G158A. Sin embargo, los individuos heterocigotos para el polimorfismo COMT -278A/G presentaban una reducción del 60% en el riesgo de presentar esquizofrenia (*odds ratio* = 0,4, intervalo de confianza del 95%, 0,2-0,8, *p* = 0,009).

**CONCLUSIONES:** Los datos de este estudio exploratorio están de acuerdo con resultados recientes en este campo, que indican una menor influencia del polimorfismo clásico COMT G158A en el riesgo de esquizofrenia y una mayor importancia de los polimorfismos que afectan al promotor P2 del gen, como -278A/G.

**Palabras clave:** Catecol-O-metiltransferasa. Esquizofrenia. Farmacogenética. Polimorfismo genético. España.

Effect of polymorphisms of the *catechol-O-methyltransferase* on schizophrenia risk in a Spanish population

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** *Catechol-O-methyl transferase* (COMT) is one of the most plausible susceptibility genes of schizophrenia risk. The main genetic variant (G158A or rs4680) studied is functional. It has been shown that G-A transition at COMT codon 158 makes COMT more thermolabile and less active at physiological temperature. Genetic variants in the P2 promoter have been suggested to cause alterations in brain COMT protein levels. A variant in the P2 promoter (-278A/G or rs737866) has recently been associated with psychotic disorders. We studied whether polymorphisms in COMT (G158A, -278A/G) are risk factors for schizophrenia in a Spanish population.

**PATIENTS AND METHOD:** 243 subjects diagnosed of schizophrenia and related disorders following the DSM-IV criteria and 291 hospital-based controls participated in an association study.

**RESULTS:** The heterozygotes for the COMT -278A/G polymorphism showed a 60% reduction in the schizophrenia risk (*p* = 0.009). No significant differences were observed between the other COMT genotypes or haplotypes in cases and controls.

**CONCLUSIONS:** Our results suggest that the COMT -278A/G polymorphism may have a role in schizophrenia. The results are in agreement with recent findings in this field that indicate a minor influence of COMT G158A on schizophrenia risk and a greater importance of polymorphisms in the P2 promoter regions of COMT, such as -278A/G.

**Key words:** Catechol-O-methyl transferase. Schizophrenia. Pharmacogenetics. Genetic polymorphisms. Spain.

Este trabajo ha podido realizarse gracias a la financiación recibida del Ministerio de Salud, Instituto de Salud Carlos III (RETICS, Red de Enfermedades Mentales REM-TAP NetworkRD06/0011/06-05; CIBER CB07/09/005; FIS P1060182U-2006) y del Departamento de Innovación, Universidad y Empresa de la Generalitat de Catalunya (DURSI, GRC2005SGR00039).

Correspondencia: Dra. A. Lafuente.

Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. IDIBAPS.

Casanova, 143. 08036 Barcelona, España.

Correo electrónico: amalialafuente@ub.edu

Recibido el 8-4-2008; aceptado para su publicación el 17-6-2008.

El gen de la *catecol-O-metiltransferasa* (COMT) es uno de los genes susceptibles de ser considerado candidato para los estudios de riesgo de esquizofrenia, principalmente por su papel clave en el metabolismo de las monoaminas, especialmente en las neuronas dopaminérgicas del lóbulo prefrontal. Según la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia, la sintomatología de este trastorno se debe a la hiperactividad de las vías dopaminérgicas centrales<sup>1</sup>. Deficiencias en el metabolismo de este neurotransmisor, por ejemplo, causadas por variantes genéticas en COMT, podrían dar lugar a la acumulación de dopamina. En apoyo a esta hipótesis, estudios de ligamiento genético han identificado la región cromosómica 22q11, donde se localiza COMT, como uno de los loci con mayor probabilidad de contener genes implicados en la susceptibilidad a la esquizofrenia<sup>2</sup>. La variante genética más estudiada (G158A o rs4680) es funcional. Se ha descrito que la transición de guanina a alanina en el codón 158 del gen COMT produce una sustitución de valina por metionina en la proteína. Esta sustitución hace COMT más termolábil y, por tanto, menos activa a temperatura fisiológica<sup>3</sup>. Esta funcionalidad ha llevado a una intensa investigación del papel de este polimorfismo genético en el riesgo de esquizofrenia. De acuerdo con la teoría hiperdopaminérgica de la esquizofrenia, se esperaría encontrar mayor frecuencia del alelo 158A (alelo de baja actividad) en los pacientes con este trastorno, ya que tendrían mayores dificultades para metabolizar la dopamina. Sin embargo, la mayoría de los estudios han generado resultados contradictorios<sup>4-7</sup>.

El gen de la COMT se transcribe a partir de dos promotores (P1 y P2), lo que resulta en una forma soluble citoplasmática (S-COMT, transcrita desde P1) y una forma anclada a la membrana celular (MB-COMT, transcrita desde P2)<sup>8</sup>. Aunque ambas formas se expresan en una variedad de tejidos, MB-COMT parece ser la forma predominante en el cerebro<sup>9</sup>. Por esta razón se ha propuesto que las va-

riantes genéticas que afectan al P2 podrían producir cambios en los valores de COMT en el cerebro, mediante la estimulación o la inhibición de la transcripción<sup>10</sup>. Recientemente, se ha relacionado una variante en este promotor (-278A/G o rs737866) con los trastornos psicóticos<sup>6</sup>.

El objetivo de este trabajo es determinar la influencia de los polimorfismos genéticos del gen *COMT* (G158A) y su promotor (-278A/G) en la susceptibilidad a la esquizofrenia en la población española.

### Pacientes y método

Los cálculos para determinar el tamaño de la muestra se basaron en las frecuencias genotípicas publicadas en estudios previos con población caucásica. Los cálculos asumen un nivel de significación del 5%, un poder estadístico del 80% y detectar valores de *odds ratio*  $\geq 2$ .

#### Pacientes

Para participar en este estudio se reclutó a 243 pacientes diagnosticados de esquizofrenia y trastornos relacionados según los criterios del DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, cuarta edición)<sup>11</sup>, durante el período 2002-2004 en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Clínico de Barcelona, España.

Se utilizó un grupo control de base hospitalaria ( $n = 291$ ) que se reclutó consecutivamente en el Servicio de Traumatología del Hospital Clínico de Barcelona durante el período 1996-1997. Esta población ha sido utilizada en otros estudios genéticos<sup>12</sup>, incluso en estudios de riesgo de esquizofrenia<sup>13</sup>. La mayoría de estos controles fueron ingresados en el servicio de traumatología por prótesis de rodilla o cadera, o bien por fractura de pelvis, o lesiones en las articulaciones superiores o inferiores. Cada paciente contestó un cuestionario, con un entrevistador previamente entrenado, que recogía información demográfica, ocupacional, tabaquismo e historia médica. La información médica obtenida se contrastó con la historia clínica. Se excluyó del estudio a los controles si presentaban historial de enfermedad maligna o enfermedad psiquiátrica. Un criterio de exclusión fueron los antecedentes de enfermedad maligna o enfermedad psiquiátrica.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes del estudio, juntamente con una muestra de sangre. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínic.

#### Análisis de genotipos

EL ADN se aisló a partir de 300  $\mu$ l de sangre entera utilizando técnicas estándar.

- Polimorfismo G158A: mediante técnicas de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) previamente descritas, un fragmento de 237 pb que contenía el polimorfismo se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligonucleótidos; 5'-TACTGTGGC-TACTCAGCTGTGC y 5'-GTGAACGTGGTGTGAACACC<sup>14</sup>. Los distintos alelos se identificaron por digestión enzimática con 10 U de la enzima de restricción NlaIII (New England Biolabs, Ipswich, MA).

- Polimorfismo -278A/G: mediante técnicas de PCR-RFLP previamente descritas<sup>15</sup>. La PCR se realizó con los oligonucleótidos 5'-TAGTAACAGACTGGGCACGAA y 5'-GTTCAAAGGGCATTATCATG, y la digestión enzimática con 1 U de la enzima de restricción HindIII (New England Biolabs).

#### Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el *software* del paquete estadístico SPSS 14.05 (SPSS Inc., Chicago, ILL, Estados Unidos). Se calcularon las medias y desviaciones estándar para las variables continuas. Mediante

análisis univariable (prueba de la  $\chi^2$  para variables categóricas y prueba de la *t* de Student para variables continuas) se identificaron los factores sociodemográficos relacionados con la esquizofrenia. El análisis multivariable (regresión logística múltiple) se usó para estimar la contribución independiente de cada uno de los factores identificados en el análisis univariable. Para los valores ajustados de *odds ratio* (OR) se calcularon los intervalos de confianza asociados (IC del 95%). Para la corrección por múltiples comparaciones se utilizó la corrección de Bonferroni en los resultados del análisis de alelos y genotipos. Esta corrección se utilizó considerando que se analizaban dos polimorfismos en un único locus. Considerando esta corrección, los valores  $p < 0,025$  se consideraron estadísticamente significativos. El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg y de las relaciones de desequilibrio de ligamiento (DL) entre polimorfismos se realizó con el paquete *Genetics* del *software* estadístico R (versión 2.4.0). Se utilizó el algoritmo EM para inferir los haplotipos y los tests de homogeneidad de probabilidades para comparar su distribución mediante el *software* UNPHASED 3.0716. La significación obtenida para el mejor resultado de cada análisis con haplotipos se corrigió por múltiples comparaciones mediante ciclos de 10.000 permutaciones.

### Resultados

En la tabla 1 se muestran las características de los controles (grupo de base hospitalaria) y los casos (pacientes con esquizofrenia o trastornos relacionados), así como el diagnóstico de éstos. Debido a las diferencias de edad entre casos y controles, fue necesario asegurarnos de que los genotipos estudiados no tenían relación con la edad de los pacientes. Como puede verse en la tabla 2, no hay diferencias significativas en la distribución de los alelos en los distintos subgrupos por edad del grupo control. Sin embargo, igualmente se decidió ajustar el análisis estadístico por esta variable. Además, considerando las diferencias en la distribución de sexos y hábito tabáquico entre casos y controles, también se decidió ajustar el análisis por ambas variables. EL 33,2% de los pacientes del grupo de casos tenía historial de abuso de drogas, la más común era el cannabis (18,8%), seguido del alcohol (4,8%) y la cocaína (3,2%). No se dispuso de información sobre el consumo de sustancias de abuso en el grupo control, por lo que no se pudo estudiar la influencia de los hábitos tóxicos (diferentes del tabaco) en el riesgo de desarrollar esquizofrenia.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos genéticos estudiados se presentan en la tabla 3. Los polimorfismos estudiados estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambas poblaciones, casos y controles (*COMT* G158A: casos,  $\chi^2 = 0,82$ ,  $p > 0,05$ ; controles,  $\chi^2 = 0,03$ ,  $p > 0,05$ ; *COMT* -278A/G: casos  $\chi^2 = 2,96$ ,  $p > 0,05$ ; controles,  $\chi^2 = 0,5$ ,  $p > 0,05$ ). No se observó relación de DL entre los marcadores (casos,  $D' = 0,39$ ; controles,  $D' = 0,28$ ).

Para explorar la posible relación entre los alelos estudiados y la susceptibilidad a la esquizofrenia se utilizó el análisis multiva-

riable ajustado por las variables comentadas anteriormente (edad, sexo y tabaquismo) (tabla 3) y se calculó el riesgo relacionado con los distintos genotipos y alelos. No se encontraron diferencias significativas entre casos y controles para las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados, ni tampoco cuando se analizaron los genotipos del polimorfismo COMT G158A. Sin embargo, los individuos heterocigotos para el polimorfismo COMT -278A/G presentaban una reducción del 60% en el riesgo de presentar esquizofrenia (OR = 0,4, IC del 95%, 0,2-0,8;  $p = 0,009$ ).

A partir de los datos genotípicos de nuestra población pudimos inferir cuatro haplotipos (tabla 4). No se observaron diferencias significativas en la distribución de estos haplotipos entre casos y controles.

### Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio están de acuerdo con resultados recientes en este campo, que indican una menor influencia del polimorfismo clásico COMT G158A en el riesgo de esquizofrenia y una mayor importancia de los polimorfismos que afectan al promotor P2 del gen, como -278A/G.

A pesar de que numerosos estudios avalan la funcionalidad del polimorfismo COMT G158A<sup>17-19</sup>, el papel de este polimorfismo en la esquizofrenia es controvertido, en parte debido a la falta de replicación de los resultados positivos y a los resultados negativos obtenidos en los metaanálisis<sup>6,10,20,21</sup>. De hecho, los valores de *odds ratio* obtenidos en los estudios con asociaciones positivas son bajos, lo que vendría a demostrar que el polimorfismo COMT G158A es insuficiente para explicar toda la variabilidad genética de COMT. En nuestro estudio, al igual que en otros estudios con población española<sup>22</sup>, el polimorfismo COMT G158A parece no tener ningún efecto en el riesgo de esquizofrenia. Probablemente se necesitan tamaños de muestra mayores para detectar la pequeña contribución de este polimorfismo en el riesgo general. Sin embargo, este polimorfismo funcional parece ser relevante para modular la respuesta farmacológica de los antipsicóticos; recientemente hemos relacionado el alelo 158A con una menor predisposición a desarrollar efectos adversos como el extrapirramidalismo<sup>23</sup>.

En cuanto al polimorfismo -278 A/G, recientemente, un haplotipo de tres marcadores se ha asociado con el riesgo de esquizofrenia y trastorno bipolar en una población de judíos ashkenazi<sup>21</sup>. Este haplotipo contiene el polimorfismo rs737865, muy próximo al promotor P2 y en completo DL con -278A/G ( $D' = 1$ ; LOD = 30,34;  $r^2 = 1$ ; International Hap-

map Project data: <http://www.hapmap.org/index.html>). Estudios funcionales de este haplotipo han demostrado que reduce la expresión de COMT en el cerebro humano<sup>24,25</sup>. Sin embargo, cuando se ha estudiado en otras poblaciones, se ha visto que hay una gran variabilidad en su distribución y en las relaciones de DL entre los tres marcadores del haplotipo. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la región promotora P2 en la expresión de COMT, así como el interés de identificar bloques haplotípicos en cada población. En nuestra población, no hemos hallado asociación entre ninguno de los dos alelos y el riesgo de sufrir esquizofrenia. Sin embargo, los individuos heterocigóticos reducen el riesgo de esquizofrenia en, aproximadamente, un 60%. Esta situación de ventaja del heterocigoto puede deberse a las diferencias de DL de ambos alelos con distintos polimorfismos funcionales que podrían llevar a alteraciones en la expresión de COMT más severas en heterocigosis que en homocigosis.

Cabe comentar la estructura del grupo control, un grupo de base hospitalaria reclutado en el servicio de traumatología. Dicho grupo presenta una mayor edad promedio y mayor número de mujeres que el grupo de casos. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la mayor frecuencia de afecciones traumáticas en personas con edad avanzada y, especialmente, mujeres posmenopáusicas. Hay que señalar que nosotros no encontramos ninguna evidencia que indique que este grupo control está sesgado respecto al gen *COMT*. Para empezar, las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados en el grupo control reproducen las observadas en distintas poblaciones sanas europeas<sup>3</sup> y, especialmente, en población española<sup>21</sup>. También es importante destacar que no se observó ninguna relación entre los genotipos estudiados y la edad o el sexo en el grupo control. Finalmente, tampoco hay ninguna evidencia de que las enfermedades de los pacientes de traumatología estén relacionadas con la variabilidad genética de COMT o con la susceptibilidad a la esquizofrenia. Por lo tanto, concluimos que nuestro grupo control no está sesgado en términos de distribución de los genotipos *COMT*. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la esquizofrenia es una enfermedad de aparición temprana; en este contexto, los controles de mayor edad son individuos con mayor resistencia para esta enfermedad, de manera que pueden considerarse como controles hipernormales. El uso de controles hipernormales es una estrategia de diseño de estudios de casos y controles que permite aumentar la eficiencia de estudios ge-

néticos de asociación<sup>26</sup>.

Los datos de este estudio exploratorio parecen indicar que el polimorfismo -278A/G, en la región promotora P2, tiene un papel más relevante que el polimorfismo COMT G158A en relación con el riesgo de esquizofrenia. Considerando la elevada variabilidad descrita entre los distintos grupos étnicos en cuanto a las relaciones de DL y la configuración de bloques haplotípicos en *COMT*, sería necesaria la identificación de los polimorfismos y los haplotipos causales de la asociación entre *COMT* y esquizofrenia en cada población.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Esther Planas su ayuda en el reclutamiento de los pacientes.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kapur S. Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2003;160:1081-90.
- Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2002;7:405-11.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, et al. Kinetics of human soluble and membrane bound catechol-O-methyltransferase; a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*. 1995;34:4202-10.
- Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT. Association between a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: Meta-analysis of case-control and family based studies. *Am J Psychiatry*. 2003;160:469-76.
- Fan JB, Zhang CS, Gu NF, Li XW, Sun WW, Wang HY, et al. Catechol-O-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia; a large scale association study plus meta analysis. *Biol Psychiatry*. 2005;57:139-44.
- Funke B, Malhotra AK, Finn CT, Plocik AM, Lake SL, Lencz T, et al. COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: a case control study. *Beh Brain Funct*. 2005;1:19-25.
- Munafò MR, Bowes L, Clark TG, Flint J. Lack of association of the COMT (Val158/108 Met) gene and schizophrenia: a meta-analysis of case-control studies. *Mol Psychiatry*. 2005;10:765-70.
- Tenhunen J, Salminen M, Lunnstrom K, Kiviluoto T, Sacolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol-o-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem*. 1994;223:1049-59.
- Reenila I, Mannisto PT. Catecholamine metabolism in the brain by membrane-bound soluble catechol-O-methyltransferase (COMT) estimated by enzyme kinetic values. *Med Hypotheses*. 2001;57:628-32.
- Palmatier MA, Pakstis AJ, Speed W, Paschou P, Goldman D, Odunsi A, et al. COMT haplotypes suggest P2 promoter region relevance for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2004;9:859-70.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Method of Mental Disorders. 4.<sup>a</sup> ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1994.
- Lafuente MJ, Casterad X, Trias M, Ascaso C, Molina R, Ballesta A, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of k-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis*. 2000;21:1813-9.
- Lafuente A, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Aparici M, Gasso P, et al. -141 C Ins/Del polymorphism of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia in a Spanish population. *Psychiatric Genet*. 2008 [en prensa].
- Mas S, Laso N, Lafuente MJ, Lafuente A, Molina R, Ballesta A, et al. Cancer, genes and catechol estrogen metabolites. *Int J Clin Oncol*. 2003;8:65-66.
- Norton N, Kirov G, Zammit S, Jones G, Jones S, Owen R, et al. Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. *Am J Med Genet*. 2002;114:491-6.
- Dudbridge F. UNPHASED user guide. Technical report 2006/5. Cambridge: MRC Biostatistics Unit; 2006.
- Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-o-methyltransferase(COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet*. 2004;75:807-21.
- Shield AJ, Thomae BA, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human catechol-o-methyltransferase genetic variations: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Mol Psychiatry*. 2004;9:151-60.
- Handoko HY, Nyholt DR, Hayward NK, Nertney DA, Hannah DE, Windus LC, et al. Separate and interacting effects within catechol-o-methyltransferase (COMT) are associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005;10:588-97.
- DeMille MMC, Kidd JR, Ruggeri V, Palmatier MA, Goldman D, Odunsi A, et al. Population variation in linkage disequilibrium across the COMT gene considering promoter region and coding region variation. *Hum Genet*. 2002;111:521-37.
- Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisanté-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2002;71:1296-302.
- Diez-Martin J, Hoenicka J, Martínez I, Aragões M, Rodríguez-Jiménez R, Jiménez-Arriero A, et al. Polimorfismo Val<sup>158</sup>Met de COMT y esquizofrenia: estudio de asociación en una muestra de pacientes españoles. *Med Clin (Barc)*. 2007;128:41-4.
- Lafuente A, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Aparici M, Gasso P, et al. Polymorphism of dopamine D2 receptor (TaqIA, TaqIB, and -141C Ins/Del) and dopamine degradation enzyme (COMT G158A, -278A/G) genes and extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2007 (doi:10.1016/j.psyres.2007.08.002).
- Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, Williams HJ, Norton N, Owen MJ, et al. A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. *Am J Hum Genet*. 2003;73:152-61.
- Dempster EL, Mill J, Craig IW, Collier DA. The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue: diagnosis, genotype, methylation and expression. *BMC Medical Genetics*. 2006;7:10.
- Morton NE, Collins A. Tests and estimates of allelic association in complex inheritance. *PNAS*. 1998;95:11389-93.

TABLA 1

**Características de los controles (grupo control de base hospitalaria) y los casos (pacientes con esquizofrenia o trastornos relacionados), y su diagnóstico**

	Grupo control de base hospitalaria (n = 291)	Pacientes con esquizofrenia o trastornos relacionados (n = 243)
Edad, media (DE), años	61,7 (11)	34,05 (13) <sup>a</sup>
Varones	112/291 (38,4%)	132/243 (54,3%) <sup>a</sup>
Fumadores <sup>b</sup>	63/291 (21,6%)	90/181 (49,72%) <sup>a</sup>
Diagnósticos		
Esquizofrenia		160 (65,8%)
Trastorno esquizoafectivo		30 (12,4%)
Trastorno psicótico agudo		39 (16,1%)
Trastorno de ideas delirantes		11 (4,5%)
Trastorno esquizotípico		3 (1,2%)

<sup>a</sup>p < 0,001 (frente a controles).

<sup>b</sup>No se incluye a ex fumadores. No se dispuso de información sobre el tabaquismo de algunos pacientes (62 casos perdidos).

TABLA 2

**Distribución de las frecuencias alélicas en los diferentes subgrupos por edad del grupo control**

Alelo	31-50 años, n/N (%) <sup>a</sup>	51-70 años, n/N (%) <sup>a</sup>	71-100 años, n/N (%) <sup>a</sup>
COMT G158A	54/124 (44)	138/312 (44)	73/146 (49)
COMT -278A/G	50/124 (40)	117/312 (37)	58/146 (39)

<sup>a</sup>Prueba de la  $\chi^2$ , p > 0,05.

TABLA 3

**Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en casos y controles, y análisis multivariable del riesgo de esquizofrenia asociado al alelo y los genotipos**

	Controles n/N (%)	Casos n/N (%)	OR (IC del 95%)	p <sup>a</sup>
COMT G158A				
Homoz AA <sup>b</sup>	60/291 (20,6%)	47/243 (19,3%)	1,1 (0,6-2,2)	0,7
Heteroz GA <sup>b</sup>	146/291 (50,2%)	125/243 (51,4%)	1,2 (0,5-2,6)	0,7
Alelo 158A <sup>c</sup>	45,7%	45,0%	1,1 (0,7-1,6)	0,7
COMT -278A/G				
Homoz GG <sup>d</sup>	41/291 (14,1%)	48/243 (19,7%)	1,3 (0,6-2,8)	0,3
Heteroz AG <sup>d</sup>	144/291 (49,5%)	94/243 (38,7%)	0,4 (0,2-0,8)	0,009
Alelo -278G <sup>e</sup>	38,8%	39,1%	0,9 (0,6-1,4)	0,9

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*.

<sup>a</sup>Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores p < 0,025 se consideraron estadísticamente significativos.

<sup>b</sup>Regresión logística multivariable del genotipo ajustada por edad, sexo y tabaquismo (grupo de referencia homocigoto GG).

<sup>c</sup>Regresión logística multivariable del alelo A como variable continua (0 homocigoto GG; 1 heterocigoto AG; 2 homocigotos AA) ajustada por edad, sexo y tabaquismo.

<sup>d</sup>Regresión logística multivariable del genotipo ajustada por edad, sexo y tabaquismo (grupo de referencia homocigoto AA).

<sup>e</sup>Regresión logística multivariable del alelo G como variable continua (0 homocigoto AA; 1 heterocigoto AG; 2 homocigotos GG) ajustada por edad, sexo y tabaquismo.

TABLA 4

**Distribución y frecuencia de los haplotipos COMT inferidos en el estudio**

Alelos COMT		Frecuencia haplotípica		OR (IC del 95%)	p <sup>a</sup>
A-278G	G158A	Controles	Casos		
A	G	0,39	0,43	1 (1-1)	0,7
A	A	0,22	0,18	0,9 (0,2-3,3)	0,6
G	G	0,15	0,12	1,1 (0,4-3,2)	0,9
G	A	0,24	0,27	1,2 (0,6-2,8)	0,6

COMT: catecol-O-metiltransferasa; IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*.

<sup>a</sup>Prueba de homogeneidad de probabilidades ajustada por edad, sexo y tabaquismo. Cada valor de p se corrigió por múltiples comparaciones mediante ciclos de 10.000 permutaciones.



**6.2 ESTUDIO N° 2**

---

Asociación del polimorfismo A/G intrón 13 en el gen de la Monoamino Oxidasa B (MAO-B) con el riesgo de esquizofrenia en una población española.

**Association of A/G polymorphism in Intron 13 of the Monoamine Oxidase B (MAO-B) gene with schizophrenia in a Spanish population.**

**Patricia Gassó<sup>a</sup>, Miquel Bernardo<sup>b</sup>, Sergi Mas<sup>a</sup>, Anna Crescenti<sup>a</sup>, Clemente Garcia<sup>b</sup>,  
Eduard Parellada<sup>b</sup>, Amalia Lafuente<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, IDIBAPS. Barcelona. Spain.

<sup>b</sup> Psychiatry Service, Hospital Clínic Universitario de Barcelona. Barcelona. Spain.

*Neuropsychobiology*. 2008 Oct 3;58(2):65-70.



**RESUMEN:**

**Asociación del polimorfismo A/G intrón 13 en el gen de la Monoamino Oxidasa B (MAO-B) con el riesgo de esquizofrenia en una población española.**

**Antecedentes:** La enzima Monoamino Oxidasa B (MAO-B) participa en el metabolismo oxidativo de la dopamina. En este trabajo estudiamos si el polimorfismo A644G del intrón 13 del gen *MAO-B* es un factor de riesgo para la esquizofrenia.

**Métodos:** 242 sujetos diagnosticados con esquizofrenia y trastornos relacionados y 290 controles de base hospitalaria participaron en el estudio. A partir de una muestra de sangre entera se realizó el aislamiento del ADN genómico. Mediante una PCR alelo específica se llevó a cabo el genotipado de las muestras.

**Resultados:** Al realizar el análisis estratificando por diagnóstico se observó que el alelo G era un factor de riesgo de desarrollar esquizofrenia ( $p=0.006$ ). Al estratificar por sexo el alelo G fue un factor de riesgo de esquizofrenia únicamente en mujeres ( $p=0.01$ ). A pesar de que la frecuencia del alelo G fue mayor en los hombres esquizofrénicos que en los hombres controles, las diferencias no fueron significativas.

**Conclusiones:** Los resultados de nuestro estudio sugieren que el gen *MAO-B* está implicado en el riesgo de desarrollar esquizofrenia, especialmente en mujeres.



## Association of A/G Polymorphism in Intron 13 of the Monoamine Oxidase B Gene with Schizophrenia in a Spanish Population

Patricia Gassó<sup>a</sup> Miquel Bernardo<sup>b</sup> Sergi Mas<sup>a</sup> Anna Crescenti<sup>a</sup>  
Clemente Garcia<sup>b</sup> Eduard Parellada<sup>b</sup> Amalia Lafuente<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, IDIBAPS, and

<sup>b</sup>Psychiatry Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona, Barcelona, Spain

### Key Words

Monoamine oxidase · Genetic polymorphism · Schizophrenia

### Abstract

**Background:** Monoamine oxidase B (MAO-B) enzyme is involved in the oxidative metabolism of dopamine. We studied whether the A644G polymorphism in intron 13 of the MAO-B gene is a risk factor for schizophrenia. **Methods:** 242 subjects diagnosed with schizophrenia and related disorders and 290 hospital-based controls participated in the study. Genomic DNA was isolated from whole blood and genotyped with the allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction method. **Results:** This polymorphism was studied by diagnosis subgroups and the G allele was identified as a risk factor for developing schizophrenia ( $p = 0.006$ ). When we performed a sex-specific analysis, the G allele was only a risk factor for developing schizophrenia in women ( $p = 0.01$ ). Although the frequency of the G allele is higher in male patients than in male controls, no statistically significant association with schizophrenia was found. **Conclusion:** Our results support the involvement of the MAO-B gene in schizophrenia, particularly in women.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Monoamine oxidase (MAO) is a mitochondrial enzyme involved in the degradation of several different biological amines, including dopamine. In accordance with the dopamine theory to explain the pathogenesis of schizophrenia, lower activity of the MAO enzyme would cause an increase in dopamine levels and therefore it would be a risk factor for developing schizophrenia.

There are two types of MAO: MAO-A and MAO-B, which differ in their substrate and inhibitor specificity and are encoded by two distinct genes both with 15 exons and lying adjacent to each other at Xp11.23–11.4 [1]. At the region Xp11, several positive lod scores from sib pair studies and multiplex family genome scans for schizophrenia have been found [2, 3]. The fact that MAO-B is located in the X chromosome has to be taken into account, since males are constituent hemizygotes for X chromosome genes, while females become functionally hemizygous (they have only a single functional copy through X chromosome inactivation).

The most common polymorphism of MAO-B is a single-base change (A644G) in intron 13 (rs1799836) [4]. Although this A→G substitution does not change the protein sequence, it is associated with varying enzyme activity. In vitro, the G allele has been associated with higher enzyme activity [5]. In vivo, the results are contradictory

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel  
0302-282X/08/0582-0065\$24.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/nps

Amalia Lafuente  
Departamento de Farmacología y Química Terapéutica  
Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Casanova 143  
ES-08036 Barcelona (Spain)  
Tel. +34 934 024 526, Fax +34 934 035 881, E-Mail amalialafuente@ub.edu

in platelets: while no association was found by some authors [6, 7], one study observed higher MAO-B activity in G allele carriers than in A allele carriers [8]. However, in the human brain, the G allele is associated with lower activity of the enzyme [9]. These differences could be caused either by separate and tissue-specific control mechanisms of MAO-B activity [10], or by differences in linkage disequilibrium between different populations.

Here we studied whether the A644G polymorphism in intron 13 of the MAO-B gene is involved in schizophrenia and related disorders. Our initial hypothesis, like that of Balciuniene et al. [9], was that the G allele would be a risk factor for developing the disease, since it contributes to the accumulation of dopamine in the brain.

### Materials and Methods

Sample size calculations were based on control genotype frequencies from previous studies of Caucasian subjects. Calculations assumed a 5% level of significance, 80% power and a schizophrenia risk of 2 associated with carrying the studied alleles.

#### Subjects

The schizophrenia patients were recruited at the Psychiatric Service of the Hospital Clínic (Barcelona, Spain) between 2002 and 2004. Using DSM-IV criteria [11], 242 subjects were diagnosed with schizophrenia and related disorders. Diagnoses of cases were established using the SCID-DSM-IV version. Reliability and validity of the SCID-DSM-IV have been reported in several published studies [12].

The control group consisted of 290 subjects who were consecutively recruited at the Trauma Service of the Hospital Clínic and who had previously participated in genetic studies on schizophrenia risk [13]. Most of the controls were admitted for hip or knee joint replacement, pelvic fracture or injury to the upper or lower ribs. A questionnaire was administered to each patient in an interview, which elicited demographic information, data on occupation and smoking habits and personal medical history. Moreover, the clinical information obtained was checked in clinical records. Patients were excluded from the control group if they reported a history of malignancy or mental disorder.

All those participating in the study were Caucasians, living in Catalonia. Catalonia is a region in north-east Spain with 7,083,610 habitants, 93.3% of which are Caucasians. Other ethnic groups were excluded.

Written informed consent and whole blood samples were obtained from each subject. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic.

#### Experimental Procedures

DNA was prepared from 300  $\mu$ l of whole blood samples using standard techniques. MAO-B A644G genotyping: the analysis of genotypes A or G in intron 13 was performed by allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction, using the A- and G-specific oligonucleotides 5'-CACTGGCAAATAGCAAAGT-3' and 5'-CACTGGCAAATAGCAAAGC-3' [14] as reverse prim-

**Table 1.** Characteristics of case and control groups for the schizophrenia risk study

	General population controls	Patients with schizophrenia and related disorders
Number	290	242
Age, years	61.7 $\pm$ 11	34.05 $\pm$ 13 <sup>1</sup>
Men	111/290 (38.2)	132/242 (54.5) <sup>1</sup>
Smokers <sup>2</sup>	104/290 (35.8)	104/180 (57.7) <sup>1</sup>
Diagnosis		
Schizophrenia		159 (65.7)
Schizoaffective disorder		30 (12.4)
Acute psychotic disorder		39 (16.1)
Delusional (paranoid) disorder		11 (4.5)
Schizotypal disorder		3 (1.2)

For some patients, no information on tobacco use was available (62 cases missing). Figures in parentheses indicate percentages.

<sup>1</sup>  $p < 0.001$  (vs. controls).

<sup>2</sup> Smoker group includes ex-smokers.

ers and 5'-GGATTACTTTGCAGGCACC-3' [4] as a forward primer obtaining polymerase chain reaction products of 663 bp.

#### Statistics

Data were analyzed using the SPSS 14.05 (statistical analysis software, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Means and standard deviations were computed for continuous variables. Univariate analysis ( $\chi^2$  test for categorical variables; Student's test for continuous variables) was used to identify variables associated with the risk of developing schizophrenia. Multivariate analyses (multiple logistic regressions) were used to estimate the independent contribution to schizophrenia risk of each genotype and variables. We used a backward strategy: the variables identified through the univariate analysis (sex, age and smoking pattern) were included in the logistic regression model. The criterion for retaining a variable was  $\alpha = 0.1$ . Confidence limits for the adjusted odds ratio were calculated with the associated logistic coefficients and standard errors. MAO-B 644G allele distribution in age subgroups was analyzed with the  $\chi^2$  test. The Cochran-Armitage test was calculated with the XLSTAT2007 statistical analysis software. The Hardy-Weinberg equilibrium was calculated with the genetics package of the R statistical software (version 2.4.0).

### Results

Table 1 shows the demographic characteristics of the cases (patients with schizophrenia and related disorders) and controls (hospital-based group). The psychiatric diagnoses of the cases are also shown in table 1. Because of the age difference between cases and controls

**Table 2.** Descriptive distribution of allele and genotype frequencies and multivariate analysis of MAO-B alleles and genotypes**a** Schizophrenia and related disorders

	Cases		Control		Multivariate analysis		
	n	%	n	%	OR	CI	p
Allele G total <sup>1</sup>	162/352	46.0	203/469	43.3	1.3	0.8–2.1	0.1
Allele G males <sup>1</sup>	57/132	43.1	43/111	38.7	0.9	0.3–2.5	0.9
Allele G females <sup>1</sup>	105/220	47.7	160/358	44.7	1.5	0.8–2.6	0.1
Genotype AG <sup>2</sup>	49/110	44.5	80/179	44.7	1.0	0.3–2.7	0.9
Genotype GG <sup>2</sup>	28/110	25.4	40/179	22.3	2.3	0.7–6.9	0.1

**b** Schizophrenia

	Cases		Control		Multivariate analysis		
	n	%	n	%	OR	CI	p
Allele G total <sup>1</sup>	105/217	48.4	203/469	43.3	2.3	1.2–4.4	<i>0.006</i>
Allele G males <sup>1</sup>	47/101	46.5	43/111	38.7	1.6	0.5–4.8	0.3
Allele G females <sup>1</sup>	58/116	50.0	160/358	44.7	2.6	1.1–6.0	<i>0.01</i>
Genotype AG <sup>2</sup>	28/58	48.2	80/179	44.7	1.2	0.3–4.8	0.7
Genotype GG <sup>2</sup>	15/58	25.8	40/179	22.3	6.7	1.3–32.4	<i>0.01</i>

Italicized figures indicate significant p values.

<sup>1</sup> Multivariate logistic regression analysis that studied MAO-B 644G allele as continuous variable (0 = wild type; 1 = heterozygous; 2 = homozygous mutated), adjusted for age, sex and smoking habit.

<sup>2</sup> Multivariate logistic regression analysis of the genotypes, adjusted for age, sex and smoking habit (baseline homozygotes AA). Only in women.

and the slight imbalance in smoking habits among the controls, the analysis was adjusted to account for these features. The analysis of allele frequency in the total population (men and women) was also adjusted for gender due to the differences found between cases and controls. 33.2% of cases reported a history of drug abuse, the most common substances being cannabis (18.8%), alcohol (4.8%) and cocaine (3.2%). Since no information on substance abuse was available for the control group, it was not possible to study the contribution of toxic habits (other than tobacco) to the risk of developing schizophrenia.

To explore potential associations between this polymorphism and susceptibility to schizophrenia and related disorders, a multivariate analysis adjusted for the above variables was used. Because the MAO-B gene is located in the X chromosome, the distribution of the genotype frequency was only analyzed in women. The distribution of the allele frequency was examined in the total group (men and women) as well as in men and in women

separately. We did not find any association in allele frequency distribution or genotype frequency distribution ( $p > 0.05$ ) (table 2a).

For the MAO-B A644G polymorphism, the Hardy-Weinberg equilibrium was preserved in females from both affected and control samples.

We also performed a multivariate analysis for the stratum of schizophrenia adjusted for the same variables to investigate whether this polymorphism is associated only with this disease and not with related disorders. The G allele was identified as a risk factor in the total group (men and women), doubling the risk of developing schizophrenia (OR 2.3, CI 1.2–4.4,  $p = 0.006$ , statistical power 99.5%).

When we stratified this analysis by gender, the G allele was a risk factor only in women (OR 2.6, CI 1.1–6.0,  $p = 0.01$ , statistical power 95.9%). The highest risk was found in GG homozygous women (OR 6.7, CI 1.3–32.4,  $p = 0.01$ , statistical power 99.9%) (table 2b).

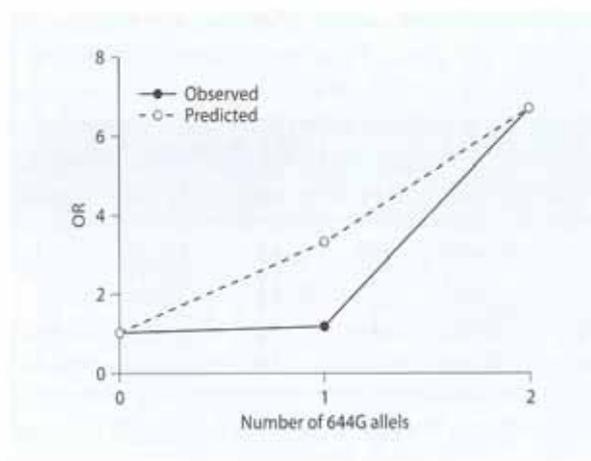


Fig. 1. Observed and predicted OR values in women (Cochran-Armitage test not significant;  $|Z| = 0.9$ ,  $p = 0.338$ ).

## Discussion

Our control group has been extensively used in pharmacogenetic studies [15], including schizophrenia risk studies [13]. The group is a hospital-based group of patients seeking surgical treatment for hip, pelvic and other fractures. In the present study, this control group was older and included more women than the case group. This limitation of the present study can be attributed to the higher prevalence of traumatic pathologies in older patients and especially in postmenopausal women. However, we found no evidence to suggest that the control group was biased with respect to the *MAO-B* gene. The genotype and allele frequencies in the control group were similar to those described in other European populations [16]. It is also important to note that no association was observed between the genotypes studied and gender or age in our control group (data not shown). Finally, there is no evidence that the primary medical conditions affecting controls from the Trauma Service are associated with genetic variations at the *MAO-B* locus or with susceptibility to schizophrenia. We therefore conclude that our control group is unlikely to be biased in terms of genetic background or distribution of *MAO-B* genotypes. Furthermore, taking into account that schizophrenia is an early-onset disease, normal but elderly subjects are the individuals with lowest liability and most resistance to these diseases, and they could be considered as hypernormal controls. The use of hypernormal controls is a sample-based case-control design that improves the efficiency of association studies [17].

The *MAO-B* A644G polymorphism has been investigated in few case-control studies with schizophrenic patients, and no significant association has been found with schizophrenia or with diagnostic subclassifications of the disease [16], or with specific symptoms, such as aggressive behavior [18].

Our findings revealed a high prevalence of the G allele in patients with schizophrenia and related disorders (diagnosis group following the DMS-IV manual), but without statistical significance. We attempted to obtain more specific results by studying the subgroup of patients with schizophrenia. Although we reduced the sample size, we found an association of the G allele with the risk of developing schizophrenia. This finding could indicate heterogeneity of susceptibility factors among diagnostic subclassifications in the schizophrenia and related disorders group.

As few articles have studied *MAO-B* and the risk of schizophrenia, this study is particularly relevant. One of the reasons for this lack of papers is probably the complexity of working with genes associated with the X chromosome. When we performed a sex-specific analysis, the G allele was only a risk factor for developing schizophrenia in women. Although the frequency of the G allele is higher in male patients than in male controls, no statistically significant allelic association with schizophrenia was found. Although women have two copies of the *MAO-B* gene (two X chromosomes) and men have only one copy (one X chromosome, constituent hemizygotes), in theory the risks should level out, since women inactivate one X chromosome during embryogenesis (functional hemizygotes).

However, the risk will be greater in women if the gene's character is dominant (affects either sex, but more females than males), or it will be greater in men if the character is recessive [19]. At any rate, the greater risk of schizophrenia depending on the *MAO-B* 644G allele, which we observed in women, could be attributable to other factors, such as the levels of estrogens that regulate *MAO-B* promoter activity [20].

Another striking aspect of our findings is the high risk found in homozygote women (OR = 6.4), in stark contrast to the absence of risk in heterozygote women (OR = 1.2). If its character follows the additive allele risk model, the predicted OR values for the female heterozygote AG group will be close to 3, taking the OR values of the homozygous women (fig. 1). However, we must bear in mind that the inactivation of the X chromosome in women during embryogenesis occurs at random. Therefore, in women who are AG heterozygous for the *MAO-B* A644G

polymorphism, we can find cell lines in which the X chromosome bearing the G allele has been inactivated and another line in which the A allele has been inactivated. Therefore, each heterozygous woman is a mosaic of clones that derive from different embryo cells; the group of heterozygous women is perforce highly heterogeneous. It is difficult to predict in this group the expression of one or another allele and thus its contribution to the risk of any illness.

The interaction between gender and MAO-B A644G genotype in schizophrenia is new. However, other association studies investigating this polymorphism reported woman-specific effects in Parkinson's disease [21, 22]. Moreover, genetic variants of MAO-A have been associated with other psychiatric diseases like bipolar disorders [23] and panic disorders [24] only in women.

In line with our results and the hypothesis of abnormal prefrontal dopamine signalling in schizophrenia [25], the MAO-B 644G allele correlates with lower MAO-B activity in the prefrontal cortex function [9]. These results reveal the importance of genetic variability affecting catecholamine degradation enzymes in schizophrenia. The genes encoding these enzymes, like MAO-A [26], COMT [27] or DAT [28], are good candidates for association studies as well as other classical candidate genes like

dopamine receptors, i.e. dopamine receptors D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> [13].

Our results indicate that the A644G polymorphism of the MAO-B gene plays a role in schizophrenia in a Spanish population. The G allele is a risk factor for developing schizophrenia in women. However, more studies are needed to clarify the role of gender in the risk of schizophrenia associated with this polymorphism, preferentially family-based association studies, as they are robust against population admixture and stratification and will become more powerful with the advent of genome-wide association studies.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Esther Planas for help in the recruitment of patients, and to the Language Advisory Service at the University of Barcelona, Spain, for manuscript revision.

This study was supported by the Spanish Ministry of Health, Instituto Carlos III (RETICS, Red de Enfermedades Mentales REM-TAP Network RD06/0011/06-05; CIBER-SAM, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental CB07/09/005; FIS, Fondo de Investigación Sanitaria P1060182U-2006) and the Catalonia HYPERLINK <http://www.gencat.net/diue> Ministry of Innovation, Universities and Enterprise (DURSI, GRC2005SGR-00039, GC2005SGR00039, GC2005SGR00223).

### References

- 1 Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC: Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3637-3641.
- 2 Dann J, DeLisi LE, Devoto M, Laval S, Nancarrow DJ, Shields G, Smith A, Loftus J, Peterson P, Vita A, Comazzi M, Invernizzi G, Levinson DF, Wildenauer D, Mowry BJ, Collier D, Powell J, Crowe RR, Andreasen NC, Silverman JM, Mohs RC, Murray RM, Walters MK, Lennon DP, Crow TJ: A linkage study of schizophrenia to markers within Xp11 near the MAOB gene. *Psychiatry Res* 1997;70:131-143.
- 3 Williams NM, Rees MI, Holmans P, Norton N, Cardno AG, Jones LA, Murphy KC, Sanders RD, McCarthy G, Gray MY, Fenton I, McGuffin P, Owen MJ: A two-stage genome scan for schizophrenia susceptibility genes in 196 affected sibling pairs. *Hum Mol Genet* 1999;8:1729-1739.
- 4 Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD: Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1993;33:368-372.
- 5 Costa-Mallen P, Keleda SN, Costa LG, Checkoway H: Characterization of the in vitro transcriptional activity of polymorphic alleles of the human monoamine oxidase-B gene. *Neurosci Lett* 2005;383:171-175.
- 6 Filic V, Vladoic A, Stefulj J, Cicin-Sajn L, Balija M, Susic Z, Jernej B: Monoamine oxidase A and B gene polymorphism in migraine patients. *J Neurol Sci* 2005;228:149-153.
- 7 Pivac N, Knezevic J, Mustapic M, Dezeljic M, Muck-Seler D, Kozaric-Kovacic D, Balija M, Matijevec T, Pavelic J: The lack of association between monoamine oxidase (MAO) intron 13 polymorphism and platelet MAO-B activity among men. *Life Sci* 2006;79:45-49.
- 8 Garpenstrand H, Ekblom J, Forslund K, Rylander G, Orelund L: Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype. *J Neural Transm* 2000;107:523-530.
- 9 Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L, Pettersson U, Jazin EE: Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum Genet* 2002;110:1-7.
- 10 Ekblom J, Garpenstrand H, Damberg M, Chen K, Shih JC, Orelund L: Transcription factor binding to the core promoter of the human monoamine oxidase B gene in the cerebral cortex and in blood cells. *Neurosci Lett* 1998;258:101-104.
- 11 American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Method of Mental Disorders, ed 4. Washington, American Psychiatric Association, 1994.
- 12 First MB, Spitzer RL, Williams JBW, Gibbon M: Structured Clinical Interview for DSM-IV - Patient Edition (SCID-P). Washington, American Psychiatric Press, 1994.
- 13 Lafuente A, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Aparici M, Gassó P, Goti J, Sanchez V, Catalan R, Carne X: -141C Ins/Del polymorphism of the dopamine D<sub>2</sub> receptor gene is associated with schizophrenia in a Spanish population. *Psychiatr Genet* 2008;18:122-127.
- 14 Ho SL, Kapadi AL, Ramsden DB, Williams AC: An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995;37:403-405.

- 15 Lafuente MJ, Casterad X, Trias M, Ascaso C, Molina R, Ballesta A, Zheng S, Wienckie JK, Lafuente A: NADP(H):quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21:1813-1819.
- 16 Coron B, Campion D, Thibaut F, Dollfus S, Preterre P, Langlois S, Vasse T, Moreau V, Martin C, Charbonnier F, Laurent C, Mallet J, Petit M, Frebourg T: Association study between schizophrenia and monoamine oxidase A and B DNA polymorphisms. *Psychiatry Res* 1996;62:221-226.
- 17 Morton NE, Collins A: Tests and estimates of allelic association in complex inheritance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11389-11393.
- 18 Zammit S, Jones G, Jones SJ, Norto N, Sanders RD, Milham C, McCarthy GM, Jones LA, Cardno AG, Gray M, Murphy KC, O'Donovan MC, Owen MJ: Polymorphisms in the MAOA, MAOB, and COMT genes and aggressive behavior in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;28:19-20.
- 19 Strachan T, Read AP: *Human Molecular Genetics*, ed 3. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd, 2003.
- 20 Zhang Z, Chen K, Shih JC, Teng CT: Estrogen-related receptors-stimulated monoamine oxidase B promoter activity is down-regulated by estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2006;20:1547-1561.
- 21 Kelada SN, Costa-Mallen P, Costa LG, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth WT, Checkoway H: Gender differences in the interaction of smoking and monoamine oxidase B intron 13 genotype in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002; 23:5515-5519.
- 22 Preisig M, Bellivier F, Fenton BT, Baud P, Berney A, Courtet P, Hardy P, Golaz J, Leboyer M, Mallet J, Matthey ML, Mouthon D, Neidhart E, Nosten-Bertrand M, Stadelmann-Dubuis E, Guimon J, Ferrero F, Buresi C, Malafosse A: Association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms: results of a multicenter study. *Am J Psychiatry* 2000;157:948-955.
- 23 Costa P, Checkoway H, Levy D, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Costa LG: Association of a polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with Parkinson's disease. *Am J Med Genet* 1997;74:154-156.
- 24 Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, Nöthen MM, Maffei P, Franke P, Fritze J, Maier W, Propping P, Beckmann H, Bellodi L, Lesch KP: Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 1999;8:621-624.
- 25 Kapur S: Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003;160:1081-1090.
- 26 Li D, He L: Meta-study on association between the monoamine oxidase A gene (MAOA) and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B:174-178.
- 27 Funke B, Malhotra AK, Finn CT, Plocik AM, Lake SL, Lencz T, DeRosse P, Kane JM, Kucheraipati R: COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: a case control study. *Behav Brain Funct* 2005; 1:19-25.
- 28 Gamma F, Faraone SV, Glatt SJ, Yeh YC, Tsuang MT: Meta-analysis shows schizophrenia is not associated with the 40-base pair repeat polymorphism of the dopamine transporter gene. *Schizophr Res* 2005;73:55-58.

### 6.3 ESTUDIO N° 3

Asociación entre polimorfismos de los genes *COMT*, *MAO* y *DAT* y el riesgo de desarrollar esquizofrenia y efectos extrapiramidales en pacientes tratados con antipsicóticos.

**Association of polymorphisms in *COMT*, *MAO* and *DAT* genes with the risk of developing extrapyramidal symptoms in patients treated with antipsychotics and with the risk of schizophrenia.**

**P. Gassó<sup>1</sup>, S. Mas<sup>1</sup>, A. Crescenti<sup>1</sup>, JM. Vidal<sup>1</sup>, S. Álvarez<sup>1</sup>, M. Bernardo<sup>2</sup>, A. Lafuente<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Dep. Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología. Facultad de Medicina.  
Universidad de Barcelona. IDIBAPS. Casanova 143, E-08036 Barcelona (Spain).

<sup>2</sup>Psychiatry Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona, Villarroel 170, E-08036  
Barcelona (Spain).

Comunicación oral del XXI Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica que tuvo lugar en Barcelona, del 22 al 25 de Octubre de 2008.





**RESUMEN:**

**Asociación entre polimorfismos de los genes *COMT*, *MAO* y *DAT* y el riesgo de desarrollar esquizofrenia y efectos extrapiramidales en pacientes tratados con antipsicóticos.**

**Objetivos:** Examinar la relación que existe entre polimorfismos de la *COMT* (G158A y -278 A/G), *MAO-A* (30bp-VNTR y 941T/G), *MAO-B* (A/G intrón 13) y *DAT* (40bp-VNTR y -67A/T) y el riesgo de aparición de síntomas extrapiramidales (EPS) inducidos por antipsicóticos (APs). El objetivo secundario fue estudiar el riesgo de esquizofrenia.

**Reclutamiento:** Se reclutaron 500 pacientes del Servicio de Psiquiatría del Hospital Clínico de Barcelona entre los años 2002 y 2004. De ellos, 270 pacientes esquizofrénicos y con trastorno bipolar tratados con terapia antipsicótica se incluyeron en el estudio de riesgo de EPS. 81 casos desarrollaron EPS (Simpson Angus > 3) y 189 controles no desarrollaron esta sintomatología (Simpson Angus ≤ 3). También llevamos a cabo el estudio de riesgo de esquizofrenia a partir de un subgrupo de 243 pacientes esquizofrénicos y de 291 controles de base hospitalaria.

**Métodos:** A partir de sangre entera realizamos el aislamiento de ADN genómico. Los polimorfismos seleccionados se genotiparon mediante diferentes métodos validados incluyendo PCR-RFLP, ASO-PCR y PCR-electroforesis capilar.

**Resultados:** El alelo *COMT*<sup>L</sup> produjo en heterocigotos una reducción del 60% del riesgo de EPS (OR:0.4, p=0.04). Esta asociación resultó ser más fuerte en el subgrupo de pacientes bipolares donde el alelo *COMT*<sup>L</sup> daba una protección del 70% (OR:0.3, p=0.01). En el análisis de los haplotipos de la *COMT*, los haplotipos A-G y A-A se asociaron al riesgo y protección, respectivamente, de desarrollar EPS en el subgrupo de pacientes bipolares. En el estudio de riesgo de esquizofrenia se observó que los heterocigotos para el polimorfismo *COMT* -278 A/G presentaban un menor riesgo de sufrir la enfermedad (OR:0.4, p=0.009). Además, pudimos identificar al alelo G del polimorfismo *MAO-B* A/G intrón 13 como un factor de riesgo de esquizofrenia (OR:2.3 p=0.006). Cuando realizamos el análisis estratificando por sexo, el alelo G fue un factor de riesgo únicamente en mujeres (Alelo G, OR:2.6; homocigotas GG, OR:6.7; p=0.01).

**Conclusiones:** Este es el primer trabajo donde se encuentra una asociación entre el polimorfismo de la *COMT* y la susceptibilidad a los EPS. Este resultado es especialmente interesante si tenemos en cuenta el incremento del uso de fármacos antipsicóticos en paciente bipolares. Además, nuestros resultados sugieren que los polimorfismos *COMT* -278 A/G y and *MAO-B* A/G intrón 13 pueden contribuir al riesgo de desarrollar esquizofrenia.



**Association of polymorphisms in COMT, MAO and DAT genes with the risk of developing extrapyramidal symptoms in patients treated with antipsychotics and with the risk of schizophrenia.**

**P. Gassó<sup>1</sup>, S. Mas<sup>1</sup>, A. Crescenti<sup>1</sup>, JM. Vidal<sup>1</sup>, S. Álvarez<sup>1</sup>, M. Bernardo<sup>2</sup>, A. Lafuente<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Dep. Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. IDIBAPS. Casanova 143, E-08036 Barcelona (Spain).

<sup>2</sup>Psychiatry Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona, Villarroel 170, E-08036 Barcelona (Spain).

**Objectives:** The aim of the present study was to examine the relationship between COMT (G158A, -278 A/G), MAO-A (30bp-VNTR and 941 T/G), MAO-B (A/G intron 13) and DAT (VNTR and T-67A) polymorphisms and the risk of antipsychotic (AP)-induced extrapyramidal symptoms (EPS) in patients receiving AP treatment. A secondary aim was to study the risk of schizophrenia.

**Setting:** A cohort of 500 patients were recruited in the Psychiatric Service of the Hospital Clinic (Barcelona, Spain) between 2002 and 2004. Of those patients, 270 schizophrenic and bipolar patients received AP therapy and were included in the study of EPS risk. 81 cases developed EPS (Simpson Angus > 3) and 189 controls did not (Simpson Angus ≤ 3). We also studied schizophrenia risk in a subgroup of 243 schizophrenic patients and 291 hospital-based controls.

**Methods:** Genomic DNA was isolated from whole blood and the selected polymorphisms were genotyped following various validated methods including PCR-RFLP, ASO-PCR and PCR-Capillary electrophoresis.

**Results:** The COMT<sup>L</sup> allele was associated with a 60% reduction of EPS risk in heterozygotes (OR:0.4, p=0.04). This association remained strong in the bipolar subgroup with a COMT<sup>L</sup> allele protection of 70% (OR:0.3, p=0.01). The analysis of the COMT haplotypes revealed an association of the A-G haplotype with EPS risk in the overall group and the bipolar disorder subgroup, and association of the A-A with EPS protection in the bipolar subgroup (permuted P-value=0.01). In the study of schizophrenia risk, we observed that heterozygotes for the COMT -278 A/G polymorphism had a reduced risk of suffering schizophrenia (OR:0.4, p=0.009). We also identified allele G of the MAO-B A/G intron 13 polymorphism as a risk factor for schizophrenia (OR:2.3 p=0.006) and a sex-specific analysis showed that allele G was a risk factor only in women (OR 2.6, allele G; OR 6.7, homozygotes GG; p=0.01).

**Conclusions:** This is the first report of an association between COMT polymorphism and EPS susceptibility. These results are especially interesting if we take into account the increased use of AP drugs in bipolar patients. Moreover, our results suggest the COMT -278 A/G and MAO-B A/G intron 13 polymorphisms may contribute to the risk of developing schizophrenia.



#### **6.4 ESTUDIO N° 4**

---

Polimorfismos del receptor de dopamina D2 (TaqIA, TaqIB, y -141C Ins/Del) y de la enzima metabolizadora de la dopamina (COMT G158A, A-278G) y síntomas extrapiramidales en pacientes esquizofrénicos y bipolares.

**Polymorphism of Dopamine D2 receptor (TaqIA, TaqIB, and -141C Ins/Del) and Dopamine degradation enzyme (COMT G158A, A-278G) genes and extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia and bipolar disorders.**

**Amalia Lafuente<sup>a</sup>, Miquel Bernardo<sup>b</sup>, Sergi Mas<sup>a</sup>, Anna Crescenti<sup>a</sup>, Monica Aparici<sup>a</sup>, Patricia Gassó<sup>a</sup>, Ramon Deulofeu<sup>c</sup>, Anna Mane<sup>b</sup>, Rosa Catalan<sup>b</sup>, Xavier carne<sup>d</sup>.**

<sup>a</sup> Department Farmacología y química terapéutica. Universidad de Barcelona.IDIBAPS.  
Barcelona. Spain.

<sup>b</sup> Psychiatry Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona. Barcelona. Spain.

<sup>c</sup> Clinical Biochemistry Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona. Spain.

<sup>d</sup> Clinical Pharmacology Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona. Spain

*Psychiatr Res.* 2008; 161(2):131-41



**RESUMEN:**

**Polimorfismos del receptor de dopamina D2 (TaqIA, TaqIB, y -141C Ins/Del) y de la enzima metabolizadora de la dopamina (COMT G158A, A-278G) y síntomas extrapiramidales en pacientes esquizofrénicos y bipolares.**

**Objetivos:** Examinar la relación entre polimorfismos del receptor de dopamina D2 (DRD2) (TaqIA, TaqIB, y -141C Ins/Del) y de la Catecol-O-MetilTransferasa (COMT) (G158A, A-278G) y el riesgo de sufrir efectos extrapiramidales (EPS) inducidos por antipsicóticos en pacientes esquizofrénicos y en pacientes bipolares.

**Métodos:** 80 casos, pacientes que presentaron EPS (Simpson-Angus > 3) y 188 controles, pacientes que no desarrollaron EPS (Simpson-Angus ≤ 3), participaron en el estudio.

**Resultados:** El alelo COMT<sup>L</sup> confiere una reducción del 60% al riesgo de desarrollar EPS en heterocigotos (OR 0.4; p=0.04, no significativo después de realizar la corrección de Bonferroni). El análisis de los haplotipos de la COMT reveló una asociación entre el haplotipo A-G y el riesgo de EPS en todo el grupo y en el subgrupo de pacientes bipolares, así como una asociación del haplotipo A-A y protección a sufrir EPS en el subgrupo de pacientes bipolares (valor de *p* permutada=0.01). No se encontró ninguna asociación para los polimorfismos del DRD2 ni COMT -278A/G.

**Conclusiones:** Este es el primer estudio que encuentra asociación entre el polimorfismo de la COMT y la susceptibilidad a los EPS. Estos resultados son de gran interés si tenemos en cuenta el incremento del uso de fármacos antipsicóticos en pacientes bipolares, tanto en las fases maníacas como en las depresivas.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Psychiatry Research 161 (2008) 131–141

---



---

**PSYCHIATRY  
RESEARCH**


---



---

[www.elsevier.com/locate/psychres](http://www.elsevier.com/locate/psychres)

## Polymorphism of dopamine D2 receptor (TaqIA, TaqIB, and-141C Ins/Del) and dopamine degradation enzyme (COMT G158A, A-278G) genes and extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia and bipolar disorders

Amalia Lafuente<sup>a,\*</sup>, Miquel Bernardo<sup>b</sup>, Sergi Mas<sup>a</sup>, Anna Crescenti<sup>a</sup>, Monica Aparici<sup>a</sup>, Patricia Gasso<sup>a</sup>, Ramon Deulofeu<sup>c</sup>, Anna Mane<sup>b</sup>, Rosa Catalan<sup>b</sup>, Xavier Came<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, University of Barcelona, IDIBAPS, Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Psychiatry Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Clinical Biochemistry Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Clinical Pharmacology Service, Hospital Clínico Universitario de Barcelona, Spain

Received 17 January 2007; received in revised form 3 July 2007; accepted 4 August 2007

---

### Abstract

**Objective:** The relationship is examined of the dopamine D2 receptor (DRD2) polymorphism (TaqIA, TaqIB, –141 C Ins/Del) and the catechol-*O*-methyltransferase (COMT) polymorphism (A-278G, G158A) to the risk of antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms (EPS) in schizophrenia and bipolar disorders. Participants comprised 80 cases presenting with EPS (Simpson-Angus Scale score >3) and 188 controls presenting without EPS (Simpson-Angus Scale score ≤3) participated in this study. The COMT<sup>L</sup> allele conferred a reduction of EPS risk of 60% to heterozygotes, but the finding did not survive correction for multiple comparisons. In the bipolar subgroup, with a COMT<sup>L</sup> allele protection of 70%, the reduction remained significant after Bonferroni correction. The analysis of the COMT haplotypes revealed an association of the A–G haplotype with EPS risk in the overall group and the bipolar disorder subgroup, and an association of the A–A haplotype with EPS protection in the bipolar subgroup. No significant associations were found for DRD2 or COMT A-278G polymorphisms. This is the first report of an association between the COMT polymorphism and EPS susceptibility. These results are of interest in view of the increased use of antipsychotic drugs in bipolar patients in both the acute manic and the depressive phase.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Catechol-*O*-methyltransferase; D2 receptor gene; Schizophrenia; Bipolar disorders; Extrapyramidal symptoms; Pharmacogenetics

---

**Abbreviations:** AP, antipsychotics; CEDD, chlorpromazine-equivalent daily dose; DRD2, dopamine D2 receptor; COMT, catechol-*O*-methyltransferase; EPS, extrapyramidal symptoms; LAIR, long acting injectable risperidone; PET, positron emission tomography; TD, tardive dyskinesia.

\* Corresponding author. Department Farmacología y Química Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024526; fax: +34 934035881.

E-mail address: [amalialafuente@ub.edu](mailto:amalialafuente@ub.edu) (A. Lafuente).

0165-1781/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.psychres.2007.08.002

## 1. Introduction

Antipsychotic (AP) treatment-emergent extrapyramidal symptoms (EPS) are frequent and serious acute adverse reactions of AP drugs, the signs of which may develop within days of starting medication (Tonda and Guthrie, 1994). Neuroimaging studies have demonstrated that the effects of APs are associated with a striatal dopamine D2 receptor (DRD2) occupancy of 65–70%, and that occupancy of greater than 80% significantly increases the risk of EPS (Farde et al., 1992; Remington and Kapur, 1999). First-generation AP agents or typical APs have a high affinity for DRD2 (Seeman et al., 1976). The incidence of EPS with typical AP treatment is around 50–75%. The newer APs or atypical APs have lower levels of DRD2 affinity, and they have an affinity for other receptors such as those in the serotonin system (Kapur et al., 1998; Kapur et al., 1999). However, not all the atypical APs have the same DRD2 affinity, which ranges from high (risperidone) to low (clozapine). Moreover, this range of affinity could be translated into a high or a low risk of developing EPS. The mean incidence of EPS with atypical AP is 15% (Miyamoto et al., 2005).

In addition to AP affinity for DRD2 and dosage, other risk factors for AP-induced EPS have been identified, such as age (Lewis, 1998) and psychiatric diagnosis, especially mood disorders (McIntyre and Konarski, 2005). These risk factors are also well documented for tardive dyskinesia (TD), the most serious form of motor disorder in patients receiving long-term AP treatment. In addition, female gender, nonschizophrenic diagnosis, and the presence of acute EPS are predisposing factors for TD (Wirshing, 2001).

Moreover, individual variability in the induction of EPS in response to the same drug has been reported. Pharmacogenetic studies could help to predict EPS susceptibility and facilitate the choice of treatment. In general, such studies have focused on TD rather than EPS. Most studies examined associations of polymorphisms at gene loci related to central dopaminergic systems, such as DRD2 (–141 C Ins/Del, Taq IA, Taq IB) or dopamine metabolism enzymes such as catechol-*O*-methyltransferase (COMT G158A).

The density of striatal dopamine DRD2 varies among healthy subjects. This variability might be due to both environmental and genetic factors. Arinami et al. (1997) have reported that the –141 C Del allele decreases the promoter activity of the DRD2 gene, while other studies report an inverse association (Jönsson et al., 1999). The influence of other polymorphisms of the DRD2 gene (TaqIA and TaqIB polymorphisms) on the transcriptional activity and density of the DRD2 remains

controversial (Laruelle et al., 1998; Pohjalainen et al., 1998; Thompson et al., 1997).

Little work has been done to investigate the relationship between the DRD2 polymorphism and the risk of EPS. Association studies between the –141 C Ins/Del polymorphism and EPS susceptibility have generated conflicting results (Inada et al., 1999; Mihara et al., 2001; Kaiser et al., 2002; Nakazono et al., 2005). No associations have been described for the TaqIA or the TaqIB polymorphism (Mihara et al., 2000; Kaiser et al., 2002).

COMT metabolizes catecholamines such as dopamine and catechol drugs such as L-DOPA. An amino acid alteration determines the activity of the enzyme. A G-to-A transition at codon 158 of the COMT gene results in a valine-to-methionine substitution that renders COMT (COMT<sup>L</sup>) more thermolabile and less active at physiological temperatures (Lotta et al., 1995). Its functionality has led to extensive research on the G158A polymorphism in terms of schizophrenia risk, but with ambiguous findings (Glatt et al., 2003; Owen et al., 2004; Fan et al., 2005).

The COMT gene is transcribed from two promoters (P1 and P2), resulting in a cytoplasmatic form (soluble, S-COMT, transcribed from P1) and a membrane-bound form (MB-COMT, transcribed from P2) (Tenhunen et al., 1994). Although both variants are widely expressed at varying levels, MB-COMT appears the predominant form in brain (Reenila and Mannisto, 2001). It has therefore been suggested that genetic variants in the P2 promoter could lead to alterations in brain COMT protein levels, *via* enhancement or suppression of transcription, and that such alterations would act as disease-predisposing variants (Palmatier et al., 2004). Recently, a variant in the P2 promoter (–278 A/G), which had a slight effect on enzyme activity (Chen et al., 2004), has been related to psychotic disorders using COMT haplotypes (Funke et al., 2005).

We hypothesized that carriers of COMT-defective alleles (COMT 158A and COMT –278G) might have greater dopamine availability than normal COMT homozygotes, as a result of which APs would compete more strongly for the DRD2 blockade and be less likely to cause acute EPS.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Patients receiving AP therapy ( $n=268$ ) were recruited in the Psychiatry Service of the Hospital Clinico (Barcelona, Spain) over a period of 3 years (2002–2004). Of the total group, 195 subjects were diagnosed as having schizophrenia ( $n=133$ ) and related disorders ( $n=21$

schizoaffective disorder;  $n=29$  acute psychotic disorder;  $n=10$  delusional paranoid disorder;  $n=2$  schizotypal disorder). Among the remaining subjects, 42 were diagnosed as having bipolar disorders using DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 1994), and 31 had other diagnoses (including personality disorder, psychotic depression, behavior disorder, mild cognitive impairment, and obsessive–compulsive disorder). Information on age, gender, smoking and substance abuse was recorded. All participants in the study were Caucasians living in Catalonia, Spain. Other ethnic groups was excluded. Written informed consent was obtained from each subject. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital.

## 2.2. Status of extrapyramidal symptoms

Acute EPS induced by AP medication were evaluated using the Simpson-Angus Scale (Simpson and Angus, 1970). Eighty patients presenting with EPS (Simpson-Angus  $>3$ ) during the hospitalization period were considered cases. The remaining 188 patients presenting without EPS (Simpson-Angus  $\leq 3$ ) in the same period were considered as controls. The period of treatment was at least 15 days. Patients treated with AP drugs for less than 15 days and who did not present EPS (controls) were discarded. Patients receiving anticholinergic treatment, antidepressants or mood stabilizers were also discarded. The inpatients were observed for 48 h (without AP medication) following admission, in cases of both acute exacerbation and first psychotic episodes.

## 2.3. AP Dosage

The daily AP dosage was calculated as chlorpromazine-equivalent daily dose (CEDD) (Woods, 2003). Amisulpride ( $n=4$ ) and Long Acting Injectable Risperidone (LAIR) ( $n=2$ ) conversion was not possible because there are no tables available. The total calculated CEDD included dosage addition when two APs were administered together (cases  $n=8$ , controls  $n=29$ ). This total CEDD was categorized into the following three groups: low  $\leq 200$  mg, medium 201–399 mg, and high  $\geq 400$  mg. In this new variable (CEDD), we include the Amisulpride (low  $\leq 25$  mg, medium 25–50 mg, high  $\geq 50$  mg) and LAIR (low  $\leq 400$  mg, medium 401–599 mg, high  $\geq 600$  mg) dosage in each corresponding category.

We categorized each AP drug for its EPS potency in three categories high, medium or low (Baldesarini and Tarazi, 2001; Flórez, 2003; Gardner et al., 2005). For zuclopentixol, data were collected from Laboratories Duphar-Nezel (Sovany) (Table 1).

## 2.4. Experimental procedures

DNA was isolated from 300  $\mu$ l from samples of total blood extracted using standard techniques.

### 2.4.1. TaqIA, TaqIB Genotyping

The genomic sequence of 310 pb spanning the polymorphic TaqIA site of the DRD2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the primer pair 5'-CCGTCGACCCTTCCTGAGTGT-CATCA and 5'-CCGTCGACGGCTGGCCAAGT-TGTCTA (Noble et al., 1994). The oligonucleotide primers 5'-GATACCCACTTCAGGAAGTC and 5'-GATGTGTAGGAATTAGCCAGG were used to amplify a 459 bp fragment which included the TaqIB polymorphism in the DRD2 gene (Castiglione et al.,

Table 1  
Distribution of different AP drugs and their AP-EPS potency used among cases and controls, mean and standard deviation of the AP dosage calculated and categorized as CEDD and AP-induced EPS in cases group

AP drug <sup>1</sup>	AP-EPS potency <sup>2</sup>	Cases (n=80)	Controls (n=188)
Risperidone	2	47 (60%)	83 (44%)
Haloperidol	3	13 (16%)	9 (4%)
Clozapine	1	1 (1%)	24 (12%)
Amisulpride	2	3 (3%)	1 (0.5%)
Olanzapine	1	3 (3%)	32 (16%)
Zuclopentixol	2	5 (6%)	1 (0.5%)
Ziprasidone	1	4 (5%)	10 (5%)
Quetiapine	1	1 (1%)	24 (12%)
LAIR	2	1 (1%)	1 (0.5%)
Trifluoperazine	3		1 (0.5%)
<b>CEDD<sup>3,4</sup></b>			
Low dose		142.7 $\pm$ 48 (n=9; 12%)	162.7 $\pm$ 48 (n=58; 31%)
Medium dose		296.6 $\pm$ 30 (n=36; 49%) <sup>5</sup>	290.7 $\pm$ 33 (n=68; 37%) <sup>5</sup>
High dose		564.3 $\pm$ 158 (n=29; 38%) <sup>5</sup>	547.1 $\pm$ 147 (n=57; 30%) <sup>5</sup>
Total		382.8 $\pm$ 184 (n=74) <sup>6</sup>	329 $\pm$ 179 (n=183) <sup>6</sup>
<b>EPS<sup>7</sup></b>			
Dystonia		12 (24%)	
Rigidity		9 (18%)	
Tremor		1 (2%)	
Bradykinesia		27 (54%)	
Dyskinesia		1 (2%)	

<sup>1</sup>2 cases and 2 controls missing <sup>2</sup>AP-EPS potency calculated as described in Materials and methods <sup>3</sup>CEDD calculated as described in Materials and methods <sup>4</sup>6 cases and 5 controls missing because no AP, no dose or no conversion available; <sup>5</sup>ANOVA  $P<0.001$ ; <sup>6</sup> $P=0.03$ ; <sup>7</sup>30 cases with described but not specified EPS.

Table 2  
Descriptive and multivariate analysis of A) the AP dosage dependent risk for EPS; B) the AP–EPS potency dependent risk for EPS

	All AP treated patients			Schizophrenia			Bipolar disorders		
	EPS <i>n</i> =80	No EPS <i>n</i> =188		EPS <i>n</i> =49	No EPS <i>n</i> =146		EPS <i>n</i> =22	No EPS <i>n</i> =20	
A) CEDD <sup>1</sup> <i>n/N</i> (%)									
Low	10/76 (13.1)	58/184 (31.5)		6/46 (13)	45/143 (31.4)		3/21 (14.3)	2/20 (10)	
Medium	37/76 (48)	69/184 (37.5)		25/46 (54.3)	55/143 (38.4)		7/21 (33.3)	9/20 (45)	
High	29/76 (38.1)	57/184 (31)		15/46 (32.6)	43/143 (30)		11/21 (52.4)	9/20 (45)	
	OR	CI	<i>P</i>	OR	CI	<i>P</i>	OR	CI	<i>P</i>
Medium	3.1	1.4–6.8	0.004	3.4	1.3–9	0.014	0.51	0.6–4	0.5
High	2.9	1.3–6.6	0.009	2.6	0.9–7.4	0.069	0.81	0.11–5.9	0.8
B) AP–EPS Potency <sup>2</sup> <i>n/N</i> %									
Low	9/78 (11.5)	90/186 (48.4)		5/47 (10.6)	69/145 (47.6)		4/21 (19.1)	6/20 (30)	
Medium	56/78 (71.7)	86/186 (46.2)		34/47 (72.3)	68/145 (46.7)		14/21 (66.6)	12/20 (60)	
High	13/78 (16.6)	10/186 (5.3)		8/47 (17.1)	8/145 (5.5)		3/21 (14.3)	2/20 (10)	
	OR	CI	<i>P</i>	OR	CI	<i>P</i>	OR	CI	<i>P</i>
Medium	6.4	2.9–13.7	0.000	6.9	2.5–18.7	0.000	1.7	0.4–7.7	0.4
High	13	4.4–37.9	0.000	13	3.6–52.4	0.000	2.2	0.2–20.1	0.4

<sup>1</sup>4 cases and 4 controls missing because no AP or dose information; <sup>2</sup>2 cases and 2 controls missing because no AP information.

1995). The PCR product was digested with *TaqI* restriction enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for the *TaqIA* and *TaqIB* polymorphisms.

#### 2.4.2. –141 C *Ins/Del* genotyping

The genomic sequence of 304 pb of the 5'-flanking region of the *DRD2* gene was amplified using the primer

Table 3

Descriptive distribution of genotypes and allele frequencies studied in cases (EPS) and controls (No-EPS), and multivariate analysis of the different alleles (*TaqIA*, –141 C *Ins/Del*, and *COMT* A-278G,G158A) dependent risk for EPS

	Cases <i>n/N</i> (%)	Control <i>n/N</i> (%)	Multivariate analysis <sup>2,3</sup>		
			OR	CI	<i>P</i>
<i>TaqIA/IB</i> <sup>1</sup>					
Homozygote <i>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub></i> /total	2/80 (2.5)	3/188 (1.5)	0.9	0.1–7.7	0.9
Heterozygote <i>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub></i> /total	27/80 (33.7)	68/188 (36.1)	0.7	0.4–1.5	0.4
Allele <i>A<sub>1</sub></i> frequency	31/160 (19.3)	74/376 (19.6)	0.8	0.45–1.5	0.5
–141 C <i>Ins/Del</i>					
Homozygote <i>DelDel</i> /total	–	–	–	–	–
Heterozygote <i>InsDel</i> /total	14/80 (17.5)	24/188 (12.7)	0.9	0.4–2.1	0.8
Allele <i>Del</i> frequency	14/160 (8.7)	24/376 (6.3)	0.9	0.4–2.1	0.8
<i>COMT</i> G158A					
Homozygote <i>COMT<sup>LL</sup></i> /total	13/80 (16.2)	38/188 (20.2)	0.4	0.2–1.3	0.1
Heterozygote <i>COMT<sup>LH</sup></i> /total	36/80 (45)	103/188 (54.8)	0.4	0.2–0.9	0.04 <sup>4</sup>
Allele <i>COMT<sup>L</sup></i> frequency	62/160 (38.7)	179/376 (47.6)	0.6	0.4–1	0.07
<i>COMT</i> A-278G					
Homozygote <i>COMT<sup>GG</sup></i> /total	14/80 (17.5)	36/188 (19.1)	0.9	0.4–2.1	0.8
Heterozygote <i>COMT<sup>AG</sup></i> /total	29/80 (36.2)	81/188 (43.1)	0.6	0.3–1.3	0.2
Allele <i>COMT<sup>G</sup></i> frequency	57/160 (35.6)	153/376 (40.6)	0.8	0.6–1.3	0.5

<sup>1</sup>*TaqIA* and *TaqIB* showed linkage disequilibrium. Same results were obtained for both polymorphisms. <sup>2</sup>Each analysis is an independent multivariate adjusted by age, dosage (CEDD including categories for LAIR and Amisulpride) and AP–EPS potency. <sup>3</sup>Polytomous analysis for genotypes. <sup>4</sup>Nonsignificant after Bonferroni's correction.

Table 4

Analysis of the COMT<sup>L</sup> allele and genotype dependent risk for EPS in 1) schizophrenia patients; and 2) bipolar disorders patients

	1) Schizophrenia <sup>1</sup>				
	Cases n/N (%)	Controls n/N (%)	OR	CI	P
<sup>2</sup> COMT <sup>L</sup> Homozygote	11/49 (22.4)	27/146 (18.4)	1.0	0.3–3.3	0.5
<sup>2</sup> COMT <sup>LH</sup> Heterozygote	23/49 (46.9)	82/146 (56.1)	0.7	0.3–1.9	0.9
COMT <sup>L</sup> Allele	45/98 (45.9)	136/292 (46.5)	0.9	0.5–1.7	0.9
	2) Bipolar disorder				
	Cases n/N (%)	Controls n/N (%)	OR	CI	P
<sup>2</sup> COMT <sup>L</sup> Homozygote	2/22 (9)	7/20 (35)	0.09	0.0–0.6	0.01 <sup>3</sup>
<sup>2</sup> COMT <sup>LH</sup> Heterozygote	8/22 (36.3)	9/20 (45)	0.2	0.0–1.3	0.1
COMT <sup>L</sup> Allele	12/44 (27.2)	23/40 (57.5)	0.3	0.1–0.8	0.01 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Adjusted by age, dosage (CEDD including categories for LAIR and Amisulpride) and AP–EPS potency. <sup>2</sup>Polytomic analysis. <sup>3</sup>Significant after Bonferroni's correction.

pair 5'-ACTGGCGAGCAGACGGTGAGGACCC and 5'-TGCGCGCGTGAGGCTGCCGGTTCGG (Arinami et al., 1997). The PCR product was digested with *Bst*NI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

#### 2.4.3. COMT G158A genotyping

A 237 bp fragment of the COMT gene including the polymorphism was first amplified by PCR using the primer 5'-TACTGTGGCTACTCAGCTGTGC and 5'-GTGAACGTGGTGTGAACACC (Mas et al., 2003). The PCR were digested with *Nla*III (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

#### 2.4.4. COMT -278A/G genotyping

DNA was amplified with the primers 5'-TAG TAA CAG ACTGGG CAC GAA and 5'-GTT CAA AGG GCATTT ATCATG (Norton et al., 2002). The PCR product was digested with *Hind*III (New England Biolabs, Ipswich, MA).

#### 2.5. Statistics

Data were analyzed using SPSS11.01 (statistical analysis software). Sample sizes were established on the basis of control genotype frequencies from previous studies of

Caucasian samples. Calculations assumed a 5% level of significance, 80% power and an EPS risk of 2 associated with carrying the studied allele. Means and standard deviations were computed for continuous variables. Univariate analysis was used to identify clinical factors associated with EPS. Multivariate analyses (multiple logistic regression) were used to estimate the independent contribution of each variable identified through univariate analysis to the risk of EPS. Confidence limits for the adjusted odds ratio were calculated with the associated logistic coefficients and standard errors. We used Bonferroni's correction for multiple testing in the analysis of the alleles and genotypes, taking into account that we analyzed four polymorphisms (TaqIA and TaqIB were in complete linkage disequilibrium, and we only analyzed the TaqIA associated risk) in two loci (DRD2 and COMT). Taking this correction into consideration,  $P=0.01$  was considered statistically significant. The linkage disequilibrium analyses were performed with the genetics package of the R statistical software (version 2.4.0). Haplotypes for the COMT gene were estimated from the unphased genotypes, and their frequencies were calculated using the expectation-maximization (EM) algorithm in the *haplo.stats* package of the statistical software R. Haplotype associations were explored using

Table 5

COMT haplotype percentages and haplotype-specific P values

COMT alleles		All			Schizophrenia			Bipolar disorders		
A-278G	G158A	No-EPS	EPS	P <sup>1</sup>	No-EPS	EPS	P <sup>1</sup>	No-EPS	EPS	P <sup>1</sup>
A	G	39.3	48.3	0.04 <sup>2</sup>	40.3	46.5	0.23	31.1	53.7	0.03 <sup>3</sup>
A	A	19.7	15.9	0.29	19.8	21.0	0.78	18.9	1.1	0.006 <sup>4</sup>
G	G	13.1	12.2	0.77	13.3	8.5	0.16	11.4	22.5	0.18
G	A	27.9	23.6	0.29	24.0	24.0	0.57	38.6	22.7	0.09

<sup>1</sup>Haplotype-specific P values. <sup>2</sup>Permuted P value 0.12. <sup>3</sup>Permuted P value 0.09. <sup>4</sup>Permuted P value 0.01.

score tests that account for linkage phase ambiguity provided in *haplo.stats*. In the haplotype analysis we used permutations (10,000 cycles) to correct for multiple testing, using the Haploview 3.2 program (Barrett et al., 2005).

### 3. Results

The psychiatric diagnostic of cases (patients treated with APs who presented with EPS) revealed 69% of the patients with schizophrenia or related disorders and 30% with bipolar disorder. In the control group (patients treated with APs without EPS), 87.9% were diagnosed as schizophrenia patients and 12% as bipolar disorder patients. The cases and the controls had similar distribution in terms of gender and smoking patterns, or substance abuse. Age was significantly different between cases ( $32.6 \pm 13$ ) and controls ( $37.6 \pm 16$ ) in the overall ( $P=0.01$ ) and in the schizophrenia subgroup (cases  $29.7 \pm 9$ ; controls  $35.1 \pm 14$ ;  $P=0.02$ ), but not among the bipolar disorder patients (cases  $38.05 \pm 18$ ; controls  $45.06 \pm 18$ ). This difference compelled us to adjust the multivariate analysis for this factor.

Table 1 shows the different EPS in the cases group, bradykinesia being the most prevalent form, followed by dystonia. As shown in Table 1 patients received different AP treatments. Distributions of different APs between cases and controls and between schizophrenia and bipolar disorder patients were similar. Table 1 also shows the mean and standard deviation of the AP dosage calculated as CEDD and categorized in three subgroups (low, medium, high). Table 2 shows a multivariate analysis of the AP dosage and AP–EPS potency dependent risk for EPS. Differences were observed in dosage and AP–EPS potency between patients presenting or not presenting EPS when all the patients were analyzed together and in the schizophrenia subgroup.

The genotype and allele frequencies of the various genetic polymorphisms studied (TaqIA, TaqIB, –141 C Ins/Del for DRD2 gene; G158A and A-278G for COMT gene) in cases and controls are shown in Table 3. Linkage disequilibrium (LD) between the polymorphisms of the DRD2 and COMT genes was assessed in cases and controls *via* Lewontin's  $D'$  statistic. Taq IA and TaqIB were in complete LD ( $D'=1$ ). TaqIB and TaqIA showed modest LD with –141 C Ins/Del ( $D'=0.53$  and  $D'=0.56$ , respectively). No LD was observed between the two COMT markers ( $D'=0.4$  in the overall group;  $D'=0.41$  in the schizophrenia group;  $D'=0.53$  in the bipolar disorder group). To explore potential associations of these alleles with EPS, we used multivariate analysis, adjusted by categorized dosage,

AP–EPS potency and age, as shown also in Table 3. No significant differences were observed in the susceptibility to AP-induced EPS among the different alleles of the DRD2 gene (TaqIA, TaqIB, –141 C Ins/Del). However, the COMT G158A polymorphism was associated with EPS susceptibility. The COMT<sup>L</sup> allele conferred to heterozygotes (OR 0.4,  $P=0.04$ ) a reduction of EPS risk of 60%. After Bonferroni's correction for multiple allele testing, this association was nonsignificant.

We stratified the patients, cases and controls, into two groups on the basis of their diagnosis: 1) schizophrenia and related disorders and 2) bipolar disorders. As shown in Table 4, the association between the COMTG158A polymorphism and EPS disappeared in the schizophrenia group but remained strong in the minority bipolar disorders group. In those patients the COMT<sup>L</sup> allele conferred a reduction of EPS risk of 70% (OR 0.3,  $P=0.01$ ). This association remained significant after adjustment for multiple allele testing using Bonferroni's correction.

The various polymorphisms of the DRD2 gene and the COMT A-278G showed no significant differences in the susceptibility to AP-induced EPS in the two groups: schizophrenia (TaqIA<sub>1</sub> allele, OR 1.0,  $P=0.9$ , CI 0.53–1.94; –141 C Del allele, OR 0.9  $P=0.9$ , CI 0.35–2.6; COMT -278G allele OR 1.1,  $P=0.6$ , CI 0.6–1.9) and bipolar disorders (TaqIA<sub>1</sub> allele, OR 0.3,  $P=0.1$ , CI 0.08–1.3; –141 C Del allele, OR 0.3,  $P=0.3$ , CI 0.06–2.6; COMT -278G allele OR 0.4,  $P=0.1$ , CI 0.1–1.4).

We have inferred four different haplotypes from the COMT genotype data of our sample (Table 5). Haplotype A–G was significantly overrepresented in the No-EPS group ( $P=0.04$ ) and could provide protection. After correction for multiple comparisons, this association remained significant only in the bipolar disorder group ( $P=0.03$ ). The opposite haplotype (G–A) was overrepresented in the bipolar cases group and could be considered a risk factor, although the differences were not significant ( $P=0.09$ ). Haplotype A–A, with the thermolabile form of COMT, was significantly different in the bipolar subgroup ( $P=0.006$ ) in a similar manner to when the genotypes were analyzed alone (COMT<sup>L</sup> allele). However, after multiple test correction by permutations, these differences remained significant only for the A–A haplotype in the bipolar disorder group.

### 4. Discussion

Pharmacogenetics studies in psychopharmacology entail complex trials due to the multiplicity of diagnoses, treatments and dosage used, and to the large number of confounding factors (duration of treatment, concomitant

medication, previous medication, and compliance). Therefore, the recruitment of homogeneous participants for these studies is a complex process. Ours is a prospective cohort study in which the patients were recruited at the moment of admission to our Hospital. In order to make our population more homogeneous, we excluded patients receiving anticholinergic treatment, antidepressants or mood stabilizers. To avoid the interference of previous medication, the inpatients were, at the time of admission, observed for 48 h (without AP medication). The inclusion criteria included a minimum of 15 days of treatment, which allowed us to identify acute EPS. Compliance was monitored in accordance with established nursing protocols. In the present study several medications were used, at several doses. In this situation, dose equivalence estimations are applied in the statistical analysis to homogenize the data. Dose equivalences for typical and atypical antipsychotic drugs, using chlorpromazine-equivalents, are commonplace in psychopharmacology, and have been used in several pharmacogenetic studies (Murray, 2006; Ozdemir et al., 2006). Furthermore, we categorized the CEDD values in three groups (high, medium and low dosage) as described previously (Lafuente et al., 2007), to adjust the statistical analysis for this new variable.

The COMT polymorphism has been widely studied as a susceptibility gene for both schizophrenia risk and AP-induced adverse effects, both because of its role in monoamine metabolism and because the main genetic variant associated is functional.

This functional polymorphism has been examined in schizophrenia patients with TD (Herken et al., 2003; Matsumoto et al., 2004; Lai et al., 2005) and in relation to EPS susceptibility with negative results (Inada et al., 2003). The COMT<sup>L</sup> carriers metabolize dopamine more slowly than the homozygotes for the normal allele, and these individuals may therefore have greater dopamine availability. In this situation, the AP would have to compete with a greater amount of dopamine for the occupancy of the DRD2 and would therefore be less likely to cause EPS. Therefore, the COMT<sup>L</sup> allele may act as a protective factor for EPS.

In animal models dopamine methylation *via* COMT has an important role in prefrontal dopamine metabolism in the cortex, but less so in the striatum, where EPS are generated (Karoum et al., 1994; Huotari et al., 2002). Prefrontal dopamine postsynaptic inactivation seems to occur primarily *via* diffusion and methylation by COMT. In both humans and rats, Matsumoto et al. (2003) showed higher densities of COMT mRNA in the prefrontal cortex than in the striatum. These results are consistent with other immunochemical data showing that

low levels of COMT protein were detected in dopaminergic nerve terminals in the striatum (Kastner et al., 1994). The synaptic action of dopamine in the striatum is terminated primarily by transporter reuptake into presynaptic terminals and recycling into secretory vesicles (Giros et al., 1996). In the cortex, in contrast, dopamine transporters appear to play little role in dopamine reuptake (Mazei et al., 2002) and are only weakly expressed (Sesack et al., 1998).

Consistent with the hypothesis of abnormal prefrontal dopamine signaling in schizophrenia, the COMT G158A genotype has been correlated with prefrontal cortex function (Egan et al., 2001; Malhotra et al., 2002; Rosa et al., 2002). Given the effect of the COMT genotype on prefrontal information processing, which regulates striatal dopamine activity (*vide supra*) (Carr and Sesack, 2000), this polymorphism may also influence the activity of striatally projecting dopamine neurons, and thus EPS susceptibility.

Therefore, the COMT genotype may contribute to AP-induced EPS risk not only because of its biological effects on dopamine availability in the synaptic cleft, but also because of indirect and complex downstream effects on dopamine regulation between the prefrontal cortex and the striatum.

When our populations were stratified by diagnosis, the COMT dependent risk in the bipolar subgroup remained with the same strength. The COMT polymorphism has been identified as a common susceptibility gene for both, bipolar disorder and schizophrenia (Shifman et al., 2004). Linkage and epidemiological findings have led to the suggestion that the genetic models of schizophrenia and bipolar disorder could overlap (Maier et al., 2005). However, the literature suggests that patients with bipolar disorders have a higher risk of developing acute EPS and TD than patients with schizophrenia when they are treated with AP (McIntyre and Konarski, 2005; Cavazzoni et al., 2006). In this subgroup neither the dose nor the type of drug had the same influence on the risk for EPS as that found in the general group or in the schizophrenia group. This indicates there may be different risk factors in the bipolar disorder patients, such as dopamine availability. According to the dopaminergic theory for schizophrenia (Weinberger, 2003), there may be an excess of dopamine in the brains of schizophrenia patients, including the striatum, where EPS are generated. In these patients, the possible differences in dopamine metabolism induced by the COMT genetic polymorphism may not be crucial because of their dopamine excess. Conversely, in bipolar disorders where dopamine may not be in excess in the brain, slight variations in dopamine metabolism may be critical. In these patients, the COMT polymorphism could contribute to the EPS risk. However, data on AP-induced

EPS, especially with atypical APs, in bipolar disorders are still limited, since AP therapy has been applied only recently in mood disorders.

The frequencies of the four COMT haplotypes inferred in our study are consistent with those obtained by Funke et al. (2005) in a similar psychiatric Caucasian population. The haplotype analyses revealed an association of the A–G haplotype (with the two normal alleles for the COMT A-278G and COMT G158A polymorphisms) and risk of developing EPS. Conversely, the A–A haplotype (with the normal variant for the COMT A-278G and the defective allele for the COMT G158A) was associated with EPS protection in the bipolar disorder subgroup. The G–A haplotype with the two defective alleles was predominant in the No EPS group of bipolar disorder patients, although the differences were not significant. This is interpreted as showing that the “G” allele of the COMT G158A polymorphism is the main factor responsible for EPS risk, whereas the “A” allele of the COMT A-278G polymorphism does not appear to modulate the EPS risk. In addition, the  $D'$  values show low LD between both markers. In this situation the probability of recombination between the two polymorphisms is high, which would explain their mutual independence.

Our results are in agreement with those reported in a recent study with a Spanish population (Molero et al., 2007). Their results show an influence of the COMT G158A polymorphism on the psychotic symptomatology of schizophrenia and the response to the treatment. Briefly, the COMT 158A allele was associated with a worse response to treatment. Although they analyze other polymorphisms in the COMT gene, including one close to the COMT A-278G (also with low LD with the COMT G158A), the COMT G158A polymorphism has the greater influence on the AP response (Molero et al., 2007).

In our study, age is a protective factor for EPS. PET receptor studies demonstrated a relation between the blockage of dopamine D2 receptors and incidence of EPS and a significant relationship between the number of these D2 receptors and age (Lewis, 1998). Therefore, lower age is described as a risk factor for AP-induced EPS, which was confirmed in our study, although the mean differences between the cases ( $\bar{x}=32.6$ ) and the controls ( $\bar{x}=37.6$ ) were minimal.

In addition to age, dosage and DRD2 affinity are well-known risk factors for AP-induced EPS (Weiden, 2007). In our study, higher dosage, categorized as chlorpromazine-equivalent daily dose (CEDD), and DRD2 affinity, categorized as AP–EPS potency, were identified as risk factors for AP-induced EPS.

We did not find any association between the genetic polymorphism in the DRD2 gene (TaqIA, TaqIB and –141 C Ins/Del) and AP-induced EPS. Our initial hypothesis assumed a greater risk for EPS in patients with lower striatal DRD2 density (TaqIA, TaqIB) *versus* patients with high density (–141 C Ins/Del). However, our results could be attributable to other causes;

- We based our hypothesis on genotype–phenotype studies which were done in healthy patients, and we could not extrapolate this to schizophrenia patients. In fact, in schizophrenia patients, an excess of DRD2 has been described in the caudate but not in the striatal form,
- AP-induced EPS could be influenced by blockage of another D2-like receptor (D3 or D4),
- Drug availability could be more important for EPS susceptibility than the availability of dopaminergic receptors. In fact, the association of the EPS with the dosage reported in this study indicates this may be the case.

Furthermore, association studies between the DRD2 polymorphism and risk of EPS susceptibility generated conflicting results. Mihara et al. (2001) found no influence of the –141 C Ins/Del polymorphism on the occurrence or severity of EPS effects in 52 Japanese schizophrenia patients treated with bromoperidol or nemonapride. On the other hand, Inada et al. (1999) have reported that the frequency of the Del allele tends to be higher in schizophrenia patients who developed EPS. Similarly, in a recent study of 19 schizophrenia patients, Nakazono et al. (2005) concluded that risk of EPS may be increased in patients with the –141 C Del allele. However, Kaiser et al. (2002), in a cohort study of 655 patients with schizophrenia, found no association between several DRD2 polymorphisms (–141 C Ins/Del, TaqIA, TaqIB, TaqID, Val96Ala, Pro310Ser, Ser311Cys, G423A) and EPS symptoms, Abnormal Involuntary Movement Scale scores, akathisia and acute dystonia. With regard to the TaqIA polymorphism, Mihara et al. (2000) have reported that the allele A1 is not associated with the incidence of EPS.

This is the first time that an association between the COMT polymorphism and EPS susceptibility has been reported. To date, the COMT polymorphism has been examined in schizophrenia patients with TD but not in relation to EPS susceptibility (Herken et al., 2003; Matsumoto et al., 2004; Lai et al., 2005). Our results suggest that both drug availability and dopamine availability are risk factors for AP-induced EPS. In agreement with these results, pharmacogenetic studies

conducted to analyze polymorphisms in genes responsible for dopamine metabolism (COMT) or AP drug metabolism (CYP2D6 and CYP3A4) will be useful.

The present study increases our understanding of the adverse effects discussed and of schizophrenia and bipolar disorders *per se*. Although the group of patients studied (without antidepressant treatment) may not be representative of all patients, our results should be considered and borne in mind, if we take into account the increased use of AP drugs in bipolar patients in both the acute manic and the depressive phases. Mood stabilizers such as lithium or valproic acid are used as first-line therapy for treatment of acute mania. However, surveys of treatment practices for acute mania suggest that up to 90% of patients with acute mania are treated with a combination of mood stabilizers and APs (Miller et al., 2001). On the other hand, bipolar depression has traditionally been treated with medications known to be effective for unipolar depression, such as conventional antidepressants (serotonin reuptake inhibitors, bupropion, serotonin–norepinephrine reuptake inhibitors). However, due to the suspected risk of induction of manic switch or rapid cycling, antidepressants are not recommended as monotherapy for acute or long-term treatment of bipolar depression. Treatment options include AP drugs, especially atypical AP (Berk and Dodd, 2005; Calabrese et al., 2005). We should bear in mind that patients with mood disorders are more at risk for EPS than schizophrenia patients (McIntyre and Konarski, 2005; Cavazzoni et al., 2006). Therefore, the reduction of EPS risk for the COMT<sup>L</sup> allele carriers is crucial clinical information for the management of EPS in bipolar disorders.

### Acknowledgements

The authors thank Esther Planas for help in the recruitment of patients, and the Language Advisory Service at the University of Barcelona, Spain for manuscript revision. This study was supported by the Spanish Ministry of Health, Instituto Carlos III, RETICS; Red de Enfermedades Mentales (REM-TAP NetworkRD06/0011/06-05); DURSI GRC2005SGR00039 and Catalonia Marato TV3 Foundation, 2002.

### References

- American Psychiatric Association, 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. APA, Washington, DC.
- Arinami, T., Gao, M., Hamaguchi, H., Toru, M., 1997. A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Human Molecular Genetics* 6, 577–582.
- Baldessarini, R.J., Tarazi, F.K., 2001. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: psychosis and mania. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman Gilman, A. (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Ed. McGraw-Hill, New York, pp. 485–521.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.
- Berk, M., Dodd, S., 2005. Efficacy of atypical antipsychotics in bipolar disorder. *Drugs* 65, 257–269.
- Calabrese, J.R., Elhaj, O., Gajwa, N.J., Gao, K., 2005. Clinical highlights in bipolar depression; focus on atypical antipsychotics. *Journal of Clinical Psychiatry* 66 (suppl 5), 26–33.
- Carr, D.B., Sesack, S.R., 2000. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral segmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of Neuroscience* 20, 3864–3873.
- Castiglione, C.M., Deiard, A.S., Speed, W.C., Sirugo, G., Rosenbaum, H.C., Zhang, Y., Grandy, D.K., Grigorenko, E.L., Bonne-Tamir, B., Pakstis, A.J., 1995. Evolution of haplotypes at the DRD2 locus. *American Journal of Human Genetics* 57, 1445–1456.
- Cavazzoni, P.A., Berg, P.H., Kryzhanovskaya, L.A., Driggs, S.D., Roddy, T.E., Tohen, M., Kane, J.M., 2006. Comparison of treatment emergent extrapyramidal symptoms in patients with bipolar mania or schizophrenia during olanzapine clinical trials. *Journal of Clinical Psychiatry* 67, 107–113.
- Chen, J., Lipska, B.K., Halim, N., Ma, Q.D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B.S., Hyde, T.M., Herman, M.M., Apud, J., Egan, M.F., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2004. Functional analysis of genetic variation in catechol-*o*-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *American Journal of Human Genetics* 75, 807–821.
- Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Mazzanti, C.M., Straub, R.E., Goldman, D., Weinberger, D.R., 2001. Effect of COMT Val108/158Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, vol. 98, pp. 6917–6922.
- Fan, J.B., Zhang, C.S., Gu, N.F., Li, X.W., Sun, W.W., Wang, H.Y., Feng, G.Y., StClair, D., He, L., 2005. Catechol-*o*-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia; a large scale association study plus meta analysis. *Biological Psychiatry* 57, 139–144.
- Farde, L., Nordström, A.L., Wiesel, F.A., Pauli, S., Halldin, C., Sedvall, G., 1992. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptors occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Archives of General Psychiatry* 49, 538–544.
- Flórez, J., 2003. Fármacos antipsicóticos neurolepticos. In: Flórez, J. (Ed.), *Farmacología humana*, fourth ed. Masson, Barcelona, pp. 563–579.
- Funke, B., Malhotra, A.K., Finn, C.T., Plocik, A.M., Lake, S.L., Lenz, T., DeRosier, P., Kane, J.M., Kucherlapati, R., 2005. COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: a case control study. *Behavioral Brain Functions* 1, 19.
- Gardner, D.M., Baldessarini, R.J., Warach, P., 2005. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *Canadian Medical Association Journal* 172, 1703–1711.
- Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking dopamine transporter. *Nature* 379, 606–612.
- Glatt, S.J., Faraone, S.V., Tsuang, M.T., 2003. Association between a functional catechol-*o*-methyltransferase gene polymorphism and

- schizophrenia; meta-analysis of case-control and family based studies. *American Journal of Psychiatry* 160, 469–476.
- Herken, H., Erdal, M.E., Broke, O., Savas, H.A., 2003. Tardive dyskinesia is not associated with the polymorphism of 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene, serotonin transporter gene, and catechol-*o*-methyltransferase gene. *European Psychiatry* 18, 77–81.
- Huotari, M., Santha, M., Lucas, L.R., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., Mannisto, P.T., 2002. Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-*o*-methyltransferase-disrupted mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303 (3), 1309–1316.
- Inada, T., Arinami, T., Yagi, G., 1999. Association between a polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia in Japanese subjects; replication and evaluation for antipsychotic related features. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2, 181–186.
- Inada, T., Nakamura, A., Iijima, Y., 2003. Relationship between catechol-*o*-methyltransferase polymorphism and treatment resistant schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics* 120B, 35–39.
- Jönsson, E.G., Nothen, M.M., Grunhage, F., Farde, L., Nakashima, Y., Propping, P., Sedvall, G.C., 1999. Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Molecular Psychiatry* 4, 290–296.
- Kaiser, R., Treblay, P.B., Klufmoller, F., Roots, I., Brockmoller, J., 2002. Relationship between adverse effects of antipsychotic treatment and dopamine D2 receptor polymorphism in patients with schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 7, 695–705.
- Kapur, S., Zipursky, R.B., Remington, G., 1999. Clinical and theoretical implications of 5-HT<sub>2</sub> and D2 receptor occupancy of clozapine olanzapine and risperidone in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 156, 286–293.
- Kapur, S., Zipursky, R.B., Remington, G., Jones, C., DaSilva, J., Wilson, A.A., Houle, S., 1998. 5-HT<sub>2</sub> and D2 receptor occupancy of olanzapine in schizophrenia; a PET investigation. *American Journal of Psychiatry* 155, 921–928.
- Karoum, F., Chrapusta, S.J., Egan, M.F., 1994. 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex; reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. *Journal of Neurochemistry* 63, 972–979.
- Kastner, A., Anglade, P., Bounaïx, C., Daimer, P., Javoy-Agid, F., Bromet, N., Agid, Y., Hirsch, E.C., 1994. Immunohistochemical study of catechol-*o*-methyltransferase in the human mesostriatal system. *Neuroscience* 62, 449–457.
- Lafuente, A., Bernardo, M., Mas, S., Crescenti, A., Aparici, M., Gassó, P., Catalan, R., Mateos, J.J., Lomeña, F., Parellada, E., 2007. Dopamine transporter (DAT) genotype (VNTR) and phenotype in extrapyramidal symptoms induced by antipsychotics. *Schizophrenia Research* 90, 115–122.
- Lai, I.C., Wang, Y.C., Lin, C.C., Bai, Y.M., Liao, D.L., Yu, S.C., Lin, C.Y., Chen, J.Y., Liou, Y.J., 2005. Negative association between catechol-*o*-methyltransferase (COMT) gene Val158Met polymorphism and persistent tardive dyskinesia in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission* 112, 1107–1113.
- Laruelle, M., Gelemer, J., Innis, R., 1998. D2 receptor binding potential is not affected by Taq1A polymorphism at the D2 receptor gene. *Molecular Psychiatry* 3, 261–265.
- Lewis, R., 1998. Typical and atypical antipsychotics in adolescent schizophrenia: efficacy, tolerability, and differential sensitivity to extrapyramidal symptoms. *Canadian Journal of Psychiatry* 43, 596–604.
- Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melen, K., Julkunen, I., Taskinen, J., 1995. Kinetics of human soluble and membrane bound catechol-*o*-methyltransferase; a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34, 4202–4210.
- Maier, W., Höfgen, B., Zobel, A., Rietschel, M., 2005. Genetic models of schizophrenia and bipolar disorder: overlapping inheritance or discrete genotypes? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 255, 159–166.
- Malhotra, A.K., Kestker, L.J., Mazzanti, C., Bates, J.A., Goldberg, T.E., Goldman, D., 2002. A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *American Journal of Psychiatry* 159, 652–654.
- Mas, S., Laso, N., Lafuente, M.J., Lafuente, A., Molina, R., Ballesta, A., Zheng, S., Wiencke, J.K., 2003. Cancer, genes and catechol estrogen metabolites. *International Journal of Clinical Oncology* 8, 65–66.
- Matsumoto, C., Shannon Weickert, C., Akil, M., Lipska, B.K., Hyde, T.M., Herman, M.M., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2003. Catechol-*o*-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 116, 127–137.
- Matsumoto, C., Shinkai, T., Hori, H., Ohmori, O., Nakamura, J., 2004. Polymorphism of dopamine degradation enzyme (COMT and MAO) genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research* 127, 1–7.
- Mazei, M.S., Pluto, C.P., Kirkbride, B., Pehek, E.A., 2002. Effects of catecholamines uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Research* 936, 58–67.
- McIntyre, R.S., Konarski, J.Z., 2005. Tolerability profiles of atypical antipsychotics in the treatment of bipolar disorders. *Journal of Clinical Psychiatry* 66 (suppl 3), 28–36.
- Mihara, K., Kondo, T., Suzuk, A., Yashi, N., Ono, S., Otani, K., Kaneko, S., 2001. No association between -141 C Ins/Del polymorphism in the promoter region of dopamine D2 receptor and extrapyramidal adverse effects of selective dopamine D2 antagonists in schizophrenia patients; preliminary study. *Psychiatry Research* 101, 117–123.
- Mihara, K., Suzuki, A., Kondo, T., Nagashima, U., Ono, S., Otani, K., 2000. No relationship between Taq1A polymorphism of dopamine D2 receptor gene and extrapyramidal adverse effects of selective D2 antagonists, bromoperidol and nemonapride in schizophrenia; a preliminary study. *American Journal of Medical Genetics* 96, 422–424.
- Miller, D.S., Lakshmi, N.Y., Lam, R.W., 2001. Comparative efficacy of typical and atypical antipsychotics as add on therapy to mood stabilizers in the treatment of acute mania. *Journal of Clinical Psychiatry* 62, 975–980.
- Miyamoto, S., Duncan, G.E., Marx, C.E., Lieberman, J.A., 2005. Treatment of schizophrenia; a critical review of pharmacology and mechanism of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry* 10, 79–104.
- Molero, P., Ortuño, F., Zalacain, M., Patiño-García, A., 2007. Clinical involvement of catechol-*o*-methyltransferase polymorphisms in schizophrenia spectrum disorders: influence on the severity of psychotic symptoms and on the response to neuroleptic treatment. *Pharmacogenomics Journal* 7, 418–426.
- Murray, M., 2006. Role of CYP pharmacogenetics and drug–drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 871–885.
- Nakazono, Y., Abe, H., Murakami, H., Koyabu, N., Isaka, Y., Nemoto, Y., Murata, S., Tsutsumi, Y., Ohtani, H., Sawada, Y., 2005. Association between neuroleptic drug-induced extrapyramidal symptoms and

- dopamine D2 receptor polymorphisms in Japanese schizophrenic patients. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 43, 163–171.
- Noble, E.P., Joor, S.T., Ritchie, T., Syndulko, K., Joor, S.C., Fitch, R.J., Brunner, R.L., Sparkes, R.S., 1994. D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? *Medical Hypotheses* 42, 257–260.
- Norton, N., Kirov, G., Zammit, S., Jones, G., Jones, S., Owen, R., Krawczak, M., Williams, N.M., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., 2002. Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. *American Journal of Medical Genetics* 114, 491–496.
- Ozdemir, V., Aklillu, E., Mee, S., Bertilsson, L., Albers, L.J., Graham, J.E., Caligiuri, M., Lohr, J.B., Reist, C., 2006. Pharmacogenetics for off-patent antipsychotics: reframing the risk for tardive dyskinesia and access to essential medicines. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 7, 119–133.
- Owen, M.J., Williams, N.M., O'Donovan, M.C., 2004. The molecular genetics of schizophrenia; new findings promise new insights. *Molecular Psychiatry* 9, 14–27.
- Palmatier, M.A., Pakstis, A.J., Speed, W., Paschou, P., Goldman, D., Odunsi, A., Okonofua, F., Kajuna, S., 2004. COMT haplotypes suggest P2 promoter region relevance for schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 9, 859–870.
- Pohjalainen, T., Rinne, J.O., Nagren, K., Lehtikoinen, P., Anttila, K., Syvalahti, E.K., Hietala, J., 1998. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Molecular Psychiatry* 3, 256–260.
- Reenila, I., Mannisto, P.T., 2001. Catecholamine metabolism in the brain by membrane-bound soluble catechol-*o*-methyltransferase (COMT) estimated by enzyme kinetic values. *Medical Hypotheses* 57, 628–632.
- Remington, G., Kapur, S., 1999. D2 and 5HT2 receptor effects of antipsychotic; bridging basic and clinical findings using PET. *Journal of Clinical Psychiatry* 60 (Suppl 10), 15–19.
- Rosa, A., Zarzucla, A., Cuesta, M., Peralta, V., Martinez-Larrea, A., Serrano, F., Martinez-Larrea, A., Fananas, L., 2002. New evidence for association between COMT gene and prefrontal neurocognitive function in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 161, 1110–1112.
- Seeman, P., Lee, T., Chau Wong, M., Wong, K., 1976. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261, 717–719.
- Sesack, S.R., Hawrylak, V.A., Matus, C., Guido, M.A., Levey, A.I., 1998. Dopamine axon varicosities in the prefrontal division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *Journal of Neuroscience* 18, 2697–2708.
- Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisanté, A., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R.D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H.Y., Shinar, E., Yakir, B., Zak, N.B., Darvasi, A., 2004. COMT: a common susceptibility gene in bipolar disorder and schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics* 128B, 61–64.
- Simpson, G.M., Angus, J.W., 1970. A rating scale for extra-pyramidal side effects. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 212 (Suppl), 11–19.
- Tenhunen, J., Salminen, M., Lunnstrom, K., Kiviluoto, T., Saolainen, R., Ulmanen, I., 1994. Genomic organization of the human catechol-*O*-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *European Journal of Biochemistry* 223, 1049–1059.
- Thompson, J., Thomas, N., Singleton, A., Piggot, M., Lloyd, S., Perry, E.K., Morris, C.M., Perry, R.H., Ferrier, I.N., Court, J.A., 1997. D2 dopamine receptor gene Taq IA polymorphism; reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics* 7, 479–484.
- Tonda, M.E., Guthrie, S.K., 1994. Treatment of neuroleptic induced movement disorders. *Pharmacotherapy* 14, 543–560.
- Weiden, P.J., 2007. EPS profiles: the atypical antipsychotics are not all the same. *Journal of Psychiatric Practice* 13, 13–24.
- Weinberger, D., 2003. Dopamine, the prefrontal cortex, and a genetic mechanism of schizophrenia. In: Kapur, S., Lecrubier, Y. (Eds.), *Dopamine in the pathophysiology and treatment of schizophrenia*. Martin Dunitz Taylor and Francis Group Inc, London, pp. 129–154.
- Wirshing, W.C., 2001. Movement disorders associated with neuroleptic treatment. *Journal of Clinical Psychiatry* 62 (suppl 21), 15–18.
- Woods, S.W., 2003. Clorpromazine equivalent doses for the newer antipsychotics. *Journal of Clinical Psychiatry* 64, 663–667.



## 6.5 ESTUDIO N° 5

---

Falta de asociación entre efectos extrapiramidales inducidos por antipsicóticos y polimorfismos en genes que participan en el metabolismo y transporte de la dopamina.

### **Lack of association between antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms and polymorphisms in dopamine metabolism and transport genes**

**Patricia Gassó<sup>a</sup>, Sergi Mas<sup>a</sup>, Anna Crescenti<sup>a</sup>, Gemma Parramon<sup>b</sup>, Clemente Garcia-Rizo<sup>b</sup>, Eduard Parellada<sup>b</sup>, Miquel Bernardo<sup>b</sup>, Amalia Lafuente<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Dept. Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona (Spain).

<sup>b</sup> Psychiatry Service, Hospital Clínic Universitario de Barcelona, (Spain).

***Psychiat Res.***

Artículo enviado en Septiembre de 2008.

Pendiente de evaluación.



**RESUMEN:**

**Falta de asociación entre efectos extrapiramidales inducidos por antipsicóticos y polimorfismos en genes que participan en el metabolismo y transporte de la dopamina.**

**Objetivos:** El objetivo de este estudio fue estudiar la relación entre varios polimorfismos funcionales de genes que codifican para enzimas que participan en el metabolismo y transporte de la dopamina (MAO-A 30bp-VNTR; MAO-A 941T>G; MAO-B A/G intrón 13; ACE Ins/Del; DAT 40bp-VNTR; DAT -67A/T) y la incidencia de efectos extrapiramidales (EPS) inducidos por antipsicóticos.

**Métodos:** De una cohorte de 321 pacientes con trastornos psicóticos que recibía terapia antipsicótica, 81 casos que desarrollaron, EPS(Simpson-Angus >3), y 189 controles que no presentaron estas sintomatología, (Simpson-Angus ≤3), participaron en el estudio.

**Resultados:** La dosis del antipsicótico y su potencia para bloquear el receptor de dopamina D2 (DRD2), se identificaron como factores de susceptibilidad de los EPS, así como otros factores de riesgo bien conocidos tales como la edad y el diagnóstico. Sin embargo, no encontramos ninguna asociación entre los alelos, los genotipos o los diplotipos estudiados y el riesgo de EPS.

**Conclusiones:** No hemos encontrado ninguna evidencia que indique que polimorfismos de genes que codifican para enzimas que metabolizan o transportan la dopamina den predisposición o protección para los EPS.



**Lack of association between antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms and polymorphisms in dopamine metabolism and transport genes**

**Patricia Gassó<sup>a</sup>, Sergi Mas<sup>a</sup>, Anna Crescenti<sup>a</sup>, Gemma Parramon<sup>b</sup>,  
Clemente Garcia-Rizo<sup>b</sup>, Eduard Parellada<sup>b</sup>, Miquel Bernardo<sup>b</sup>, Amalia  
Lafuente<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Dept. Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, IDIBAPS,  
Casanova 143, E-08036 Barcelona (Spain)

<sup>b</sup> Psychiatry Service, Hospital Clínic Universitario de Barcelona, Villarroel 170,  
E-08036 Barcelona (Spain)

**Correspondence to:**

Amalia Lafuente

Dept. Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Casanova 143,  
E-08036 Barcelona (Spain)

E-mail: [amalialafuente@ub.edu](mailto:amalialafuente@ub.edu)

Telephone: 0034934024526 FAX: 0034934035881

**Running title**

Dopamine metabolism and transport genes in AP-induced EPS

## **Abstract**

The purpose of this study was to investigate the relationship between several functional polymorphisms in genes coding for dopamine metabolism and transport enzymes (MAO-A VNTR; MAO-A 941T>G; MAO-B A644G; ACE Ins/Del; DAT VNTR; DAT -67A/T) and the incidence of acute antipsychotic (AP)-induced extrapyramidalism (EPS). From a cohort of 321 psychiatric inpatients receiving AP therapy, 81 cases presenting with EPS (Simpson-Angus >3) and 189 controls presenting without EPS (Simpson-Angus ≤3) participated in this study. AP dosage and AP dopamine receptor D2 (DRD2) blockade potency were identified as susceptibility factors for the incidence of AP-induced EPS, along with other well-known risk factors such as age and diagnosis. However, there was no association between the alleles, genotypes or diplotypes studied and AP-induced EPS. We did not find evidence for involvement of polymorphisms in genes coding for dopamine metabolism and transport enzymes in the predisposition to or protection from AP-induced EPS.

## **Keywords**

Pharmacogenetics

Extrapyramidalism

Antipsychotic

Monoamine Oxidase

Dopamine Transporter

Angiotensin Converting Enzyme

Genetic polymorphism

Variable Number of Tandem Repeats

Schizophrenia

## 1. Introduction

Antipsychotic (AP) treatment-emergent extra pyramidal symptoms (EPS) are frequent and serious acute adverse reactions to AP drugs. Even though the exact mechanism underlying EPS is not clear, striatal dopamine D2 receptor (DRD2) blockade is believed to be the principal cause (Kapur et al., 2000). Several studies have tried to identify potential risk factors for developing EPS, such as younger age (Lewis, 1998), male gender (Dayalu and Chou, 2008) and psychiatric diagnosis, especially mood disorders (McIntyre and Konarski, 2005). Other predictors of EPS are the antipsychotic dosage and the antipsychotic potency of DRD2 blockade (Farde et al., 1992; Remington and Kapur, 1999).

More recently, genetic factors have also been considered, including the possible relationship between AP-induced acute EPS and the *CYP2D6* genotype (Crescenti et al., 2008). Although not conclusive, the results suggested a relationship between the *CYP2D6* poor metabolizer genotype and EPS, as shown in other similar studies, and demonstrated the importance of pharmacokinetic variability (Scordo et al., 2000; Brockmöller et al., 2002; Jaanson et al., 2002; Inada et al., 2003). However, the *CYP2D6* genotype alone fails to identify all probable cases and other explanations for the occurrence of EPS include genetic variability in AP targets and related molecular structures. Previous findings in our group have demonstrated that genetic variability that affects dopamine availability, such as that in enzymes involved in neurotransmitter metabolism (Catechol-O-Methyltransferase COMT), could be more important for AP-induced EPS than genetic variability in AP targets (DRD2) (Lafuente et al., 2008). These results led us to hypothesize that those genes involved in the metabolism and transport of AP and dopamine are key regulators of their ability to blockade the DRD2, and therefore, are good candidate genes to predict AP-induced EPS. Several enzymes participate in the metabolism and transport of dopamine, regulating their availability in the synaptic cleft, such as monoamine oxidase (MAO), angiotensin converting enzyme (ACE) and dopamine transporter (DAT).

MAO is a mitochondrial enzyme involved in the degradation of dopamine. There are two types of MAO: MAO-A and MAO-B (Grimsby et al., 1991). A 30-bp variable number of tandem repeats (VNTR) in *MAO-A* is associated with their transcriptional activity (Deckert et al., 1999). A second polymorphism in exon 8 (941T>G) alters MAO-A activity (Norton et al., 2002). The most common polymorphism of *MAO-B*, associated with lower activity of the enzyme, is a single base change (A644G) in intron 13 (rs1799836) (Kurth et al., 1993).

ACE catalyzes the conversion of angiotensin I to angiotensin II (Ang II) in the renin-angiotensin system. Ang II is a neurotransmitter that interacts with dopamine, and stimulates dopamine release and dopamine turnover (Crescenti et al., 2008) from striatum in rats. An insertion/deletion (I/D) polymorphism in an *ACE* intron is associated with ACE levels (Rigat et al., 1990).

DAT mediates the active reuptake of synaptic dopamine into neurons. A 40bp-VNTR has been described in the 3' untranslated region of the DAT gene (*SLC6A3*) and has been related to AP-induced

EPS (Güzey et al., 2007). Other polymorphisms that may explain DAT variability include a polymorphism in the *SLC6A3* promoter region (-67 A/T) (Khodayari et al., 2004).

The purpose of this study was to investigate the relationship between several functional polymorphisms in genes coding for dopamine metabolism and transport enzymes (MAO-A VNTR; MAO-A 941T>G; MAO-B A644G; ACE Ins/Del; DAT VNTR; DAT -67A/T) and the incidence of acute AP-induced EPS. Our hypothesis assumes that AP-treated schizophrenic patients who develop EPS may have less dopamine available in the synaptic cleft, which may translate into lower competence of the AP drug to blockade the DRD2. Therefore such patients should have higher frequencies of alleles coding for the more active forms of those enzymes (MAO-A VNTR-4\*R; MAO-A 941G; ACE Ins; DAT VNTR-9\*R; DAT -67A).

## 2. Material and Methods

### 2.1. Subjects

A cohort of 321 psychiatric inpatients receiving AP therapy was recruited consecutively in the Psychiatry Service of the Hospital Clinico (Barcelona, Spain) over a period of three years (2002-2004). 270 subjects of this cohort participated in the pharmacogenetic study of EPS presented here. 197 subjects were diagnosed as having schizophrenia (n=133) and related disorders (n=21 schizoaffective disorder; n=29 acute psychotic disorder; n=10 delusional paranoid disorder; n=4 schizotypal disorder). 42 were diagnosed as having bipolar disorders using DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 1994), and 31 had other diagnoses (including personality disorder, psychotic depression, behavior disorder, mild cognitive impairment, and obsessive-compulsive disorder). Diagnoses of cases were established using the SCID-DSM-IV version. The reliability and validity of the SCID-IV has been reported in several published studies (First et al., 1994). Information on age, gender, smoking and substance abuse were recorded. All those participating in the study were Caucasians, living in Catalonia. Catalonia is a region in North-east Spain with 7,210,508 habitants, 96.2% of which are Caucasians (<http://www.idescat.cat/cat/idescat/publicacions/anuari/>). Other ethnic groups were excluded. Written informed consent was obtained from each subject. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital.

### 2.2. Status of extrapyramidal symptoms

Acute EPS induced by AP medication was evaluated using the Simpson-Angus Scale (Simpson and Angus, 1970). 81 patients presenting with EPS (Simpson-Angus >3) during the hospitalization period and/or a history of movement disorders were considered as cases. 189 patients presenting without EPS (Simpson-Angus ≤3) at the time of the study or previously were considered as controls. The period of treatment was at least 15 days. Patients treated with AP drugs for less than 15 days and who did not present EPS (controls) were discarded. Patients receiving anticholinergic treatment,

antidepressants or mood stabilizers at the beginning of the AP treatment were also discarded. The inpatients were observed for 48h (without AP medication) following admission, in case of both acute exacerbation and first psychotic episodes.

### 2.3. AP Dosage

The daily AP dosage was calculated as the chlorpromazine-equivalent daily dose (CEDD) (Woods, 2003). AmiSulpride (n=4) and Long Acting Injectable Risperidone (LAIR) (n=2) conversion was not possible because there are no tables available. The total calculated CEDD included dosage addition when two APs were administered together (cases n=8, controls n=29). This total CEDD was categorized into three groups: low  $\leq 200$ mg, medium 201-399mg, and high  $\geq 400$ mg. In this new variable (CEDD), we included the AmiSulpride (low  $\leq 25$ mg, medium 25-50mg, high  $\geq 50$ mg) and LAIR (low  $\leq 400$ mg, medium 401-599mg, high  $\geq 600$ mg) dosage in each corresponding category.

We categorized each AP-drug for its EPS-potency in three categories: high, medium or low (Baldesarini and Tarazi, 2001; Flórez, 2003; Gardner et al., 2005). For zuclopentixol, data were collected from Laboratories Duphar-Nezel (Sovany) (**Table 1**).

Compliance was monitored in accordance with established nursing protocols.

### 2.4. Experimental procedures

DNA was isolated from 300  $\mu$ l of samples of total blood extracted using standard techniques. The genotyping of MAO-A 941T/G (Norton et al., 2002), MAO-B A644G (Kurth et al., 1993; Ho et al., 1995), ACE I/D (Crescenti et al., 2008) and DAT -67A/G (Rubie et al. 2001) was performed following previously described methods. For the genotyping of MAO-A 30bp-VNTR and DAT 40bp-VNTR a modification of previously described methods was applied. A multiplex PCR resolved with capillary electrophoresis was used to genotype these two VNTRs. Briefly, a multiplex PCR using previously described primers marked with fluorescent dyes was used to amplify genomic regions of *MAO-A* (6-FAM-5'-CCC AGC GTG CTC CAG AAA C-3', 5'- GGA CCT GGG CAG TTG TGC-3', Deckert et al., 1999), and *SLC6A3* (VIC-5'-TGT GGT GTA GGG AAC GGC CTG AG-3' y 5'-CTT CCT GGA GGT CAC GGC TCA AGG-3'DAT, Vandenberg et al., 1992). Untreated PCR products were loaded and run on an ABI Prism® 310 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's recommendations, and using a POP-7™ polymer in capillaries of 36 cm. The data were collected using the 310 Data Collection v3.0 in conjunction with the FragmentAnalysis36POP7 (Applied Biosystems) module, and analyzed with GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems). The different alleles were identified automatically depending on their color and size (MAO-A blue peaks around 209 to 269 bp; DAT green peaks around 200 to 600 bp).

## 2.5. Statistics

Data were analyzed using SPSS14.05 (statistical analysis software, SPSS Inc., Chicago, ILL, USA). Means and standard deviations were computed for continuous variables. Univariate analysis (chi-squared test for categorical variables; *t*-student test for continuous variables) was used to identify variables associated with the risk of developing schizophrenia. Multivariate analyses (multiple logistic regressions) were used to estimate the independent contribution to schizophrenia risk of each genotype and variable. We used a backward strategy: the variables identified through the univariate analysis were included in the logistic regression model. The criterion for retaining a variable was  $\alpha=0.1$ . Confidence limits for the adjusted odds ratio were calculated with the associated logistic coefficients and standard errors. We used Bonferroni's correction for multiple testing in the analysis of the alleles and genotypes, since we analyzed six polymorphisms in four loci. Taking this correction into consideration,  $p>0.008$  was considered statistically significant. The Hardy-Weinberg equilibrium and the linkage disequilibrium analysis were performed with the *genetics* package of the statistical software R (version 2.4.0). The EM algorithm was used to infer haplotypes, and homogeneity likelihood ratio tests were used to compare haplotype frequency distributions, by means of the UNPHASED software (Dudbridge 2003). The significance of the best result for each gene was corrected for multiple testing by 10000 permutations.

## 3. Results

The psychiatric diagnosis of cases (patients treated with APs who presented with EPS) demonstrated that 69% of the patients had schizophrenia or related disorders and 30% had bipolar disorder. In the control group (patients treated with APs without EPS), 87.9% were diagnosed with schizophrenia and 12% with bipolar disorder. The cases and the controls had similar distribution in terms of gender and smoking patterns, or substance abuse. Age was significantly different between cases ( $32.6\pm 13$ ) and controls ( $37.6\pm 16$ ) overall ( $P=0.01$ ) and in the schizophrenia subgroup (cases  $29.7\pm 9$ ; controls  $35.1\pm 14$ ;  $P=0.02$ ), but not among the bipolar disorder patients (cases  $38.05\pm 18$ ; controls  $45.06\pm 18$ ). This difference compelled us to adjust the multivariate analysis for this factor.

Different EPS were reported in the case group, bradykinesia being the most prevalent form (54%), followed by dystonia (24%), rigidity (18%), tremor (2%) and dyskinesia (2%).

Table 1 shows the AP drugs administered in both groups and the mean and standard deviation of the AP dosage calculated as CEDD and categorized in three subgroups (low, medium and high). Table 2 shows a multivariate analysis of age, AP dosage and AP-EPS potency and reveals an association between these variables and risk of EPS. Based on the results we decided to adjust the multivariate analysis for these factors.

The allele frequencies of the various genetic polymorphisms studied (MAO-A VNTR; MAO-A 941T>G; MAO-B A644G; ACE Ins/Del; DAT VNTR; DAT -67A/T) in cases and controls are shown

in **Table 3**. All the polymorphisms analyzed were in Hardy-Weinberg equilibrium in cases and controls (data not shown). To explore potential associations of these alleles with EPS, we used multivariate analysis, adjusted by categorized dosage, AP-EPS potency and age, as shown in **Table 3**. No significant differences were observed in the susceptibility to AP-induced EPS among the different alleles or genes studied. The analysis of the polymorphisms in the *MAO-A* and *MAO-B* genes, which are localized in the X-chromosome, was performed separately for men and women. No significant associations were obtained in this stratified analysis (data not shown).

We stratified the patients (cases and controls) into two groups on the basis of their diagnosis; 1) schizophrenia and related disorders and 2) bipolar disorders. No association was found in the analysis for either group (data not shown).

We have inferred six different haplotypes from the *MAO-A* genotype data and five haplotypes from the *DAT* genotype data with frequencies over 1%. The various haplotypes of the *MAO-A* and *DAT* genes showed no significant differences in the susceptibility to AP-induced EPS (data not shown).

Linkage disequilibrium (LD) between the polymorphisms of the *MAO-A* and *DAT* genes was assessed in cases and controls via Lewontin's  $D'$  statistic. Incomplete LD was observed between *MAO-A* alleles ( $D'$  cases 0.76;  $D'$  controls 0.89), whereas no LD was observed between the *DAT* markers ( $D'$  cases 0.17;  $D'$  controls 0.04).

#### 4. Discussion

Pharmacogenetic studies in psychopharmacology entail complex trails due to the multiplicity of diagnoses, treatments and dosage used, and to the large number of confounding factors (duration of treatment, concomitant medication, previous medication, and compliance). Therefore, the recruitment of homogenous participants for these studies is a complex process. Ours was a prospective cohort study in which the patients were recruited at the moment of admission to our Hospital, designed in a real life setting. The heterogeneity of EPS and inclusion of different drugs and dosage might be a weakness. In this situation, dose equivalence estimations are applied in the statistical analysis to homogenize the data. Furthermore, we categorized the CEDD values in three groups (high, medium and low dosage), as described previously (Lafuente et al., 2007). These strategies are commonplace in psychopharmacology, and have been used in several pharmacogenetic studies (Murray, 2006; Ozdemir et al., 2006).

Another weakness of the present study is the relatively low number of subjects, which did not allow us to perform subgroup analysis of EPS subtypes or specific AP subgroups. The sample size ( $n=270$ ), although limited, was higher than the mean sample size used in pharmacogenetic studies of acute AP-induced EPS ( $n\sim 150$ ) (Inada et al., 1999; Scordo et al., 2000; Brockmüller et al., 2002; Jaanson et al., 2002; Kaiser et al., 2002; Inada et al., 2003; Kakihara et al., 2005; Nakazono et al.,

2005; Gunes et al., 2006; Plesnicar et al., 2006; Dolzan et al., 2007; Greenbaum et al., 2007; Güzey et al., 2007; Panagiotidis et al., 2007; Sakumoto et al., 2007; Greenbaum et al., 2008; Gunes et al., 2008;). In fact, to our knowledge, only one study had a larger sample (n=665) with Caucasians (Kaiser et al., 2002). Given our sample size, the minimum allele frequency (MAF) used in our study (without considering the rare alleles of the MAO-A and DAT VNTR polymorphisms), and the significance threshold applied after Bonferroni's correction, we had more than 80% statistical power to detect genetic effects of 2 or more, which is the minimum effect expected for polymorphisms to be clinically relevant in drug management.

The aim of the present study was to evaluate the possible association between genetic polymorphisms in candidate genes participating in dopamine metabolism (MAO-A VNTR; MAO-A 941T>G; MAO-B A644G; ACE Ins/Del) and transport (DAT VNTR; DAT -67A/T) and the risk of acute AP-induced EPS (acute dystonia, parkinsonism, akathisia), of which approximately 50% occur within 2 days of AP treatment and 90% occur within 5 days of treatment (Van Harten et al., 1999).

Neuroimaging studies have demonstrated that a striatal DRD2 occupancy of greater than 80% significantly increases the risk of EPS (Farde et al., 1992; Remington and Kapur, 1999). Reported rates of EPS induced by first-generation AP agents or typical APs, with high affinity for DRD2, are around 50-75%. The newer APs or atypical APs have lower levels of DRD2 affinity, and also have an affinity for other receptors such as those in the serotonergic system (Kapur et al., 1998; Kapur et al., 1999). However, not all the atypical APs have the same DRD2 affinity, which ranges from high (risperidone) to low (clozapine). Moreover, this range of affinity could be translated into a high or a low risk of developing EPS. The mean incidence of EPS with atypical APs is 15% (Miyamoto et al., 2005).

With the exception of DAT VNTR, none of the candidate polymorphisms analyzed has been related to acute EPS in the literature. Recently, Güzey et al. found a significant association between the DAT VNTR 9\*R allele and acute EPS (OR 1.9; 95% CI 1.1-3.3; p=0.03), and an interesting interaction between this allele and the A1 allele of the Taq1A polymorphisms in the DRD2 gene (OR 4.0; 95% CI 1.0-15.2; p=0.04) (Güzey et al., 2007). However, previous studies by our group, on a subset of the sample presented here (n=62), found no association between the main DAT VNTR alleles (9\*R and 10\*R) and AP-induced EPS (Lafuente et al., 2007). In the same study, there was no genotype-phenotype correlation between these alleles and DAT expression. The expression levels of DAT were measured with SPECT procedures (Single Photon Emission Computed Tomography) as the DAT striatal binding ratio. The enlargement of our cohort confirms these results. Several factors may explain the observed divergence with the study of Güzey et al: the latter included several APs and various dosages, but all the APs were typical; although different polymorphisms were analyzed, no corrections for multiple testing were applied (given the conservative Bonferroni correction, a significance threshold of 0.007 must be applied). This polymorphism has been studied by other

authors in relation to tardive EPS, mainly tardive dyskinesia (Segman et al., 2003; Srivastava et al., 2006), and AP response (Szekeres et al., 2004), with negative results.

Regarding the other candidate genes considered, some authors have explored the potential role of genetic variability in the monoamine oxidase loci (*MAO-A* and *MAO-B*), in the AP response. No significant results were reported in terms of AP efficacy (Tybura et al., 2006) or susceptibility to tardive EPS syndromes (Matsumoto et al., 2004). Only one study reported a discrete interaction between the *MAO-A* VNTR 3\*R allele and *COMT* Val158Met polymorphisms with a poor response to AP (OR 6.16;  $p=0.03$ ) (Illy et al., 2003a). The same authors described a similar interaction among the *COMT* Val158Met polymorphisms and *ACE* D allele (OR 10.89 ; 95% CI 1.14–103.98,  $p=0.04$ ) (Illy et al., 2003b).

In our study AP dosage and AP *DRD2* blockade potency were identified as susceptibility factors for the incidence of AP-induced EPS, along with other well-known risk factors such as age and diagnosis. However, we did not find any association between the alleles, genotypes or diplotypes studied and AP-induced EPS. These results lead us to conclude that the AP is the main factor in EPS risk. In fact, a polymorphism affecting drug disposition, *CYP2D6*\*4, is the main allele associated with AP-induced EPS (Scordo et al., 2000; Brockmöller et al., 2002; Jaanson et al., 2002; Inada et al., 2003; Crescenti et al., 2008).

In conclusion, we did not find supporting evidence for involvement of polymorphisms in genes coding for dopamine metabolism and transport enzymes (*MAO-A* VNTR; *MAO-A* 941T>G; *MAO-B* A644G; *ACE* Ins/Del; *DAT* VNTR; *DAT* -67A/T) in the predisposition to or protection from AP-induced EPS. However, only a fraction of all dopamine-related genes were included in our study and, therefore, many more genes may represent auspicious candidates. Moreover, as our approach depends solely on the analysis of a single marker in candidate genes, missing LD between the markers and other “functional” SNPs in the corresponding gene will also give a negative result. As the HapMap-Project progresses rapidly and, therefore, information about the haplotype block structure of the human genome increases substantially, it might soon be possible to reappraise our negative results with respect to the haplotype block structure of the gene under examination.

## Acknowledgements

The authors thank Esther Planas for help in the recruitment of patients, and the Language Advisory Service at the University of Barcelona, Spain for manuscript revision. This study was supported by the Spanish Ministry of Health, Instituto Carlos III (RETICS, Red de Enfermedades Mentales REM-TAP NetworkRD06/0011/06-05; CIBER-SAM, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental CB07/09/005; FIS, Fondo de Investigación Sanitaria P1060182U-2006) and the Catalonia Ministry of Innovation, Universities and Enterprise (DURSI, GRC2005SGR00039, GRC2005SGR00223).

## References

- American Psychiatric Association, 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., Washington DC. American Psychiatric Association.
- Baldesarini, R.J., Tarazi, F.K., 2001. Drugs and the treatment of Psychiatric Disorders: Psychosis and Mania, in: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (Eds), Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, tenth ed. McGraw-Hill, New York,,: pp.485-521.
- Brockmöller, J., Kirchheiner, J., Schmider, J., Walter, S., Sachse, C., Müller-Oerlinghausen, B., Roots, I., 2002. The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 72, 438-452.
- Crescenti, A., Gassó, P., Mas, S., Abellana, R., Delofeu, R., Parellada, E., Bernardo, M., Lafuente, A., 2008. Ins/Del polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme (ACE) gene is associated with schizophrenia in a Spanish population. *Psychiatry Research* d.o.i.:10.1016/j.psychres.2008.04.024
- Crescenti, A., Mas, S., Gassó, P., Parellada, E., Bernardo, M., Lafuente, A. 2008. CYP2D6\*3, \*4, \*5 and \*6 polymorphisms and antipsychotic-induced extrapyramidal side-effects in patients receiving antipsychotic therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35: 807-811.
- Dayalu, P., Chou, K.L., 2008. Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms and their management. *Expert Opinion in Pharmacotherapy* 9(9): 1451-1462.
- Deckert, J., Catalano, M., Syagailo, Y.V., Bosi, M., Okladnova, O., Di Bella, D., Nöthen, M.M., Maffei, P., Franke, P., Fritze, J., Maier, W., Propping, P., Beckmann, H., Bellodi, L., Lesch, K.P., 1999. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Human Molecular Genetics* 8(4):621-624.
- Dolzan, V., Plesnicar, B.K., Serretti, A., Mandelli, L., Zalar, B., Koprivsek, J., Breskvar, K., 2007. Polymorphisms in dopamine receptor DRD1 and DRD2 genes and psychopathological and extrapyramidal symptoms in patients on long-term antipsychotic treatment. *American Journal of Medical Genetics part B Neuropsychiatric Genetics* 144, 809-815
- Dudbridge, F., 2006. UNPHASED user guide. Technical report 2006/5, MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.
- Farde, L., Nordström, A.L., Wiesel, F.A., Pauli, S., Halldin, C., Sedvall, G., 1992. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptors occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Archives of General Psychiatry* 49, 538-544.
- First, M.B., Spitzer, R.L., Williams, J.B.W., Gibbon, M., 1994. Structured Clinical Interview for DSM-IV-Patients edition (SCID-P). American Psychiatric Press, WashingtonDC.
- Flórez, J., 2003. Fármacos antipsicóticos neurolépticos, in Flórez J (Ed), *Farmacología humana*, fourth ed. Masson, Barcelona, pp.563-579.
- Gardner, D.M., Baldesarini, R.J., Waraich, P., 2005. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *Canadian Medical Association Journal* 172, 1703-1711.
- Greenbaum, L., Smith, R.C., Rigbi, A., Strous, R., Teltsh, O., Kanyas, K., Korner, M., Lancet, D., Ben-Asher, E., Lerer, B., 2008. Further evidence for association of the RGS2 gene with antipsychotic-induced parkinsonism: protective role of a functional polymorphism in the 3'-untranslated region. *Pharmacogenomics Journal* [Epub ahead of print]

- Greenbaum, L., Strous, R.D., Kanyas, K., Merbl, Y., Horowitz, A., Karni, O., Katz, E., Kotler, M., Olender, T., Deshpande, S.N., Lancet, D., Ben-Asher, E., Lerer, B., 2007. Association of the RGS2 gene with extrapyramidal symptoms induced by treatment with antipsychotic medication. *Pharmacogenetics and Genomics* 17, 519-528.
- Grimsby, J., Chen, K., Wang, L.J., Lan, N.C., Shih, J.C., 1991. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88, 3637–3641.
- Gunes, A., Dahl, M.L., Spina, E., Scordo, M.G., 2008. Further evidence for the association between 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene polymorphisms and extrapyramidal side effects in male schizophrenic patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* 64, 477-482
- Gunes, A., Scordo, M.G., Jaanson, P., Dahl, M.L., 2007. Serotonin and dopamine receptor gene polymorphisms and the risk of extrapyramidal side effects in perphenazine-treated schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berlin)* 190, 479-484
- Güzey, C., Scordo, M.G., Spina, E., Landsem, V.M., Spigset, O., 2007. Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia: associations with dopamine and serotonin receptor and transporter polymorphisms. *European Journal of Clinical Pharmacology* 63, 233-241.
- Ho, S.L., Kapadi, A.L., Ramsden, D.B., Williams, A.C., 1995. An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 37, 403–405.
- Illi, A., Mattila, K.M., Kampman, O., Anttila, S., Roivas, M., Lehtimäki, T., Leinonen, E., 2003a. Catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase A genotypes and drug response to conventional neuroleptics in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 23, 429-34.
- Illi, A., Kampman, O., Anttila, S., Roivas, M., Mattila, K.M., Lehtimäki, T., Leinonen, E., 2003b. Interaction between angiotensin-converting enzyme and catechol-O-methyltransferase genotypes in schizophrenics with poor response to conventional neuroleptics. *European Neuropsychopharmacology* 13, 147-151.
- Inada, T., Arinami, T., Yagi, G., 1999. Association between a polymorphism in the promoter region of the dopamine D<sub>2</sub> receptor gene and schizophrenia in Japanese subjects: replication and evaluation for antipsychotic-related features. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2, 181-186.
- Inada, T., Senoo, H., Iijima, Y., Yamauchi, T., Yagi, G., 2003. Cytochrome P450 II D6 gene polymorphisms and the neuroleptic extrapyramidal symptoms in Japanese schizophrenic patients. *Psychiatric Genetics* 13, 163-168.
- Jaanson, P., Marandi, T., Kiivet, R.A., Vasar, V., Vään, S., Svensson, J.O., Dahl, M.L., 2002. Maintenance therapy with zuclopenthixol decaonate : associations between plasma concentrations, neurological side effects and CYP2D6 genotype. *Psychopharmacology* 162, 67-73.
- Kaiser, R., Treblay, P.B., Klufmoller, F., Roots, I., Brockmoller, J., 2002. Relationship between adverse effects of antipsychotic treatment and dopamine D<sub>2</sub> receptor polymorphism in patients with schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 7, 695-705.
- Kakihara, S., Yoshimura, R., Shinkai, K., Matsumoto, C., Goto, M., Kaji, K., Yamada, Y., Ueda, N., Ohmori, O., Nakamura, J., 2005. Prediction of response to risperidone treatment with respect to plasma concentrations of risperidone, catecholamine metabolites, and polymorphism of cytochrome P450 2D6. *International Clinical Psychopharmacology* 20, 71-78.

- Kapur, S., Zipursky, R.B., Remington, G., Jones, C., DaSilva, J., Wilson, A.A., Houle, S., 1998. 5-HT<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> receptor occupancy of olanzapine in schizophrenia; a PET investigation. *American Journal of Psychiatry* 155, 921-928.
- Kapur, S., Zipursky, R.B., Remington, G., 1999. Clinical and theoretical implications of 5-HT<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> receptor occupancy of clozapine olanzapine and risperidone in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 156: 286-293.
- Kapur, S., Zipursky, R., Jones, C., Remington, G., Houle, S., 2000. Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response and side effects; a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 157, 514-520.
- Khodayari, N., Garshabi, M., Fadai, F., Rahimi, A., Hafizi, L., Ebrahimi, A., Najmabadi, H., Ohadi, M., 2004. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) core promoter polymorphism -67T variant with schizophrenia. *American American Journal of Medical Genetics part B Neuropsychiatric Genetics* 129, 10-12.
- Kurth, J.H., Kurth, M.C., Poduslo, S.E., Schwankhaus, J.D., 1993. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 33, 368-372.
- Lafuente, A., Bernardo, M., Mas, S., Crescenti, A., Aparici, M., Gasso, P., Deulofeu, R., Mane, A., Catalan, R., Carne, X., 2008. Polymorphism of dopamine D<sub>2</sub> receptor (TaqIA, TaqIB, and-141C Ins/Del) and dopamine degradation enzyme (COMT G158A, A-278G) genes and extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia and bipolar disorders. *Psychiatry Research* (doi:10.1016/j.psyres.2007.08.002)
- Lafuente, A., Bernardo, M., Mas, S., Crescenti, A., Aparici, M., Gassó, P., Catalan, R., Mateos, J.J., Lomeña, F., Parellada, E. (2007). Dopamine transporter (DAT) genotype (VNTR) and phenotype in extrapyramidal symptoms induced by antipsychotics. *Schizophrenia Research* 90, 115-122.
- Lewis, R., 1998. Typical and atypical antipsychotics in adolescent schizophrenia: efficacy, tolerability, and differential sensitivity to extrapyramidal symptoms. *Canadian Journal of Psychiatry* 43, 596-604.
- Matsumoto, C., Shinkai, T., Hori, H., Ohmori, O., Nakamura, J., 2004. Polymorphism of dopamine degradation enzyme (COMT and MAO) genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research* 127, 1-7.
- McIntyre, R.S., Konarski, J.Z., 2005. Tolerability profiles of atypical antipsychotics in the treatment of bipolar disorders. *Journal of Clinical Psychiatry* 66 (suppl 3), 28-36.
- Miyamoto, S., Duncan, G.E., Marx, C.E., Lieberman, J.A., 2005. Treatment of schizophrenia; a critical review of pharmacology and mechanism of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry* 10, 79-104.
- Murray, M., 2006. Role of CYP pharmacogenetics and drug-drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 871-885.
- Nakazono, Y., Abe, H., Murakami, H., Koyabu, N., Isaka, Y., Nemoto, Y., Murata, S., Tsutsumi, Y., Ohtani, H., Sawada, Y., 2005. Association between neuroleptic drug-induced extrapyramidal symptoms and dopamine D<sub>2</sub>-receptor polymorphisms in Japanese schizophrenic patients. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 43, 163-171
- Norton, N., Kirov, G., Zammit, S., Jones, G., Jones, S., Owen, R., Krawczak, M., Williams, N.M., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., 2002. Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. *American Journal of Medical Genetics* 114, 491-496.

- Ozdemir, V., Aklillu, E., Mee, S., Bertilsson, L., Albers, L.J., Graham, J.E., Caligiuri, M., Lohr, J.B., Reist, C., 2006. Pharmacogenetics for off-patent antipsychotics: reframing the risk for tardive dyskinesia and access to essential medicines. *Expert Opinion in Pharmacology* 7, 119-133.
- Panagiotidis, G., Arthur, H.W., Lindh, J.D., Dahl, M.L., Sjöqvist, F., 2007. Depot haloperidol treatment in outpatients with schizophrenia on monotherapy: impact of CYP2D6 polymorphism on pharmacokinetics and treatment outcome. *Therapeutic Drug Monitoring* 9, 417-422.
- Plesnicar, B.K., Zalar, B., Breskvar, K., Dolzan, V., 2006. The influence of the CYP2D6 polymorphism on psychopathological and extrapyramidal symptoms in the patients on long-term antipsychotic treatment. *Journal of Psychopharmacology* 20, 829-833.
- Remington, G., Kapur, S., 1999. D2 and 5HT2 receptor effects of antipsychotic; bridging basic and clinical findings using PET. *Journal of Clinical Psychiatry* 60 (Suppl 10), 15-19.
- Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., Soubrier, F., 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene accounting for the half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation* 86, 1343-1346.
- Rubie, C., Schmidt, F., Knapp, M., Sprandel, J., Wiegand, C., Meyer, J., Jungkunz, G., Riederer, P., Stöber, G., 2001. The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neuroscience Letters* 297, 125-128.
- Sakumoto, N., Kondo, T., Mihara, K., Suzuki, A., Yasui-Furukori, N., 2007. Dopamine D2 receptor gene polymorphisms predict well the response to dopamine antagonists at therapeutic dosages in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neuroscience* 61, 174-180
- Scordo, M.G., Spina, E., Romeo, P., Dahl, M.L., Bertilsson, L., Johansson, L., Sjöqvist, F., 2000. CYP2D6 genotype and antipsychotic-induced extrapyramidal side effects in schizophrenic patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* 56, 679-683.
- Segman, R.H., Golster, T., Heresco-Levy, U., Finkel, B., Shalem, R., Schlafman, M., Yakir, A., Greenberg, D., Strous, R., Lerner, A., Shelevoy, A., Lerer, B., 2003. Association of dopaminergic and serotonergic genes with tardive dyskinesia in patients with chronic schizophrenia. *Pharmacogenomics Journal* 3, 277-283.
- Simpson, G.M., Angus, J.W. 1970. A rating scale for extra-pyramidal side effects. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 212, 11-19.
- Srivastava, V., Varma, P.G., Prasad, S., Semwal, P., Nimgaonkar, V.L., Lerer, B., Deshpande, S.N., 2006. Genetic susceptibility to tardive dyskinesia among schizophrenia subjects: IV. Role of dopaminergic pathway gene polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics* 16, 111-117.
- Szekeres, G., Keri, S., Juhasz, A., Rimanoczy, A., Szendi, I., Czimmer, C., Janka, Z., 2004. Role of the dopamine D3 receptor (D3) and dopamine transporter (DAT) polymorphism in cognitive disfunctions and therapeutic response to atypical antipsychotics in patients with schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics part B Neuropsychiatric Genetics* 124, 1-5.
- Tybura, P., Grzywacz, A., Syrek, S., Parus, M., Samochowiec, J., 2006. Association of functional genes polymorphisms of key enzymes in the metabolism of biogenic amines with paranoid schizophrenia susceptibility and the influence of these polymorphisms on PANSS results in antipsychotic treatment. *Psychiatria Polska* 40, 913-923.

- Van Harten, P.N., Hoek, H.W., Kahn, R.S., 1999. Acute dystonia induced by drug treatment. *British Medical Journal* 319, 623-626.
- Vandenbergh, D.J., Persico, A.M., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Li, X., Jabs, E.W., Uhl, G.R., 1992. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics* 14, 1104-1106.
- Woods, S.W., 2003. Clorpromazine equivalent doses for the newer antipsychotics. *Journal of Clinical Psychiatry* 64, 663-667.

**Table 1.** Distribution of different AP drugs used and their AP-EPS potency between cases and controls.

AP Drug <sup>1</sup>	AP-EPS potency <sup>2</sup>	Cases (n=81)	Controls (n=189)
Risperidone	2	48 (60%)	84 (44%)
Haloperidol	3	13 (16%)	9 (4%)
Clozapine	1	1 (1%)	24 (12%)
Amisulpride	2	3 (3%)	1 (0.5%)
Olanzapine	1	3 (3%)	32 (16%)
Zuclopentixol	2	5 (6%)	1 (0.5%)
Ziprasidone	1	4 (5%)	10 (5%)
Quetiapine	1	1 (1%)	24 (12%)
LAIR	2	1 (1%)	1 (0.5%)
Trifluoperazine	3		1 (0.5%)
<b>CEED<sup>3,4</sup></b>			
Low Dose		142.7 ±48 (12%)	162.7±48 (31%)
Medium Dose		296.6±30 (49%)*	290.7±33 (37%)*
High Dose		564.3±158 (38%)*	547.1±147 (30%)*
<b>Total</b>		382.8±184(n=74)**	329±179(n=183)**

<sup>1</sup>3 cases and 3 controls missing

<sup>2</sup>AP-EPS potency calculated as described in Material and Methods

<sup>3</sup>Mean and standard deviation of the AP dosage calculated and categorized as CEDD, as described in Material and Methods

<sup>4</sup>6 cases and 5 controls missing because no AP, no dose or no conversion was available

\* p<0.001 \*\* p= 0.03

**Table 2.** The age, AP dosage and AP-EPS potency-dependent risk for EPS.

	<b>EPS n=81</b> n/N (%)	<b>No EPS n=189</b> n/N (%)	<b>OR</b>	<b>CI</b>	<b>p</b>
<b>A) AGE<sup>1,2</sup></b>					
Age < 31	42/68 (61.8)	73/167 (43.7)	2.3	0.2-4.3	<b>0.01</b>
<b>B) CEDD<sup>3</sup></b>					
Low	10/76 (13.1)	58/184 (31.5)			
Medium	37/76 (48)	69/184 (37.5)	3.1	1.4-6.8	<b>0.004</b>
High	29/76 (38.1)	57/184 (31)	2.9	1.3-6.6	<b>0.009</b>
<b>C) AP-EPS-Potency<sup>4</sup></b>					
Low	9/78 (11.5)	90/186 (48.4)			
Medium	56/78 (71.7)	86/186 (46.2)	6.4	2.9-13.7	<b>&gt;0.001</b>
High	13/78 (16.6)	10/186 (5.3)	13	4.4-37.9	<b>&gt;0.001</b>

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

<sup>1</sup>Age < 31 (mean)

<sup>2</sup>13 cases and 22 controls missing due to lack information on age

<sup>3</sup>5 cases and 5 controls missing due to lack of AP or dose information

<sup>4</sup>3 case and 3 controls missing due to lack of AP information.

**Table 3.** Descriptive distribution of allele frequencies in cases (EPS) and controls (No-EPS), and multivariate analysis of the different allele-dependent risk for EPS (MAO-A VNTR; MAO-A 941T>G; MAO-B A644G; ACE Ins/Del; DAT VNTR; DAT -67A/T).

	Cases n/N(%)	Control n/N(%)	Multivariate analysis <sup>1</sup>		
			OR	CI	P
<b>MAO-A 30bp-VNTR<sup>2</sup></b>					
3*R allele	39/119 (32)	95/274 (34)	0.8	0.4-1.5	0.6
3.5*R allele	2/119 (1)	7/274 (2)	0.2	0.0-3.1	0.2
4*R allele	74/119 (62)	170/274 (62)	1.2	0.7-2.0	0.4
5*R allele	2/119 (1)	2/274 (0.7)	2.7	0.3-24.8	0.3
<b>MAO-A 941T&gt;G<sup>2</sup></b>					
T allele	86/119 (72.2)	206/274 (75.1)			
G allele	33/119 (27.7)	68/274 (24.8)	0.8	0.4-1.5	0.5
<b>MAO-B A644G<sup>b</sup></b>					
A allele	73/117 (62.4)	135/274 (49.2)			
G allele	44/117 (37.6)	139/274 (50.7)	0.7	0.4-1.1	0.1
<b>ACE Ins/Del</b>					
Ins allele	70/160 (43.8)	166/378 (43.9)			
Del allele	90/160 (56.2)	212/378 (56.1)	0.9	0.6-1.5	0.9
<b>DAT 40bp-VNTR</b>					
3*R allele	0/162 (0.0)	4/378 (1.0)	0.0	0.0-0.0	0.9
9*R allele	47/162 (29.0)	11/378 (29.4)	1.0	0.6-1.7	0.8
10*R allele	111/162 (68.5)	258/378 (68.2)	0.9	0.5-1.4	0.7
11*R allele	3/162 (1.8)	5/378 (1.3)	2.9	0.5-16.7	0.2
<b>DAT -67A/T</b>					
T allele	69/160 (43.1)	151/378 (39.9)			
A allele	91/160 (56.9)	227/378 (60.0)	1	0.6-1.6	0.8

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

<sup>1</sup>Multivariate logistic regression analysis that studied alleles as continuous variable (0, wild-type; 1, heterozygous; 2, homozygous mutated), adjusted for age, dosage (CEDD including categories for LAIR and Amisulpride) and AP-EPS-potency. After Bonferroni's correction  $p > 0.007$  was considered statistically significant.

<sup>2</sup>MAO-A and MAO-B are X-chromosome linked genes, and for this reason in the allele frequency calculation, males contribute one allele (hemizygot XY), whereas females contribute two alleles (XX).



## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 7.1 ESTUDIO DE RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

---

**7.1.1 ESTUDIO N° 1:** *Polimorfismos genéticos en la Catecol-O-MetilTransfera y riesgo de esquizofrenia en población española.*

- **Los resultados de este estudio muestran una asociación entre el polimorfismo COMT -278A/G y el riesgo de sufrir esquizofrenia y trastornos relacionados, donde los heterocigotos muestran una reducción del 60% en el riesgo de desarrollar dicha enfermedad mental. En nuestra población no se observaron diferencias significativas en la distribución de los haplotipos entre los pacientes y los controles poblacionales.**

*COMT* es un importante gen candidato para la esquizofrenia tanto funcional como posicional y por esa razón se han llevado a cabo un gran número de estudios de asociación con diferentes variantes genéticas. A pesar de que numerosos estudios avalan la funcionalidad del polimorfismo COMT Val158Met (*Chen J et al., 2004; Shield AJ et al., 2004*), su papel en la esquizofrenia es controvertido, en parte debido a la falta de replicación de los resultados positivos y a los resultados negativos obtenidos en los meta-análisis (*Glatt SJ et al., 2003; Fan JB et al., 2005; Munafo MR et al., 2005*). Además, en los estudios donde se ha encontrado asociación se presentan valores bajos de odds ratio, por lo que si este polimorfismo tiene un efecto en el riesgo de esquizofrenia, éste es un efecto muy pequeño. En nuestro estudio, al igual que en otros trabajos con población española (*Diez-Martin J et al., 2007*), no se ha podido demostrar dicha asociación. Probablemente se necesiten tamaños muestrales mayores para detectar la pequeña contribución de este polimorfismo al riesgo global.

A parte del polimorfismo funcional de la COMT se han identificado muchos otros que han sido objeto de estudio, tanto individualmente como formando parte de haplotipos. El polimorfismo -278A/G es un ejemplo. Además de su interés por su localización en la zona promotora del gen, que determina la síntesis de la isoforma predominante en cerebro, se ha observado que tiene un efecto en la actividad enzimática de la COMT (*Chen J et al., 2004*). Esto ha llevado a los científicos a estudiar su participación en el riesgo de esquizofrenia, sin obtener resultados concluyentes. Aunque Funke y col. (*Funke B et al., 2005*) encontraron asociación entre el alelo A y el riesgo de desarrollar esquizofrenia y otros trastornos

psicóticos, existen estudios donde no han encontrado asociación del marcador individual o del haplotipo que forma con otros polimorfismos (Norton N *et al.*, 2002; Sanders AR *et al.*, 2005). A pesar de que, en nuestra población, no hemos hallado asociación entre ninguno de los dos alelos y el riesgo de sufrir esquizofrenia y trastornos relacionados, los individuos heterocigotos reducen el riesgo de desarrollar la enfermedad en, aproximadamente, un 60% (OR 0.4;  $p=0.009$ ). Esta situación de ventaja del heterocigoto puede deberse a las diferencias de desequilibrio de ligamiento de ambos alelos con distintos polimorfismos funcionales que podrían dar lugar a alteraciones en la expresión de *COMT* más severas en heterocigosis que en homocigosis.

Recientemente, un haplotipo de tres marcadores se ha asociado con el riesgo de esquizofrenia y trastorno bipolar en una población de judíos asquenazíes (Shifman S *et al.*, 2002). Este haplotipo contiene el polimorfismo rs737865, el cual se encuentra muy próximo al promotor P2 y en completo desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo -278A/G ( $D'=1.0$ ) (<http://www.hapmap.org/index.html>). Estudios funcionales de este haplotipo han demostrado que reduce la expresión de *COMT* en cerebro humano (Bray NJ *et al.*, 2003, Dempster EL *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha descrito una elevada variabilidad entre los distintos grupos étnicos en cuanto a las relaciones de desequilibrio de ligamiento y a la configuración de bloques haplotípicos en *COMT*, por lo que sería necesaria la identificación de los polimorfismos y los haplotipos responsables de la asociación entre *COMT* y esquizofrenia en cada población (Palmatier MA *et al.*, 2004).

A partir de los genotipos de nuestra población pudimos inferir cuatro haplotipos, las frecuencias de los cuales no presentaron diferencias significativas entre casos y controles. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la región promotora P2 en la expresión de *COMT*, y parecen indicar que el polimorfismo -278A/G juega un papel más relevante que el polimorfismo *COMT* G158A en relación con el riesgo de esquizofrenia.

### 7.1.2 ESTUDIO N° 2: Asociación del polimorfismo A/G intrón 13 en el gen de la Monoamino Oxidasa B (MAO-B) con el riesgo de esquizofrenia en una población española.

- **En este estudio se ha identificado al alelo G como un factor de riesgo de esquizofrenia. Al realizar el análisis estratificando por sexo, el riesgo que confiere el alelo G a desarrollar la enfermedad sólo se mantuvo en las mujeres.**

En la enfermedad de Parkinson es donde más se ha estudiado el efecto de polimorfismos genéticos de la MAO-B. Sin embargo, los estudios de asociación de estos polimorfismos con el riesgo de sufrir trastornos mentales son realmente escasos. Recientemente, se ha publicado un estudio que encuentra asociación entre un haplotipo de la MAO-B, que incluye el polimorfismo A/G del intrón 13, y el riesgo de sufrir trastorno por déficit de atención e hiperactividad. Dado que se han llevado a cabo muy pocos estudios de asociación de este polimorfismo con el riesgo de esquizofrenia (*Coron B et al., 1996*) o con determinados comportamientos que presentan los pacientes esquizofrénicos (*Zammit S et al., 2004*), este estudio adquiere una mayor importancia.

En cerebro humano, el alelo G, del polimorfismo MAO-B A/G intrón 13, se ha asociado a una menor actividad de la enzima (*Balciuniene J et al., 2002*), lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio, ya que una menor actividad de la MAO daría lugar a una mayor disponibilidad de dopamina y, según la teoría hiperdopaminérgica de la esquizofrenia, un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. En nuestra población hemos encontrado una mayor frecuencia del alelo G en los pacientes con esquizofrenia o con trastornos relacionados. Aunque esta diferencia no fue significativa, al estratificar por diagnóstico separando los pacientes esquizofrénicos de los que sufren trastornos relacionados, y a pesar de reducir el tamaño muestral, el alelo G mostró ser un factor de riesgo de esquizofrenia (OR 2.3;  $p=0.006$ ). Este resultado indica la posible existencia de diferentes factores de riesgo para los diferentes diagnósticos relacionados con esta enfermedad.

Dado que el gen *MAO-B* está localizado en el cromosoma X, realizamos el análisis estadístico separando hombres y mujeres. Los resultados mostraron al alelo G como un factor de riesgo únicamente en mujeres (OR 2.6;  $p=0.01$ ). Aunque en hombres dicho alelo estaba sobrerrepresentado, las diferencias no fueron significativas. Hemos de tener en cuenta que, aunque las mujeres poseen dos copias del gen *MAO-B* (XX) y los hombres son hemicigotos constitutivos, es decir, sólo tienen una copia (XY), en el proceso de embriogénesis las mujeres inactivan uno de los cromosomas X, para igualar la dosis génica con los hombres, y por lo tanto actúan como hemicigotas funcionales. Sin embargo, en función de si el carácter es dominante o recesivo, el riesgo será mayor para las mujeres o para los hombres, respectivamente (*Strachan T and Read AP, 2004a*). El hecho de que se haya observado un mayor riesgo en mujeres que en hombres se podría atribuir también a otros factores, como por ejemplo la regulación de la actividad del promotor de *MAO-B* por parte de los estrógenos (*Zhang Z et al., 2006*).

Por otro lado, siguiendo el modelo de riesgo de adición alélica y tomando como referencia el valor de odds ratio de las mujeres homocigotas (OR 6.4), las heterocigotas deberían tener un valor de odds ratio cercano a 3. En cambio, el alelo G en heterocigosis no aumenta el riesgo de esquizofrenia. Esto es debido al proceso de inactivación del cromosoma X, ya que en una misma mujer encontraríamos líneas celulares en las que el alelo G ha sido desactivado y líneas celulares en las que el alelo desactivado ha sido el A. El grupo de mujeres heterocigotas, por lo tanto, es muy heterogéneo, lo que hace difícil saber cual es el alelo que se expresa y cual es su contribución al riesgo de la enfermedad.

**7.1.3 ESTUDIO N° 3:** *Asociación entre polimorfismos de los genes COMT, MAO y DAT y riesgo de desarrollar esquizofrenia y efectos extrapiramidales en pacientes tratados con antipsicóticos\*.*

- **No se ha encontrado asociación entre los polimorfismos MAO-A 30bp-VNTR, MAO-A T941G, DAT 40bp-VNTR ni DAT -67A/T y el riesgo de esquizofrenia. En el estudio de haplotipos tampoco pudimos asociar ninguno de ellos a un mayor o menor riesgo de desarrollar la enfermedad.**

Modelos de ratón *Knock-Out* para la MAO-A muestran un aumento de la agresividad en estos animales. Esto, junto al hecho de que los inhibidores selectivos de MAO-A sean eficaces en el tratamiento de la depresión, ha generado un gran interés en el papel que tiene esta enzima en el comportamiento, el humor y la personalidad (*Shih JC, 2007*). Los polimorfismos de la MAO-A, que se presentan en esta tesis doctoral, se han asociado a cambios en la actividad de la enzima, de manera que los individuos con el alelo 941T y el alelo de 3 repeticiones del 30bp-VNTR presentarían una menor actividad de la MAO-A (*Hotamisligil GS and Breakefield XO, 1991; Sabol SZ et al., 1998; Deckert J et al., 1999*). Además, el hecho de que este gen esté localizado en una posición cromosómica de riesgo para la esquizofrenia, según los resultados obtenidos en estudios de ligamiento (*Hovatta I et al.,*

\* En este apartado únicamente se comentaran los resultados negativos de los polimorfismos MAO-A 30bp-VNTR, MAO-A T941G, DAT 40bp-VNTR y DAT -67A/T obtenidos en el estudio de riesgo de esquizofrenia y que no se han presentado en los estudios N° 1 y N° 2.

1999; Williams NM et al., 1999), y de que participe en el metabolismo de la dopamina, hace que sea un gen candidato para la esquizofrenia, y explica que se hayan llevado a cabo múltiples estudios de asociación. Aunque Jönsson y col. (Jönsson EG et al., 2003) encontraron una modesta asociación entre los alelos cortos del polimorfismo 30bp-VNTR y el riesgo de esquizofrenia en hombres, la mayoría de trabajos no han conseguido resultados positivos para dicha asociación (Coron B et al., 1996; Syagailo YV et al., 2001; Norton N et al., 2002; Fan JB et al., 2004). De hecho, recientemente se ha publicado un meta-análisis en el que se incluyen todos estos trabajos, con el fin de aumentar el tamaño muestral y poder clarificar el papel de estos dos polimorfismos en la esquizofrenia (Li D and He L, 2008). Los resultados de este meta-análisis concuerdan con los obtenidos en nuestra población y parece que ninguna de estas variantes genéticas de la MAO-A está implicada en el desarrollo de esta enfermedad mental.

Dado que haplotipos formados por estos dos polimorfismos se han asociado a otras enfermedades mentales como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Xu X et al., 2007) o el trastorno bipolar (Müller DJ et al., 2007), nos planteamos estudiar la distribución de los haplotipos en nuestra población. Los dos marcadores presentaron un desequilibrio de ligamiento incompleto (D' Casos:0.93; D' Controles: 0.90) y se infirieron 6 haplotipos, las frecuencias de los cuales no mostraron diferencias significativas entre casos y controles.

En cuanto a los polimorfismos del transportador de dopamina, DAT, los resultados obtenidos en los múltiples estudios de asociación con diferentes trastornos psiquiátricos son variados. Aunque el alelo de 10 repeticiones del polimorfismo 40bp-VNTR se ha asociado al trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Cook EH et al., 1995), un estudio reciente no ha podido replicar dicha asociación (Ettinger U et al., 2006). Un meta-análisis realizado con seis estudios de caso-control no mostró asociación entre el polimorfismo 40bp-VNTR y la esquizofrenia (Gamma F et al., 2005). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestra población, ya que ninguno de los alelos o genotipos mostró ser un factor de riesgo para la esquizofrenia. El alelo T del polimorfismo situado en el promotor del gen (-67A/T) parece ser un factor de riesgo para el trastorno bipolar (Keikhaee MR et al., 2005; Ohadi M et al., 2007). En el mismo sentido, un estudio mostró una mayor frecuencia del alelo T en el grupo de pacientes esquizofrénicos, implicando así este polimorfismo en la etiopatogenia de la enfermedad (Khodayari N et al., 2004). En otro estudio, un haplotipo formado por varios polimorfismos situados en la región 5' del gen se ha asociado al riesgo de desarrollar esquizofrenia (Stöber G et al., 2006). Sin embargo, el polimorfismo -67A/T por si solo (sin formar parte del haplotipo) no fue identificado como un factor de riesgo de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en nuestra población están de acuerdo con los descritos en este último trabajo ya que tampoco encontramos asociación entre dicha variante genética y la esquizofrenia.

Coincidiendo con los resultados obtenidos en los análisis independientes de los dos polimorfismos, el estudio haplotípico no reveló asociación entre ninguno de los 5 haplotipos inferidos y el riesgo de sufrir esquizofrenia.

En base a nuestros resultados podemos decir que el metabolismo de la dopamina, mediado por la COMT y la MAO-B, tendría un papel más importante que el transporte de este neurotransmisor en el riesgo de desarrollar esquizofrenia. No obstante, a pesar de que no hayamos podido demostrar que el DAT esté implicado en el riesgo de la enfermedad, puede que existan otros polimorfismos en el gen que sí que determinen un mayor o menor riesgo. De hecho, un estudio reciente ha asociado otras variantes genéticas del DAT, diferentes a las presentadas en esta tesis doctoral, con el riesgo de esquizofrenia (Talkowski ME et al., 2008).

### 7.1.4 ESTUDIO N° 1, N° 2 Y N° 3: *Diseño del estudio.*

- **En nuestra población, las distribuciones de edad, sexo y hábito tabáquico presentaron diferencias significativas entre pacientes y controles.**

Antes de realizar el estudio de asociación entre los diferentes polimorfismos seleccionados y el riesgo de esquizofrenia, llevamos a cabo un análisis univariante para observar la distribución de las características sociodemográficas de casos y de controles. Se observaron diferencias significativas en las distribuciones de edad, sexo y hábito tabáquico. Por tanto, los análisis multivariantes realizados para valorar la posible asociación entre los polimorfismos de la COMT, de las MAOs y del DAT y el riesgo de esquizofrenia, fueron ajustados por estas variables sociodemográficas.

Las diferencias comentadas se deben a que nuestro grupo control, grupo de base hospitalaria reclutado en el servicio de traumatología, presenta una mayor edad promedio y un mayor número de mujeres que el grupo de casos, y como consecuencia una menor proporción de fumadores. Esto se debe a la mayor frecuencia de patologías traumáticas en personas de edad avanzada y, especialmente, en mujeres post-menopáusicas.

No obstante, no hay ninguna evidencia de que nuestra población control esté sesgada con respecto a los polimorfismos estudiados. Para empezar las frecuencias alélicas y

genotípicas de los polimorfismos estudiados en el grupo control reproducen las observadas en distintas poblaciones caucásicas (*Coron B et al., 1996; Rubie C et al., 2001; Norton N et al., 2002; Gamma F et al., 2005*). También es importante destacar que no se observó ninguna asociación entre los genotipos estudiados y la edad, el sexo o el hábito tabáquico en el grupo control. En el caso de los polimorfismos de las MAOs, dado que estos genes se localizan en el cromosoma X, se realizó el análisis estratificando las poblaciones por sexo. Finalmente, tampoco existe ninguna evidencia de que las patologías que afectan a los pacientes de traumatología estén asociadas con la variabilidad genética de los genes estudiados o con la susceptibilidad a la esquizofrenia.

Hay que destacar en el caso de la edad, que la esquizofrenia es una enfermedad de aparición temprana, por lo que controles de mayor edad son individuos con mayor resistencia para esta enfermedad y podrían considerarse como controles hiper-normales. El uso de este tipo de controles es una estrategia de diseño en los estudios caso-control que permite aumentar la eficiencia de estudios genéticos de asociación (*Morton NE and Collins A, 1998*).

## 7.2 ESTUDIO DE RIESGO DE EPS

---

**7.2.1 ESTUDIO N° 4:** *Polimorfismos del receptor de dopamina D2 (TaqIA, TaqIB, y -141C Ins/Del) y de la enzima metabolizadora de la dopamina (COMT G158A, A-278G) y síntomas extrapiramidales en pacientes esquizofrénicos y bipolares\*.*

- **Los resultados de este estudio muestran una asociación entre la susceptibilidad a los EPS y el polimorfismo G158A (Val158Met) de la COMT y de su haplotipo con el polimorfismo -278A/G. En dicha asociación tanto el alelo COMT 158A (COMT<sup>L</sup>) como el haplotipo A-A (con la variante normal del polimorfismo -278A/G y la defectiva del G158A) muestran un efecto protector para los EPS en el subgrupo de pacientes bipolares tratados con antipsicóticos.**

Debido al papel de la COMT en el metabolismo de las monoaminas y que su principal variante genética (Val158Met o G158A) es funcional, se han estudiado ampliamente diferentes polimorfismos localizados en este gen como posibles factores de riesgo de aparición de efectos adversos inducidos por los APs.

Polimorfismos en la COMT pueden contribuir al riesgo de EPS no sólo por su efecto biológico en la disponibilidad de dopamina en la sinapsis, sino también indirectamente por su efecto en la regulación de la dopamina en las complejas interacciones entre córtex prefrontal y estriado. El polimorfismo funcional (G158A) ha sido estudiado en esquizofrénicos con TD (Herken H et al., 2003; Matsumoto C et al., 2004; Lai IC et al., 2005; Kang SG et al., 2008) y también en relación con la susceptibilidad a los EPS, obteniéndose en ambos casos resultados negativos (Inada T et al., 2003). Los portadores del alelo A metabolizan la dopamina más lentamente que los homocigotos para el alelo normal, por lo que estos individuos podrían tener una mayor disponibilidad de dopamina. En esta situación, los APs tendrían que competir con una mayor cantidad de dopamina para unirse al receptor D<sub>2</sub>, por lo que tendrían una menor probabilidad de inducir EPS. Por lo tanto, el alelo A podría ser un factor de protección frente a los EPS. Los resultados obtenidos en nuestra población están de acuerdo con esta hipótesis.

\* Dado que en esta tesis doctoral se presentan los resultados del polimorfismo A-278G de la COMT y de su haplotipo con el polimorfismo G158A, sólo se comentaran los resultados obtenidos de dichos polimorfismos.

Cuando llevamos a cabo el análisis multivariante en el grupo entero de pacientes tratados con APs, el alelo de baja actividad mostró en heterocigotos una reducción del riesgo de EPS, de acuerdo con los resultados obtenidos por Kang AG y col (Kang AG et al., 2008). No obstante, después de realizar la corrección de Bonferroni la asociación dejó de ser significativa. Al estratificar nuestra población por diagnóstico, el riesgo dependiente de la COMT se mantuvo únicamente en pacientes bipolares, donde el alelo A se mostró como factor protector de EPS (OR 0.3;  $p=0.01$ )

El hecho de que el polimorfismo -278A/G se localice en el promotor P2 de la isoforma de la COMT predominante en cerebro, y de que pueda afectar la actividad enzimática (Chen J et al., 2004), hace que sea un polimorfismo de gran interés para el estudio de riesgo de EPS. Además, el hecho de que no existan estudios de asociación entre dicha variante genética y el riesgo de este efecto secundario hace que nuestro trabajo sea novedoso. Sin embargo, al realizar el estudio no obtuvimos diferencias significativas entre los pacientes que desarrollaron EPS y los que no presentaron esta sintomatología.

A pesar de que el polimorfismo del promotor no parece jugar ningún papel en el desarrollo de los EPS, llevamos a cabo el estudio de los haplotipos formados por los dos polimorfismos para ver si existía un haplotipo que confiriese un mayor riesgo de desarrollar extrapiramidalismo. No se observó desequilibrio de ligamiento entre los dos marcadores en ningún grupo ( $D'=0.4$  en el grupo entero de pacientes;  $D'=0.41$  en el subgrupo de esquizofrénicos y  $D'=0.53$  en los bipolares). Como consecuencia, se obtuvieron cuatro haplotipos de frecuencias bastante elevadas, las cuales concuerdan con las obtenidas en una población psiquiátrica caucásica similar (Funke B et al., 2005).

El análisis de haplotipos reveló una asociación entre el haplotipo A-G (los dos alelos normales de los polimorfismos -278A/G y G158A) y el riesgo de EPS en el subgrupo de bipolares. Por el contrario, el haplotipo A-A (con la variante normal del polimorfismo -278A/G y la defectiva del G158A) se asoció con la protección frente a los EPS en el mismo subgrupo. En el caso del haplotipo G-A (con los dos alelos defectivos), aunque éste fue predominante en el grupo de controles bipolares, las diferencias no fueron significativas. Esto muestra que el alelo G del polimorfismo G158A es el principal factor responsable del riesgo de EPS, mientras que el polimorfismo del promotor no parece modular el riesgo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los análisis independientes de cada polimorfismo. Además, los valores de  $D'$  muestran un bajo desequilibrio de ligamiento entre los dos marcadores por lo que existe una elevada probabilidad de que tenga lugar recombinación entre ellos, lo que explicaría su independencia mutua.

Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos en un estudio reciente en una población española (*Molero P et al., 2007*). Sus resultados muestran influencia del polimorfismo G158A en la respuesta al tratamiento con antipsicóticos, donde el alelo A estaba asociado a una peor respuesta. A pesar de que analizaron otros polimorfismos de la COMT, incluido el -278A/G (que también presentó un bajo desequilibrio de ligamiento con el G158A), fue el polimorfismo G158A el que presentó una mayor influencia en la respuesta a los APs.

El hecho de que las diferencias significativas se hayan obtenido únicamente en el subgrupo de pacientes bipolares remarca el diferente riesgo de EPS que poseen pacientes con diferentes diagnósticos. La literatura sugiere que los pacientes bipolares tienen un mayor riesgo de desarrollar EPS y TD que los esquizofrénicos cuando son tratados con APs (*Cavazzoni PA et al., 2006; McIntyre RS and Konarski JZ, 2005*). En este subgrupo no se encontraron diferencias significativas de potencia ni dosis de AP entre casos y controles. Esto indica que los bipolares podrían tener diferentes factores de riesgo o un peso diferente para un mismo factor. De acuerdo con la teoría de la dopamina en la esquizofrenia (*Weinberg D, 2003*), podría haber un exceso de este neurotransmisor en los cerebros de pacientes esquizofrénicos, incluido el estriado, zona donde se generan los EPS. En estos pacientes, las posibles variaciones en los niveles de dopamina inducidas por los polimorfismos de la COMT, podrían no tener una gran repercusión en la protección del receptor frente al bloqueo por los antipsicóticos. Por el contrario, en pacientes bipolares, estos polimorfismos sí que podrían contribuir al riesgo de EPS, ya que el incremento de dopamina que parece existir en la fase maníaca (*Berk M et al., 2007*) no sería comparable al exceso de actividad dopaminérgica de los pacientes esquizofrénicos. En este caso, pequeñas modificaciones en los niveles de dopamina podrían ser críticas. No obstante, hay que tener en cuenta que los datos de inducción de EPS por APs, especialmente por los atípicos, en pacientes bipolares son limitados, ya que el tratamiento de los trastornos del estado del ánimo con estos fármacos se ha aplicado recientemente. Por lo tanto, el menor riesgo de EPS que presentan los portadores del alelo A, de baja actividad, es una información clínica crucial para el control de esta sintomatología secundaria en bipolares.

Esta es la primera vez que se encuentra una asociación entre el polimorfismo de la COMT y la susceptibilidad a EPS.

**7.2.2 ESTUDIO N° 5:** *Falta de asociación entre efectos extrapiramidales inducidos por antipsicóticos y polimorfismos en genes que participan en el metabolismo y transporte de la dopamina.*

- **En este estudio no se ha encontrado asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados de la MAO-A (30bp-VNTR, 941T/G), MAO-B (A/G intrón 13), ni del DAT (40bp-VNTR, -67A/T) y la susceptibilidad a los EPS. En el estudio haplotípico de estos genes, tampoco se observó ningún haplotipo que fuera más o menos frecuente en pacientes con EPS respecto a los que no presentaron esta sintomatología.**

Con excepción del DAT 40bp-VNTR, ninguno de los polimorfismos candidatos analizados se había relacionado con síntomas extrapiramidales a corto plazo en la literatura. Recientemente, Güzey y col. (Güzey C et al., 2007) encontraron asociación entre el alelo de 9 repeticiones del DAT y el riesgo de EPS (OR 1.9; 95% CI; p=0.03). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestra población no pudieron replicar esos resultados y no se encontró ninguna asociación entre ninguno de los alelos del polimorfismo DAT 40bp-VNTR y el riesgo de extrapiramidalismo. Diferentes factores pueden explicar las diferencias obtenidas entre nuestro estudio y el de Güzey. En su estudio no se llevó a cabo una corrección de las múltiples comparaciones realizadas (con la corrección de Bonferroni debería haber considerado una significancia del 0.007), y aunque se incluyeron diferentes tipos y dosis de AP, todos ellos eran APs típicos. Además, este polimorfismo ha sido estudiado por otros autores en relación a los síndromes tardíos, principalmente la TD (Segman RH et al., 2003; Srivastava V et al., 2006), y con la respuesta a los APs (Szekeress G et al, 2004), y todos ellos han obtenido resultados negativos.

Con respecto al resto de polimorfismos estudiados, DAT -67A/T, MAO-A 30bp-VNTR, MAO-A 941T/G y MAO-B A/G intrón 13, no hemos encontrado ninguna evidencia que respalde la participación de ninguno de ellos en la predisposición o protección de los EPS. Además del análisis multivariante con cada una de estas variantes genéticas, llevamos a cabo el estudio haplotípico de los polimorfismos del DAT y de la MAO-A. Al realizar el cálculo de desequilibrio de ligamiento, tanto en los casos como en los controles, se observó un incompleto desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos de la MAO-A (D' casos: 0.76; D' controles: 0.89), mientras que no se observó desequilibrio de ligamiento entre los marcadores del DAT (D' casos: 0.17; D' controles: 0.04). Se infirieron 6 haplotipos formados

a partir de los dos polimorfismos de la MAO-A y 5 haplotipos a partir de los dos del DAT, con frecuencias, todos ellos, superiores al 1%. Ninguno de los haplotipos mostró asociación con el riesgo de aparición de EPS.

A pesar de que no se han llevado a cabo estudios de asociación entre estos polimorfismos y el riesgo de extrapiramidalismo, algunos autores han explorado el papel de la variabilidad genética de la MAO en la respuesta a los APs sin encontrar resultados positivos con respecto a la eficacia (Tybura P *et al.*, 2006) o al riesgo de TD (Matsumoto C *et al.*, 2004). Sólo un estudio describió una discreta interacción entre el alelo de 3 repeticiones del polimorfismo MAO-A 30bp-VNTR con el polimorfismo Val158Met de la COMT y una baja respuesta a los APs (OR 6.16 p=0.04) (Illi A *et al.*, 2003).

Aunque no hemos encontrado asociación entre las variantes genéticas seleccionadas y el riesgo de EPS, hay que tener en cuenta que sólo hemos estudiado una pequeña parte de todos los genes relacionados con el sistema dopaminérgico, por lo que muchos otros genes, relacionados tanto con este sistema como con otros, serían candidatos y podrían participar en el riesgo de aparición de extrapiramidalismo. Además, otros polimorfismos localizados en los mismos genes que hemos estudiado, que no estuvieran en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos seleccionados, podrían estar asociados a los EPS. Con el rápido progreso del HapMap-Project, la información sobre las estructuras haplotípicas del genoma humano está aumentando considerablemente, por lo que puede ser que en poco tiempo podamos encontrar, en nuestra población, asociación entre otras estructuras haplotípicas de los mismos genes que hemos estudiado y el riesgo de EPS.

### 7.2.3 ESTUDIO N° 4 Y N° 5: *Diseño del estudio.*

- **En nuestra población, el diagnóstico y la edad de los pacientes, así como la potencia y dosis del antipsicótico, resultaron ser factores de riesgo de EPS.**

Los estudios de farmacogenética en psicofarmacología son de gran complejidad debido a los múltiples diagnósticos, tratamientos y dosis utilizadas, así como al gran número de factores de confusión (duración del tratamiento, medicación concomitante, medicaciones previas y cumplimiento terapéutico). Es importante conocer estos factores para determinar cuales de ellos podrían suponer un riesgo al desarrollo de EPS y así poderlos tener en cuenta a la hora de valorar el riesgo individual que confiere cada uno de los polimorfismos estudiados.

En los estudios presentados, los análisis multivariantes realizados para valorar la posible asociación entre los polimorfismos de la COMT, de las MAOs y del DAT y el riesgo de extrapiramidalismo, fueron ajustados por diagnóstico y edad del paciente, así como por la potencia y la dosis del antipsicótico.

En los últimos años se ha producido un incremento en el uso de APs en pacientes bipolares tanto en fases maníacas como en las depresivas. Aproximadamente, el 90% de los episodios maníacos son tratados con una combinación de fármacos estabilizadores del ánimo y fármacos APs, especialmente los atípicos (*Miller DS et al., 2001; Berk M and Seetal D, 2005; Calabrese JR et al., 2005*). Aunque en un primer momento se podría pensar que el diagnóstico de un paciente tratado con APs no debería influir en el riesgo de EPS, estudios han revelado que los pacientes bipolares tienen un mayor riesgo de desarrollar EPS y TD que los esquizofrénicos cuando son tratados con APs (*Cavazzoni PA et al., 2006; McIntyre RS and Konarski JZ, 2005*). En nuestra población, si comparamos el porcentaje de pacientes esquizofrénicos que desarrollan EPS (25.12%) con el de bipolares (52.3%) observamos que existe una gran diferencia. Al realizar el análisis univariante se confirma que estas diferencias son significativas (OR 3.2;  $p=0.001$ ) y que en nuestra población estar diagnosticado con trastorno bipolar supone un factor de riesgo de EPS.

En nuestro estudio, la edad mostró ser un factor de protección contra los EPS. Estudios de receptores realizados con la técnica PET han demostrado que existe asociación significativa entre el número de receptores  $D_2$  y la edad. Como el riesgo de extrapiramidalismo depende de la ocupación de los receptores  $D_2$ , una edad joven sería un factor de riesgo de EPS (*Lewis R, 1998*). Este hecho se ha confirmado en nuestro estudio, ya que las diferencias de edad entre casos ( $32.6\pm 13$ ) y controles ( $37.6\pm 16$ ) son significativas. En nuestra población tener menos de 31 años supone el doble de riesgo de desarrollar EPS (OR 2.3;  $p=0.01$ ).

Los pacientes de nuestro estudio fueron tratados con múltiples fármacos antipsicóticos. El más utilizado fue la risperidona (60% de los casos y el 44% de los controles). Los distintos fármacos antipsicóticos presentan potencias diferentes, es decir, capacidades diferentes de bloquear los receptores dopaminérgicos. Los APs de elevada potencia generalmente están asociados a un mayor riesgo de provocar extrapiramidalismo. En nuestro estudio la distribución de los APs según su potencia para producir EPS es diferente entre casos y controles, con un mayor porcentaje de los de baja potencia, como la clozapina, olanzapina, ziprasidona y quetiapina, en los controles (48% vs. 11%), y una mayor proporción de APs de elevada potencia, como el haloperidol y la trifluoroperazina, en los casos (16% vs.

5%). El análisis univariante indica que un paciente tratado con un AP de potencia media tiene un riesgo seis veces mayor de desarrollar EPS ( $p < 0.001$ ) y si se trata con un AP de potencia alta el riesgo es considerablemente superior (OR 13;  $p < 0.001$ ).

Además de ser tratados con diferentes tipos de APs, los pacientes recibieron múltiples dosis. Para intentar homogeneizar los datos en los análisis estadísticos, hicimos un cálculo de equivalencia de dosis mediante el cálculo de dosis equivalentes de clorpromazina (CEDD) para los APs típicos y atípicos. Este cálculo es un procedimiento común en los estudios de psicofarmacología y han sido usados en múltiples estudios de farmacogenética (*Murray M, 2006, Ozdemir V et al, 2004*). Además, las CEDD fueron categorizadas en tres grupos (dosis alta, media y baja). Al realizar el análisis estadístico se pudo comprobar que las dosis medias y altas triplicaban el riesgo de sufrir EPS ( $p = 0.004$  y  $p = 0.009$ , respectivamente). Dado que la capacidad de producir extrapirimalismo se ha relacionado con la ocupación de los receptores  $D_2$  estriatales, una mayor dosis de AP ejercerá una mayor ocupación de los mismos y por lo tanto incrementará el riesgo de aparición de estos trastornos motores. El hecho de que los APs atípicos cuando se administran a dosis elevadas sean capaces de producir EPS, justifica que la dosis sea un factor de riesgo para este efecto secundario (*Casey DE, 2004*).

### **7.3 DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE GENOTIPADO MULTIPLEX**

El genotipado de polimorfismos VNTR, mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, implica un consumo importante de tiempo y en muchas ocasiones resulta difícil diferenciar unos alelos de otros. Dado que debíamos genotipar dos polimorfismos VNTR, de la MAO-A y del DAT, nos planteamos diseñar un método de PCR multiplex con electroforesis capilar que permitiera optimizar el genotipado de las muestras. La PCR multiplex, permitió reducir el tiempo de PCR ya que la amplificación de los fragmentos que incluían los dos polimorfismos se realizó en el tiempo que se habría empleado para amplificar uno sólo. La electroforesis capilar permitió separar los fragmentos amplificados con mayor rapidez y mayor eficiencia, ya que mediante el uso de un marcador de peso molecular se pudieron identificar los diferentes picos de manera automatizada.

La validación del método se realizó mediante el genotipado, por métodos anteriormente descritos (*Deckert J et al., 1999; Lafuente A, 2007*), de 100 muestras que sirvieron como muestras control. Obtuvimos una concordancia del 100% para ambos polimorfismos.

Esta metodología podría constituir una técnica para los análisis hospitalarios en el futuro, ya que permite realizar un genotipado de este tipo de polimorfismos de manera automatizada, rápida, precisa y económica. Además, existe la posibilidad de añadir más polimorfismos sin casi aumentar el precio final del análisis. La puesta a punto y el uso de este tipo de métodos de genotipado son de gran interés cuando se quiere utilizar de forma rutinaria en la práctica clínica, ya que se pueden seleccionar los polimorfismos que se quieren analizar, no hace falta genotipar un gran número de muestras al mismo tiempo, la infraestructura que requiere es habitual en los laboratorios clínicos, y lo más importante, se necesita muy poco tiempo para la obtención de los resultados, siendo éstos muy fiables.

#### **7.4 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS DE RIESGO DE ENFERMEDADES Y DE LOS ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS**

Si observamos datos sobre la eficacia de los tratamientos utilizados actualmente, veremos que aún queda un largo camino hasta llegar a tener tratamientos ideales para todas las enfermedades. Según datos proporcionados por la OMS, sólo 1/4 de las patologías se tratan con una terapia adecuada y además 1/3 de las terapias adecuadas dan lugar a efectos adversos que pueden llevar al fracaso terapéutico. Todo ello conlleva un importante gasto económico que también se ha de tener en cuenta (*Lazarou J et al, 1998*).

En el caso de enfermedades en las que todavía no existe terapia propia o bien en las que se prescribe fármacos poco eficaces, el estudio de las bases genéticas y moleculares para la identificación de nuevas dianas terapéuticas resulta imprescindible. Los estudios de farmacogenómica se centran en el descubrimiento de estas dianas pero también buscan marcadores periféricos que ayuden al diagnóstico y pronóstico de las enfermedades. Otro aspecto importante de la farmacogenómica es la identificación de variantes genéticas de susceptibilidad de enfermedades, que ayuda a realizar terapias preventivas en los individuos de riesgo o bien instaurar estilos de vida más apropiados. En el caso de la esquizofrenia, conociendo los factores de riesgo genéticos, sería más fácil concienciar al individuo que debe evitar al máximo determinados factores de riesgo ambientales, como el estrés o el consumo de sustancias de abuso.

Finalmente, la farmacogenómica, en ocasiones, puede proporcionar un mejor entendimiento de la etiopatogenia de la enfermedad. El estudio de riesgo de esquizofrenia que se presenta en esta tesis doctoral ha podido detectar dos polimorfismos que posiblemente tengan una influencia en el desarrollo de la enfermedad. Estos hallazgos ayudarán a establecer el patrón de riesgo genético, no sólo de la esquizofrenia, sino también de otras muchas enfermedades que tengan un componente genético.

La farmacogenética actuaría a otro nivel. La ausencia de predictores clínicos de la respuesta a los antipsicóticos hace que la selección de la medicación y las dosis óptimas se base en una estrategia de prueba y error que puede durar un tiempo considerable (*Johnson JA, 2003*). Durante este periodo los pacientes se exponen a un elevado riesgo de padecer recaídas, ineficacia con respecto a determinados síntomas de la enfermedad, problemas sociales e incluso de cometer suicidio. Además, la ineficacia del tratamiento llevaría a un prolongamiento del estado psicótico del paciente que podría ser altamente tóxico y complicaría el curso futuro de la enfermedad dando lugar a una peor respuesta farmacológica

(Batel P, 2000). Los estudios de farmacogenética pueden ayudar a mejorar esta situación ofreciendo predictores de la respuesta al tratamiento.

Estudiando el perfil genético de cada paciente se podrá predecir la respuesta a un fármaco en concreto o si es propenso a desarrollar determinados efectos secundarios. De esta manera se podrá seleccionar el mejor tratamiento para cada uno de ellos. Prescribiendo una terapia más individualizada se conseguirá disminuir el periodo en el que la enfermedad está insuficientemente controlada o incontrolada, reduciendo los riesgos de ineficacia o toxicidad y aumentando el cumplimiento por parte del paciente. Todo ello además llevaría a una reducción importante de los costes sanitarios (Johnson JA, 2003).

En el estudio de riesgo de EPS hemos detectado un polimorfismo y un haplotipo, que incluye dicho polimorfismo, que confieren riesgo de desarrollar este efecto secundario. Esta información debería ser utilizada para seleccionar el fármaco más apropiado y la dosis más adecuada.

La ventaja de utilizar un test genético como predictor de riesgo es que se realiza una única vez en cualquier momento de la vida del paciente y el resultado permanece invariable para siempre. Además, la obtención de la muestra, como por ejemplo sangre periférica o saliva, no resulta un método invasivo. Los avances en las técnicas moleculares han permitido que el genotipado sea mucho más asequible, a nivel tanto económico como del procesado de la muestra, facilitando así su inclusión en los ensayos clínicos y en la práctica clínica rutinaria.

En un futuro cercano, gracias a los estudios farmacogenómicos y farmacogenéticos se podrán diseñar diferentes tests genéticos que, aunque no realicen predicciones con un 100% de certeza, serán una herramienta clave a la hora de realizar una medicina personalizada que será mucho más eficaz y segura.



## **8. CONCLUSIONES**



1. Los individuos heterocigotos AG para el polimorfismo COMT -278A/G presentan una reducción del 60% en el riesgo de sufrir esquizofrenia y trastornos relacionados.
2. El alelo G del polimorfismo MAO-B A/G intrón 13 duplica el riesgo de esquizofrenia. Al estratificar por sexo, el alelo G se comporta como factor de riesgo únicamente en mujeres, donde las heterocigotas GG muestran seis veces más riesgo de sufrir la enfermedad.
3. El haplotipo formado por los polimorfismos COMT -278A/G y COMT G158A, así como los polimorfismos MAO-A 30bp-VNTR, MAO-A 941T/G, DAT 40bp-VNTR, DAT -67A/T y sus respectivos haplotipos, no afectaron al riesgo de sufrir esquizofrenia.
4. El haplotipo formado por los polimorfismos COMT -278A/G y COMT G158A está asociado a la aparición de EPS inducidos por antipsicóticos únicamente en el grupo de pacientes con trastorno bipolar y no en el de pacientes esquizofrénicos.
5. Los polimorfismos MAO-A 30bp-VNTR, MAO-A 941T/G, MAO-B A/G intrón 13, DAT 40pb-VNTR, DAT -67A/T y sus respectivos haplotipos, así como el polimorfismo COMT -278A/G, no modificaron el riesgo de sufrir EPS inducidos por APs.
6. En el estudio de riesgo de EPS, la edad actuó como factor protector, viéndose duplicada la posibilidad de presentar dicho efecto adverso en edades inferiores a 31 años. En cambio, el diagnóstico, así como la dosis y la potencia del AP, mostraron ser factores de riesgo.
7. Las prevalencias de los genotipos COMT -278A/G, MAO-A 30bp-VNTR, MAO-A 941T/G, MAO-B A/G intrón 13, DAT 40pb-VNTR y DAT -67A/T obtenidas en la población general de referencia de nuestro estudio, han resultado ser similares a las descritas en otras poblaciones caucásicas.
8. Los resultados del genotipado obtenidos con la técnica diseñada para la detección conjunta de los polimorfismos MAO-A 30bp-VNTR y DAT 40bp-VNTR han presentado una total concordancia con los obtenidos con otras técnicas validadas.



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



1. Abi-Dargham A and Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotics drugs in schizophrenia. Insights from brain imaging studies. *Eur. Psychiatry*. 2005;20:15-27.
2. Academic Highlights. The Scourge of EPS: Have atypical antipsychotics solved the problem. *J Clin Psychiatry*. 2000;61(12):955-962.
3. American Psychiatric Association. Practice Guideline for the treatment of patients with schizophrenia, 2nd edition. Washington, DC. American Psychiatric Association, 2004.
4. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., text revision. Washington DC. American Psychiatric Association, 2000.
5. Aparici M. Polimorfismos en los receptores dopaminérgicos D2 y D3, y en el transportador de dopamina DAT, y su relación con el riesgo de síntomas extrapiramidales por antipsicóticos y con el riesgo de esquizofrenia. Tesis Doctoral. 2006.
6. Badner JA and Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2002;7(4):405-11.
7. Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L, Petterson U, Jazin EE: Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum Genetics*. 2002;110 (1):1-7.
8. Baldesarini RJ and Tarazi FI. Pharmacotherapy of psychosis and mania. In Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. Brunton LL, Lazo JS and Parker KL. 11th edition. Ed. McGraw-Hill. New York. 2006. pp 461-500.
9. Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, Sacchetti P. The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2001;11(6):449-55.
10. Barnes TRE and Spence SA. Movement disorders associated with antipsychotic drugs: clinical and biological implications. In: *The Psychopharmacology of schizophrenia*. Revely MA & Deakiu JFW. Annad editorial. London. 2000. pp 178-210.
11. Batel P. Addiction and schizophrenia. *Eur. Psychiatry*. 2000;15:115-122.
12. Berk M and Seetal D. Efficacy of atypical antipsychotics in bipolar disorder. *Drugs*. 2005;65:257-269.

13. Berk M, Dodd S, Kauer-Sant'anna M, Malhi GS, Bourin M, Kapczinski F, Norman T. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 2007;(434):41-9.
14. Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, Williams HJ, Norton N, Owen MJ, O'Donovan MC. A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. *Am J Hum Genet* 2003;73:152-61.
15. Brookes KJ, Neale BM, Sugden K, Khan N, Asherson P, D'Souza UM. Relationship between VNTR polymorphisms of the human dopamine transporter gene and expression in post-mortem midbrain tissue. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(8):1070-8.
16. Buckley PF. Update on the treatment and management of schizophrenia and bipolar disorder. *CNS Spectr.* 2008;13(2 Suppl 1):1-10; quiz 11-2.
17. Calabrese JR, Elhaj OE, Gajwani P, Gao k. Clinical Highlights in bipolar depression. Focus on atypical antipsychotics. *J. Clin. Psychiatry.* 2005;66(suppl. 5):26-29.
18. Carr DB and Sesack SR. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral segmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of Neuroscience.* 2000;20:3864-3873.
19. Casey DE. Pathophysiology of antipsychotic drug-induced movement disorders. *J Clin Psychiatry.* 2004;65 Suppl 9:25-8.
20. Cavazzoni PA, Berg PH, Kryzhanovskaya LA, Driggs SD, Roddy TE, Tohen M, Kane JM. Comparison of treatment emergent extrapyramidal symptoms in patients with bipolar mania or schizophrenia during olanzapine clinical trials. *Journal of Clinical Psychiatry.* 2006;67:107-113.
21. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet.* 2004;75:807-821.
22. Cook EH, Stein MA, Kraswoski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE and Leventhal BL. Association and linkage of attention deficit disorder to the dopamine transporter gene. *Am. J Hum Genet.* 1995;56:993-998.
23. Coron B, Campion D, Thibaut F, Dollfus S, Preterre P, Langlois S, Vasse T, Moreau V, Martin C, Charbonnier F, et al. Association study between schizophrenia and monoamine oxidase A and B DNA polymorphisms. *Psychiatry Res* 1996;62:221-226.

24. Costa-Mallen P, Keleda SN, Costa LG, Checkoway H. Characterization of the in vitro transcriptional activity of polymorphic alleles of the human monoamine oxidase-B gene. *Neurosci Lett* 2005;383(1-2):171-175.
25. Crescenti A, Gassó P, Mas S, Abellana R, Deulofeu R, Parellada E, Bernardo M, Lafuente A. Ins/Del polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme (ACE) gene is associated with schizophrenia in a Spanish population. *Psychiatr Res.* 2008a. PSY-D-07-00410R1.
26. Crescenti A, Mas S, Gassó P, Parellada E, Bernardo M, Lafuente A. CYP2D6 \*3, \*4, \*5 and \*6 polymorphisms and antipsychotic-induced extrapyramidal side effects in patients receiving antipsychotic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008b;35(7):807-11.
27. Crescenti A. Estudio de la relación de los polimorfismos de los genes ECA, COMT y CYP2D6 con el riesgo de desarrollar síntomas extrapiramidales por antipsicóticos y el riesgo de esquizofrenia. Tesis 2007.
28. Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, Nöthen MM, Maffei P, Franke P, Fritze J. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet.* 1999;8(4):621-4.
29. Dempster EL, Mill J, Craig IW, Collier DA. The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue: diagnosis, genotype, methylation and expression. *BMC Medical Genetics.* 2006;7:10.
30. Diez-Martin J, Hoenicka J, Martinez I, Aragües M, Rodríguez-Jiménez R, Jiménez-Arriero MA, Ponce G, Rubio G, Palomo T. Polimorfismo Val<sup>158</sup>Met de COMT y esquizofrenia: estudio de asociación en una muestra de pacientes españoles. *Med Clin (Barc).* 2007;128(2):41-4.
31. Domschke K, Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, O'sullivan R, Freitag C, Becker T, Conroy J, Fitzgerald M, et al. Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;134B(1):110-4.
32. Dubovsky SL, Davies R, Dubovsky AN. Trastornos del estado del ánimo. En: *Fundamentos de Psiquiatría clínica.* Hales RE, Yudofsky SC. Ed. Madsson, 2ª edición. 2005.pp 259-360.

33. Dudbridge F. UNPHASED user guide. Technical report 2006/5, MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK, 2006.
34. Ettinger U, Joobar R, DE Guzman R, O'driscoll GA. Schizotypy, attention deficit hyperactivity disorder, and dopamine genes. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2006;60(6):764-7
35. Fan JB, Yang MS, Tang JX, He L, Xing YL, Shi JG, Zhao SM, Zhu SM, Ji LP, Gu NF, et al. Family-based association study of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism and schizophrenia. *Schizophr Res.* 2004;67(1):107-9.
36. Fan JB, Zhang CS, Gu NF, Li XW, Sun WW, Wang HY, Feng GY, St Clair D, He L. Catechol-O-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia: a large-scale association study plus meta-analysis. *Biol Psychiatry.* 2005;57(2):139-44.
37. Flórez J. Fármacos antipsicóticos neurolépticos. En: *Farmacología Humana*. Flórez J., Armijo JA, Mediavilla A. Ed. Elsevier Masson. 5ª edición. Barcelona. 2008. pp 629-645.
38. Fowler JS, Logan J, Volkow ND, Wang GJ. Translational neuroimaging: positron emission tomography studies of monoamine oxidase. *Mol Imaging Biol.* 2005;7(6):377-87.
39. Fuke S, Sasagawa N, Ishiura S. Identification and characterization of the Hesr1/Hey1 as a candidate trans-acting factor on gene expression through the 3' non-coding polymorphic region of the human dopamine transporter (DAT1) gene. *J Biochem.* 2005;137(2):205-16.
40. Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J.* 2001;1(2):152-6.
41. Funke B, Malhorta AK, Finn CT, Plocik AM, Lake SL, Lencz T, De Rosse P, Kane JM, Kucherlapati R. COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: a case control study. *Behav. Brain Funct.* 2005;1:1-9.
42. Gamma F, Faraone SV, Glatt SJ, Yeh YC, Tsuang MT. Meta-analysis shows schizophrenia is not associated with the 40-base-pair repeat polymorphism of the dopamine transporter gene. *Schizophr Res.* 2005;73(1):55-8.
43. García-Sevilla JA y Meana JJ. Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. En: *Farmacología Humana*. Flórez J., Armijo J.A., Mediavilla A. Ed. Elsevier Masson. 5ª edición. Barcelona. 2008. pp 295-320.

44. Gardner DM, Baldessarini RJ, Waraich P. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *Can Med Assoc J.* 2005;172:1703-1711.
45. Garpenstrand H, Ekblom J, Forslund K, Rylander G, Oreland L: Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype. *J Neural Transm.* 2000;107(5):523-530.
46. Gastó C. Esquizofrenia y trastornos afectivos: Avances en el diagnóstico y la terapéutica. Ed. Médica panamericana. 2007. p3.
47. Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT. Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies. *Am J Psychiatry.* 2003;160(3):469-76.
48. Gottesman II. Schizophrenia genesis: the origins of madness. Henry Holt & Company Inc. New York, NY, USA. 1991; p296.
49. Greenwood TA and Kelsoe JR. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics.* 2003;82(5):511-20.
50. Güzey C, Scordo MG, Spina E, Landsem VM, Spigset O. Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia: associations with dopamine and serotonin receptor and transporter polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63(3):233-41.
51. Harrison PJ and Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet.* 2003;361(9355):417-9.
52. Harrison PJ and Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry.* 2005;10:40-68.
53. Herken H, Erdal ME, Böke Ö, Savas HA. Tardive dyskinesia is not associated with the polymorphisms of 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene, serotonin transporter gene and catechol-O-methyltransferase gene. *Eur Psychiatry.* 2003;18:77-81.
54. Ho B-Ch, Black DW, Andreasen NC. Esquizofrenia y otros trastornos psicóticos. En: *Fundamentos de Psiquiatría clínica.* Hales RE, Yudofsky SC. Ed. Madsson. 2ª edición. 2005.pp 201-257.
55. Ho SL, Kapadi AL, Ramsden DB, Williams AC. An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995;37:403-405.
56. Holmes A, Lachowicz JE, Sibley DR. Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacology.* 2004;47:1117-1134.

57. Hotamisligil GS and Breakefield XO. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet.* 1991;49(2):383-92.
58. Hovatta I, Varilo T, Suvisaari J, Terwilliger JD, Ollikainen V, Arajärvi R, Juvonen H, Kokko-Sahin ML, Väisänen L, Mannila H, et al. A genomewide screen for schizophrenia genes in an isolated Finnish subpopulation, suggesting multiple susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 1999;65(4):1114-24.
59. <http://www.iladiba.com> (Revista Latinoamericana Virtual).
60. <http://www.hapmap.org/index.html>
61. Huang SY, Lin MT, Shy MJ, Lin WW, Lin FY, Lu RB. Neither single-marker nor haplotype analyses support an association between monoamine oxidase A gene and bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2008;258(6):350-6.
62. Huotari M, Santha M, Lucas LR, Karayiorgou M, Gogos JA, Mannisto PT. Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-O-methyl-transferase-disrupted mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2002;303(3):1309-1316.
63. Hyman SE. A glimmer of light for neuropsychiatric disorders. *Nature.* 2008;455(7215):890-3.
64. Illi A, Mattila KM, Kampman O, Anttila S, Roivas M, Lehtimäki T, Leinonen E. Catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase A genotypes and drug response to conventional neuroleptics in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol.* 2003;23(5):429-34.
65. Inada T, Nakamura A, Iijima Y. Relationship between catechol-O-methyltransferase polymorphism and treatment-resistant schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.* 2003;120B:35-39.
66. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med.* 2001;250:186-200.
67. Jarskog LF, Miyamoto S, Lieberman JA. Schizophrenia: new pathological insights and therapies. *Annu Rev Med.* 2007;58:49-61.
68. Johnson JA. Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends Genet.* 2003;19:660-666.
69. Jones HM and Pilowsky LS. Dopamine and antipsychotic drug action revised. *Br J Psychiatry.* 2002;181:271-275.

70. Jönsson EG, Norton N, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Asberg M, Owen, Kahn DA, Keck PE, Perlis RH, Otto M.W, Ross R. Treatment of Bipolar Disorder: A Guide for patients and Families. Expert Consensus Guideline Series. 2004. pp 109-116.
71. Kane JM. Extrapyramidal side effects are unacceptable. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2001;11(suppl. 4):s397-s403.
72. Kang SG, Choi JE, Park YM, Lee HJ, Han C, Kim YK, Kim SH, Lee MS, Joe SH, Jung IK, Kim L. Val158Met polymorphism in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene is not associated with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 2008;57(1-2):22-5.
73. Kapur S and Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003;27:1081-1090.
74. Kapur S and Remington G. Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. *Annu. Rev. Med.* 2001;52: 503-517.
75. Kapur S and Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine D<sub>2</sub> receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry.* 2001;158:360-369.
76. Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF. 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex; reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. *Journal of Neurochemistry.* 1994;63:972-979.
77. Kasper S, Tauscher J, Küfferle CB, Pezawas L, Quiner S. Dopamine- and serotonin-receptors in schizophrenia: results of imaging-studies and implications for pharmacotherapy in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1998;249(suppl. 4): IV/83-IV/89.
78. Keikhaee MR, Fadaei F, Sargolzaee MR, Javanbakht A, Najmabadi H, Ohadi M. Association analysis of the dopamine transporter (DAT1) -67A/T polymorphism in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;135B(1):47-9.
79. Kelly DL, Conley RR, Carpenter WT. First-episode schizophrenia. A focus on pharmacological treatment and safety considerations. *Drugs.* 2005;65:1113-1138.

80. Khodayari N, Garshasbi M, Fadaei F, Rahimi A, Hafizi L, Ebrahimi A, Najmabadi H, Ohadi M. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) core promoter polymorphism -67T variant with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;129B(1):10-2.
81. Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ. Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1440-8.
82. Krausz M. Efficacy review of antipsychotics. *Curr Med Res Opin.* 2002;18: s8-s12.
83. Kulisevsky J and Otermin P. Antipsicóticos y efectos extrapiramidales. *Neurología.* 2003;18:262-268.
84. Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD: Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1993;33:368-372.
85. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics.* 1996;6:243-250.
86. Lafuente A, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Aparici M, Gassó P, Catalan R, Mateos J, Lomeña F, Parellada E. Dopamine transporter (DAT) genotype (VNTR) and phenotype in extrapyramidal symptoms induced by antipsychotics. *Schizophr Res.* 2007;90(1-3):115-22.
87. Lafuente A, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Aparici M, Gassó P, Goti J, Sanchez V, Catalan R, Carne X. -141C Ins/Del polymorphism of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia in a Spanish population. *Psychiatr Genet.* 2008;18(3):122-7.
88. Lafuente MJ, Casterad X, Trias M, Ascaso C, Molina R, Ballesta A, Zheng S, Wiencke JK, Lafuente A. NAD(P)H: quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis.* 2000;21:1813-1819.
89. Lai IC, Wang YC, Lin CC, Bai YM, Liao DL, Yu SC, Lin CY, Chen JY, Liou YJ. Negative association between Catechol-O-methyltransferase (COMT) gene Val158Met polymorphism and persistent tardive dyskinesia in schizophrenia. *J Neural Transm.* 2005;112:1107-1113.
90. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA.* 1998;279(15):1200-5.

91. Lewin B. The content of the genome. In: Genes VIII. Ed. Pearson Pentice Hall. 8th edithion. 2004. pp 51-83.
92. Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2003;73(1):34-48.
93. Lewis DA and Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron.* 2000;28:325-334.
94. Lewis R. Typical and atypical antipsychotics in adolescent schizophrenia: efficacy, tolerability, and differential sensitivity to extrapyramidal symptoms. *Canadian Journal of Psychiatry.* 1998;43:596-604.
95. Li D and He L. Meta-study on association between the monoamine oxidase A gene (MAOA) and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(2):174-8.
96. Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, et al. Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med.* 2005;353(12):1209-23.
97. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol *O*-methyltransferase: a revised mechanism and description of the termolabile variant of the enzyme. *Biochemistry.* 1995;34:4202-4210.
98. Matsumoto C, Shinkai T, Hori H, Osamu O, Nakamura J. Polymorphisms of dopamine degradation enzyme (COMT and MAO) genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Psychiatr Res.* 2004;127:1-7.
99. Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE, Weinberger DR. Catechol *O*-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience.* 2003;116:127-137.
100. McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med.* 2004;2:13.
101. McIntyre RS and Konarski JZ. Tolerability profiles of atypical antipsychotics in the treatment of bipolar disorders. *Journal of Clinical Psychiatry.* 2005;66(suppl 3):28-36.

102. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002;3(3):REVIEWS0004.
103. Miller DS, Lakshmi NY, Lam RW. Comparative efficacy of typical and atypical antipsychotics as add on therapy to mood stabilizers in the treatment of acute mania. *Journal of Clinical Psychiatry.* 2001;62:975-980.
104. Miller GM and Madras BK. Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression. *Mol Psychiatry.* 2002;7(1):44-55.
105. Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotics drugs. *Mol Psychiatry.* 2005;10:79-104.
106. Miyamoto S, LaMantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent Advances in the Neurobiology of Schizophrenia. *Mol Interv.* 2003;3:27-39.
107. MJ, Sedvall GC. Association between a promoter variant in the monoamine oxidase A gene and schizophrenia. *Schizophr Res.* 2003;61(1):31-7.
108. Molero P, Ortuño F, Zalacain M, Patiño-García A. Clinical involvement of catechol-O-methyltransferase polymorphisms in schizophrenia spectrum disorders: influence on the severity of psychotic symptoms and on the response to neuroleptic treatment. *Pharmacogenomics J.* 2007;7(6):418-26.
109. Mortimer AM. Novel antipsychotics in schizophrenia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004;13:315-329.
110. Morton NE and Collins A. Tests and estimates of allelic association in complex inheritance. *PNAS* 1998;95:11389-11393.
111. Müller DJ, Serretti A, Sicard T, Tharmalingam S, King N, Artioli P, Mandelli L, Lorenzi C, Kennedy JL. Further evidence of MAO-A gene variants associated with bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(1):37-40.
112. Munafo MR, Bowes L, Clark TG, Flint J. Lack of association of the COMT (Val158/108 Met) gene and schizophrenia: a meta-analysis of case-control studies. *Mol Psychiatry.* 2005;10:765-70.
113. Murray M. Role of CYP pharmacogenetics and drug–drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2006;58:871-885.
114. National Institute of Mental Health. Schizophrenia. National Institute of Mental Health (MD). 2005.

115. Nnadi CU and Malhotra AK. Individualizing antipsychotic drug therapy in schizophrenia: the promise of pharmacogenetics. *Curr Psychiatry Rep.* 2007;9(4):313-8.
116. Norton N, Kirov G, Zammit S, Jones G, Jones S, Owen R, Krawczak M, Williams NM, O'Donovan MC, Owen MJ. Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. *Am J Med Genet.* 2002;114:491-496.
117. Ohadi M, Shirazi E, Tehranidoosti M, Moghimi N, Keikhaee MR, Ehssani S, Aghajani A, Najmabadi H. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) association with the DAT1 core promoter -67 T allele. *Brain Res.* 2006;1101(1):1-4.
118. Owen MJ, Craddock N, O'Donovan MC. Schizophrenia: genes at last?. *Trends Genet.* 2005;21:518-525.
119. Ozdemir V, Aklillu E, Mee S, Bertilsson L, Albers LJ, Graham JE, Caligiuri M, Lohr JB, Reist C. Pharmacogenetics for off-patent antipsychotics: reframing the risk for tardive dyskinesia and access to essential medicines. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2006;7:119-133.
120. Palmatier MA, Pakstis AJ, Speed W, Paschou P, Goldman D, Odunsi A. COMT haplotypes suggest P2 promoter region relevance for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2004;9:859-870.
121. Pani L. Clinical implications of dopamine research in schizophrenia. *Curr Med Res Opin.* 2002;18:s3-s7.
122. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Antipsicóticos. En: *Farmacología.* Ed Elsevier. 6ª edición. Barcelona. 2008a; p 545-556.
123. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Otros transmisores y moduladores. En: *Farmacología.* Ed Elsevier. 6ª edición. Barcelona. 2008b; pp 492-507.
124. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet.* 1990;46(2):222-8.
125. Rössler W, Salize HJ, Van Os J, Riedner-Rössler A. Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005;15:399-409.
126. Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P, Stöber G. The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci Lett.* 2001;297(2):125-8.

127. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet.* 1998;103(3):273-9.
128. Sanders AR, Duan J, Levinson DF, Shi J, He D, Hou C, Burrell GJ, Rice JP, Nertney DA, et al. No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics. *Am J Psychiatry.* 2008;165(4):497-506.
129. Sanders AR, Rusu I, Duan J, Vander Molen JE, Hou C, Schwab SG, Wildenauer DB, Martinez M, Gejman PV. Haplotypic association spanning the 22q11.21 genes COMT and ARVCF with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2005;10(4):353-65
130. Schmith VD, Campbell DA, Sehgal S, Anderson WH, Burns DK, Middleton LT, Roses AD. Pharmacogenetics and disease genetics of complex diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003;60:1636-1646.
131. Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hipotesis of schizophrenia. *Synapse.* 1987;1:133-152.
132. Segman RH, Goltser T, Heresco-Levy U, Finkel B, Shalem R, Schlafman M, Yakir A, Greenberg D, Strous R, Lerner A, et al. Association of dopaminergic and serotonergic genes with tardive dyskinesia in patients with chronic schizophrenia. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(5):277-83.
133. Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J.* 2006;6(1):16-21.
134. Shield AJ, Thomae BA, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Mol Psychiatry.* 2004;9(2):151-60.
135. Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Levlehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;71:1296-1302.
136. Shih JC. Monoamine oxidases: from tissue homogenates to transgenic mice. *Neurochem Res.* 2007;32(10):1757-61.
137. Simpson GM and Angus JW. A rating scale for extra-pyramidal side effects. *Acta Psychiatr Scand.* 1970;212(Suppl):11-19.
138. Srivastava V, Varma PG, Prasad S, Semwal P, Nimgaonkar VL, Lerer B, Deshpande SN, BK T. Genetic susceptibility to tardive dyskinesia among schizophrenia subjects: IV. Role of dopaminergic pathway gene polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16(2):111-7.

139. St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans HJ. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet*. 1990;336(8706):13-6.
140. Stöber G, Sprandel J, Jabs B, Pfuhlmann B, Möller-Ehrlich K, Knapp M. Family-based study of markers at the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene reveals potential association with schizophrenic psychoses. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006;256(7):422-7.
141. Strachan T and Read AP. Human gene expression. In: *Human Molecular Genetics*. Ed. Garland science. 3rd edition. London and New York. 2004a. pp 275-314.
142. Strachan T and Read AP. Instability of the human genome: mutation and DNA repair. In: *Human Molecular Genetics*. Ed. Garland science. 3rd edition. London and New York. 2004b. pp 315-350.
143. Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, et al. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2002;71(2):337-48.
144. Sullivan P, Owen M, O'Donovan M, Freedman MD. Genetics. In: *The American Psychiatric Publishing Textbook of Schizophrenia*. American Psychiatric Publishing. Washington, DC: edited by Jeffrey A. Lieberman, T. Scott Stroup, and Diana O. Perkins. 2006; pp. 39-53.
145. Syagailo YV, Stöber G, Grässle M, Reimer E, Knapp M, Jungkunz G, Okladnova O, Meyer J, Lesch KP. Association analysis of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism in psychiatric disorders. *Am J Med Genet*. 2001;105(2):168-71.
146. Szekeres G, Keri S, Juhasz A, Rimanoczy A, Szendi I, Czimmer C, Janka Z: Role of the dopamine D3 receptor (D3) and dopamine transporter (DAT) polymorphism in cognitive disfunctions and therapeutic response to atypical antipsychotics in patients with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;124B(1):1-5.
147. Talkowski ME, Kirov G, Bamne M, Georgieva L, Torres G, Mansour H, Chowdari KV, Milanova V, Wood J, McClain L, et al. A network of dopaminergic gene variations implicated as risk factors for schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 2008;17(5):747-58.
148. Tamminga CA and Holcomb HH. Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol Psychiatry*. 2005;10:27-39.

149. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res.* 2008;102(1-3):1-18.
150. Tunbridge EM, Weinberger DR, Harrison PJ. A novel protein isoform of catechol O-methyltransferase (COMT): brain expression analysis in schizophrenia and bipolar disorder and effect of Val158Met genotype. *Mol Psychiatry.* 2006;11(2):116-7.
151. Tybura P, Grzywacz A, Syrek S, Parus M, Samochowiec J. Association of functional genes polymorphisms of key enzymes in the metabolism of biogenic amines with paranoid schizophrenia susceptibility and the influence of these polymorphisms on PANSS results in antipsychotic treatment. *Psychiatr Pol.* 2006;40(5):913-23.
152. Vandenberg DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics.* 1992;14(4):1104-6.
153. Weinberg D. Dopamine, the prefrontal cortex, and a genetic mechanism of schizophrenia. In: Dopamine in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. Kapur S, Lecrubier Y. Martin Dunitz Taylor and Francis Group Inc. London. 2003. pp. 129–154.
154. Williams HJ, Owen MJ, O'Donovan MC. Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull.* 2007;33:635–641.
155. Williams NM, Rees MI, Holmans P, Norton N, Cardno AG, Jones LA, Murphy KC, Sanders RD, McCarthy G, Gray MY, et al. A two-stage genome scan for schizophrenia susceptibility genes in 196 affected sibling pairs. *Hum Mol Genet.* 1999;8(9):1729-39.
156. Wong AH and Van Tol HH. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003;27:269-306.
157. Wonodi I, Hong LE, Stine OC, Mitchell BD, Elliott A, Roberts RC, Conley RR, McMahon RP, Thaker GK. Dopamine transporter polymorphism modulates oculomotor function and DAT1 mRNA expression in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Jun 13.
158. Woods SW. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical -antipsychotics. *J Clin Psychiatry.* 2003;64:663-667.
159. World Health Organization. ICD-10: Mental and Behavioural disorders (chapter V). World Health Organization. 2003.
160. World Health Organization. Schizophrenia and public health. 1998.

161. Xu X, Brookes K, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P. Association study between the monoamine oxidase A gene and attention deficit hyperactivity disorder in Taiwanese samples. *BMC Psychiatry*. 2007;7:10.
162. Zammit S, Jones G, Jones SJ, Norto N, Sanders RD, Milham C, McCarthy GM, Jones LA, Cardno AG, Gray M, et al. Polymorphisms in the MAOA, MAOB, and COMT Genes and Aggressive Behavior in Schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004;128:19-20.
163. Zhang Z, Chen K, Shih JC, Teng CT. Estrogen-Related Receptors-Stimulated Monoamine Oxidase B Promoter Activity Is Down-Regulated by Estrogen Receptors. *Mol Endocrinol*. 2006;20(7):1547-1561.