

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MATIAS NUNES FRIZZO

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE O POLIMORFISMO MITOCONDRIAL
C7028T E A MUTAÇÃO MITOCONDRIAL C6489A E ESQUIZOFRENIA**

Porto Alegre/2007



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE O POLIMORFISMO
MITOCONDRIAL C7028T E A MUTAÇÃO
MITOCONDRIAL C6489A E ESQUIZOFRENIA**

PÓS-GRADUANDO:
MATIAS NUNES FRIZZO

ORIENTADOR:
DIOGO RIZZATO LARA

CO-ORIENTADOR:
MAURÍCIO REIS BOGO

**Porto Alegre, RS
Abril/2007**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE O
POLIMORFISMO MITOCONDRIAL C7028T E A
MUTAÇÃO MITOCONDRIAL C6489A E
ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo PPGBCM-PUCRS

**Pós-Graduando: Matias Nunes Frizzo
Orientador: Diogo Rizzato Lara
Co-orientador: Maurício Reis Bogo**

**Porto Alegre
Rio Grande do Sul – Brasil
Abril/2007**

AGRADECIMENTOS

Aos Doutores Diogo Rizzato Lara e Maurício Reis Bogo pela qualificada e presente orientação desta dissertação.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS.

A Professora Dra. Ivana Beatriz Mânica da Cruz.

A todos os colegas do Centro de Biologia Genômica e Molecular pela ajuda oferecida para desenvolver este projeto.

As estagiárias Roseana Boek e Talita C. B Pereira pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Siomara Dias da Costa Lemos, Paula Heinen, Márcia Kober, Juliana Fredo, Paulo Raimann, Paulo Falavena, José L. Ferraro e Fábio Maito.

Ao meu pai, Paulo Afonso Frizzo, pelas lições de vida, e minha mãe, Marisa Nunes Frizzo, pelo apoio.

A minha amada, companheira e grande incentivadora Luciane Nedel.

SUMÁRIO

1 ESQUIZOFRENIA.....	9
1.1 História	9
1.2 Conceito	10
1.3 Epidemiologia.....	11
1.4 Início da doença e os principais sintomas.....	12
1.5 Diagnóstico	14
1.6 Curso da doença e tratamento farmacológico	15
1.7 Causas da esquizofrenia.....	17
1.8 Marcadores Moleculares da Esquizofrenia.....	19
2 MITOCÔNDRIA.....	22
2.1 Produção de energia aeróbica	22
2.2 Hipótese Endossimbiótica, Multiplicação e Herança	23
2.3 DNA e Genoma Mitocondrial	24
2.4 Mutações no DNA mitocondrial causam vários distúrbios genéticos no homem	26
3 CITOCROMO C OXIDASE	30
3.1 Função da citocromo c oxidase na mitocôndria	30
3.2 Polimorfismos da citocromo c oxidase	31
3.3 Polimorfismos do Citocromo Oxidase gene 1 - C6489A e C7028T.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ORIGINAL ARTICLE.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE O POLIMORFISMO MITOCONDRIAL C7028T E A MUTAÇÃO MITOCONDRIAL C6489A E ESQUIZOFRENIA

Pós-Graduando: Matias Nunes Frizzo¹

Orientador: Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara²

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo³

RESUMO

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica grave que atinge aproximadamente 1% da população mundial. Gera um enorme custo social direto (hospitalizações, atendimentos, medicações) e indireto (improdutividade, repercussões familiares). A esquizofrenia é uma doença complexa e multifatorial, com alta herdabilidade (cerca de 80%). Nas décadas passadas, várias pesquisas realizadas com familiares demonstraram uma correlação linear e direta entre o grau de parentesco e os riscos de surgimento da esquizofrenia. A mitocôndria é o maior sítio de produção de energia na célula e, por esta razão, mutações no DNAm (deleções e/ou polimorfismos) podem causar alterações no metabolismo mitocondrial, ocasionando danos aos tecidos. Alterações na produção de energia podem implicar em muitas doenças neurodegenerativas, como, por exemplo, o Mal de Parkinson, Alzheimer e a Esclerose Amiotrófica Lateral. Algumas mutações no DNAm diminuem a atividade da citocromo c oxidase e podem estar relacionadas com o aumento do risco para esquizofrenia na população. No presente trabalho, foi investigada a prevalência de alelos em dois polimorfismos no DNAm de pacientes esquizofrênicos e de controles. Foram analisados os polimorfismos C6489A e C7028T presentes no gene CO1 que codifica para a citocromo c oxidase. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos com o objetivo de amplificar as regiões polimórficas. Os produtos de PCR foram purificados e seqüenciados (MegaBACE 1000 / GE HelthcareTM), e as seqüências geradas analisadas, utilizando o programa Chromas versão 2.31. Foram analisados 80

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular/PUCRS

² Orientador/Laboratório de Bioquímica/PUCRS

³ Co-Orientador/Laboratório de Genética Humana/PUCRS

pacientes esquizofrênicos e 80 controles. Na análise estatística, foram utilizados o teste Q quadrado e Teste T de Student de uma via. Foram considerados significantes somente os resultados com $p < 0,05$. Não foi encontrado o alelo mutante A, na região mutada C6489A. Em relação ao polimorfismo C7028T, dos 80 pacientes, 64% apresentam o alelo mutante T e, entre os controles, este alelo está presente em 55% indivíduos. Foi encontrada significativa associação entre o alelo T e o risco para desenvolver esquizofrenia. Verificou-se que o alelo T pode ser considerado um fator de risco para esquizofrenia, já que, na comparação com o alelo C, ele é mais de três vezes prevalente no grupo de pacientes esquizofrênicos. Dessa forma, demonstrou-se uma forte associação entre a esquizofrenia e o alelo mutante T.

ABSTRACT

Schizophrenia is a serious neuropsychiatric disease that affects nearly 1% of the world population. It generates enormous direct (hospitalizations, medical care, medications) and indirect (lack of productivity, familiar repercussions) social cost. Schizophrenia is a complex and multifactor illness, with high heritability (around 80%). In the past decades, some research done with the families had demonstrated a linear and direct correlation between the degree of kinship and the possibility for schizophrenia. The mitochondria are the largest site of energy production in the cell and for this reason mutations in DNAm (deletion and/or polymorphisms) can cause alterations in mitochondrial metabolism, causing tissue damage. Alterations in energy production can cause many neurodegenerative disorders as, for example, Parkinson, Alzheimer and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Some DNAm mutations diminish the cytochrome c oxidase activity and can be related to increased risk of schizophrenia in the population. In the present work, we investigated allele prevalence in two polymorphisms in the DNAm of schizophrenic and control patients. We analyzed the C6489A and C7028T polymorphisms in the CO1 gene that codifies the cytochrome c oxidase. Specific oligonucleotides were used with the objective of amplifying the polymorphic regions. The PCR products were purified and sequenced (MegaBACE 1000/GE Healthcare TM) and the generated sequences analyzed using the Chromas v2.31 program. Eighty (80) schizophrenic patients and 80 controls were analyzed. In the statistic analysis, the Q square test and Student T Test were used. The results with $p < 0.05$ had been considered significant. The mutant A allele in the polymorphic region C6489A was not found. In relation to the C7028T polymorphism, 80 schizophrenic patients and 80 controls were analyzed. In the 80 patients, 64 present the mutant T allele, and 55 in the control samples. Significant association was found between the T allele and the risk to develop schizophrenia. We verified that the T allele can be considered a risk factor for schizophrenia, since that, in comparison with the C allele, it is three times more incident in the schizophrenic patients

group. In this way, we demonstrated a strong correlation between schizophrenia and the mutant T allele.

1 ESQUIZOFRENIA

1.1 História

Historicamente, a definição dessa doença foi criada por Emil Kraepelin, em 1896, que chegou a sua classificação, baseando-se nos sinais do desenvolvimento da esquizofrenia em estado relativamente precoce (Preacox) e da progressiva deterioração dos doentes (Dementia) (PALHA; ESTEVES, 1997).

O primeiro a utilizar o termo esquizofrenia foi o psiquiatra suíço, Eugen Bleuler, em 1911, para designar os pacientes que tinham as características de desligamento em seus processos de pensamento e resposta emotiva (STOTZ-INGENLATH, 2000).

O que Bleuler denominava esquizofrenia, ou melhor, esquizofrenias (devido aos subtipos), não representava um conceito oposto ao de demência precoce, mas, um aperfeiçoamento de duas variáveis: a dilatação na idade de início do quadro, uma vez que o transtorno poderia aparecer tardiamente e, sobretudo, uma ênfase não no processo evolutivo (eventualmente demencial), mas na valorização de alguns sintomas que seriam denominados fundamentais para o diagnóstico. Estes constituem os chamados 6 "A": distúrbios das associações do pensamento, autismo, ambivalência, embotamento afetivo, distúrbios da atenção e avolição. Sintomas como delírios, alucinações, distúrbios do humor ou catatonia eram considerados não essenciais ao diagnóstico e, portanto, acessórios (STOTZ-INGENLATH, 2000).

Kraepelin descreveu uma entidade clínica sem definir qualquer sintoma patognomônico. Já Bleuler, ao contrário, preocupou-se em definir tais

sintomas, porém não falava em uma entidade clínica única, mas em um "grupo das esquizofrenias". Em 1948, Schneider lançou o trabalho: Sintomas de primeira ordem (SPO), que exerceu grande influência sobre a psiquiatria britânica, sobretudo na elaboração do diagnóstico de esquizofrenia pelo Present State Examination (PSE). O PSE foi a base para o exame de pacientes com esquizofrenia em muitos países (SCHNEIDER, 1957; HOENIG, 1995; KOHL, 1999).

Os conceitos de Kraepelin, Bleuler e Schneider formam a base para a compreensão de esquizofrenia e fazem parte do cabedal conceitual da psiquiatria, estando presentes nos critérios diagnósticos que operacionalizam o conceito de esquizofrenia atualmente (SHEPHERD, 1998).

1.2 Conceito

As esquizofrenias são doenças mentais graves que têm duração de seis meses ou mais, e causam significativos sofrimentos e incapacidades sociais, vocacionais e pessoais. Apesar de sua apresentação estereotipada, talvez nenhum outro distúrbio psiquiátrico tenha se mostrado tão difícil de ser definido, identificado e tratado (HARRISON, 2006; ROSS et al., 2006).

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica grave que atinge, aproximadamente, 1% da população mundial (BUSNELLO et al, 1993; MURRAY & LOPEZ, 1996). Apresenta taxas de suicídio 20 vezes maiores, expectativa de vida, aproximadamente 20% menor que a da população em geral (NEWMAN & BLAND, 1991). Acarreta um enorme custo social direto (hospitalizações, atendimentos, medicações) e indireto (improdutividade,

repercussões familiares), demonstrado pelo fato de, no Brasil: ocupar 30% dos leitos psiquiátricos, ou 100 mil leitos/dia; representar o segundo lugar das primeiras consultas psiquiátricas ambulatoriais (14%) e o 5º lugar na manutenção de auxílio-doença (LARA & ABREU, 2000). Nos EUA, a esquizofrenia representa um custo anual de \$40 bilhões de dólares (CARPENTER & BUCHANAN, 1999).

Apesar das causas exatas ainda não terem sido estabelecidas, está claro de que se trata de um transtorno de etiologia multifatorial. As alterações cerebrais são tanto de ordem química como estrutural. Em alguns casos, alterações induzidas por vírus e traumas encefálicos durante os primeiros meses de vida podem ser fatores relevantes (LARA & ABREU, 2000).

1.3 Epidemiologia

Uma revisão de vários estudos epidemiológicos estimou a prevalência da esquizofrenia em cerca de 1% da população (REGIER, 1988). Em recente revisão da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o impacto mundial da doença, Murray & Lopez (1996) relataram uma taxa de prevalência de 0,92% para homens e 0,9% para mulheres. Taxas de prevalência mais elevadas (próximas a 1%) também foram relatadas em estudos realizados na América Latina e no Brasil (VICENTE et al., 1994; ALMEIDA et al., 1992).

1.4 Início da doença e os principais sintomas

Habitualmente, a esquizofrenia se manifesta durante a adolescência ou início da idade adulta (15-35 anos), com um pico de incidência mais precoce em homens, com a primeira admissão hospitalar em média aos 25 anos, do que em mulheres que, em média, são internadas pela primeira vez aos 30 anos (KELLY et al, 2005). No entanto, naqueles com história familiar positiva para transtornos psicóticos em parentes de primeiro grau, a manifestação da esquizofrenia é mais precoce e não há diferença entre os sexos quanto à idade de início (ALBUS et al, 1994).

Sintomas comportamentais sutis e progressivos, que determinam dificuldades de adaptação familiar, social e ocupacional, acompanhados por uma maior rigidez afetiva, geralmente precedem o primeiro episódio psicótico, embora um início abrupto, com sintomas psicóticos proeminentes, possa ocorrer em uma pessoa sem alterações adaptativas prévias (GREEN, 2006).

Geralmente, os primeiros sintomas são a dificuldade de concentração, estados de tensão de origem desconhecida, mesmo pela própria pessoa, e insônia e desinteresse pelas atividades sociais com conseqüente isolamento (ALBUS et al, 1994; CARPENTER et al, 1999).

Após uma fase inicial que pode durar meses, os sintomas se aprofundam, o paciente apresenta uma conversa estranha, irreal, passa a ter experiências diferentes e não usuais. É possível que o paciente já apresente sintomas psicóticos durante algum tempo antes de ser levado a um médico (RIECHER-ROSSLER et al, 2006).

Os sintomas característicos da esquizofrenia podem ser divididos em três principais grupos:

Sintomas positivos: caracterizados por delírios e alucinações. As alucinações podem tomar a forma de ver e ouvir coisas que não existem. As alucinações auditivas, que são os falsos sentidos de sons, tais como ouvir vozes, são as mais comuns. Já os delírios são alterações do pensamento, muitas vezes com conteúdo persecutório (paranóide) ou bizarro. Os sintomas psicóticos ocorrem normalmente na faixa etária dos 17 aos 40 anos. A maioria dos pacientes, entretanto, exibe alguma evidência de esquizofrenia antes do primeiro episódio psicótico. Depois deste acontecimento inicial, a ocorrência destes sintomas psicóticos ocorre esporadicamente e é intercalado por períodos de remissão (American Psychiatric Association, 1994).

Sintomas negativos: freqüentemente ocorrem cedo no processo da doença. Podem coexistir com os sintomas positivos e tipicamente persistem após estes serem tratados. Os sintomas mais comuns são embotamento afetivo, avolição, anedonia e alogia. Tais sintomas refletem a diminuição da auto-estima, falta de emoções, entonações de voz e perda geral do interesse pela vida. Os sintomas negativos tendem a ser mais comuns em pacientes mais velhos do que nos mais jovens (American Psychiatric Association, 1994).

Sintomas desorganizados: incluem a falta de atenção, pensamento e fala desorganizados, comportamento desorganizado ou catatônico e afeto inadequado. Por vezes, a descontinuidade entre as idéias pode ser tão extrema que o discurso do paciente pode tornar-se incoerente. Danos cognitivos podem ocorrer ao longo do desenvolvimento de outros sintomas, como, por exemplo,

as alucinações que podem aparecer esporadicamente (American Psychiatric Association, 1994).

1.5 Diagnóstico

Não há um exame que diagnostique precisamente a esquizofrenia. O diagnóstico é feito pelo conjunto de sintomas que o paciente apresenta e pela história como esses sintomas surgiram e se desenvolveram. Algumas técnicas de mapeamento cerebral têm sido pesquisadas no intuito de detectar ou determinar se partes do cérebro podem apresentar sinais de perda tecidual ou se estas estruturas anormais se correlacionam a sintomas específicos. (BADURA et al, 2001; SANCHES, 2004).

A utilização de Ressonância Magnética, tanto estrutural quanto funcional, tornou-se uma ferramenta particularmente valiosa para avaliar o cérebro com um grau de detalhamento maior. Outra técnica de mapeamento é a tomografia computadorizada de emissão de pósitrons, que pode proporcionar as informações de fluxo sanguíneo e metabolismo cerebral (BADURA et al, 2001; SANCHES, 2004).

De acordo com o Diagnostic and Statistical Manual (DSM-IV) da Associação Americana de Psiquiatria, a esquizofrenia é diagnosticada havendo pelo menos 2 dos 5 tipos de sintomas: alucinações, delírios, desorganização da fala, desorganização do comportamento, e sintomas negativos. Uma vez preenchidos esses critérios, o indivíduo esquizofrênico tem de mostrar uma deterioração a partir de um nível anterior de funcionamento, em áreas como trabalho, relações sociais e cuidados de si

mesmo. Para se firmar o diagnóstico, os sintomas devem provocar disfunção social/ocupacional e persistir por um mínimo de 6 meses. O uso/efeito de substâncias (drogas de abuso ou medicamentos) devem ser excluídos para realizar o diagnóstico (American Psychiatric Association, 1994).

Segundo o “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders” (DSM-IV 1994), a esquizofrenia é classificada nos seguintes subtipos, conforme a manifestação sintomática: paranóide, desorganizada, catatônica, indiferenciada e residual. O curso longitudinal da doença é variado, com melhor prognóstico entre as mulheres e para o subtipo paranóide (American Psychiatric Association, 1994).

1.6 Curso da doença e tratamento farmacológico

A instituição de um tratamento farmacológico adequado melhora significativamente a sintomatologia em aproximadamente, 70% dos pacientes (LARA & ABREU, 2000). As drogas antipsicóticas não são muito bem sucedidas na redução dos sintomas negativos, embora os pacientes possam demonstrar um menor isolamento em virtude da redução dos sintomas psicóticos. Já a sintomatologia positiva em geral tem melhora significativa, (GRANT & KIM, 2006; GARVER, 2006).

De um terço a um quinto dos pacientes com esquizofrenia não respondem adequadamente ao tratamento com fármacos. Algumas pesquisas na área mostraram que somente um terço dos pacientes recebem dosagens corretas, o que influencia fortemente na eficácia do tratamento (BUSNELLO, 1993; GRAWE et al, 2006).

O tratamento farmacológico está organizado em 7 categorias: (1) medicações antipsicóticas; (2) medicações adicionais para depressão, ansiedade ou hostilidade; (3) terapia eletroconvulsivante; (4) tratamentos psicológicos; (5) intervenções familiares; (6) reabilitação vocacional; (7) tratamento intensivo comunitário (CAHIR, 2006).

Precocemente diagnosticada e tratada, a esquizofrenia tem melhores resultados em seu tratamento. Os estudos indicam que pacientes que recebem drogas antipsicóticas e outros tratamentos, durante os seus primeiros episódios e os cinco anos seguintes a estes, são, freqüentemente, menos hospitalizados e requerem menos tempo para controlar plenamente os sintomas (NEWMAN, 1991; MURRAY & LOPEZ, 1996; KAPETANOVIC & SIMPSON, 2006).

O prejuízo no ajustamento social serve como um bom parâmetro para se avaliar o prognóstico na esquizofrenia. Entre os portadores, um terço apresentam razoável funcionamento social, um terço funcionamento intermediário e o restante desenvolve incapacitação social grave (SHEPHERD, 1989).

O tratamento farmacológico disponível atualmente se restringe a poucos sintomas e com eficácia moderada, ou seja, mesmo os pacientes que respondem ao tratamento persistem com sintomas residuais que prejudicam consideravelmente seu bem estar e qualidade de vida, além de freqüentemente representarem um peso para a família (OTTONI & LARA, 2004). É provável que o conhecimento das alterações genéticas relacionadas à esquizofrenia possam nortear tratamentos mais eficazes em relação aos sintomas e ao curso da doença (KANE & MALHOTRA, 2003; ANDREASSEN & STEEN, 2006).

1.7 Causas da esquizofrenia

Sobre as causas da esquizofrenia, sabemos que é complexa e multifatorial, envolvendo componentes genéticos e não-genéticos (SCHORK et al, 2006).

Teorias Bioquímicas

A mais aceita, em parte devido ao sucesso das medicações, é a de que as pessoas com esquizofrenia sofrem de um desequilíbrio neuroquímico, ou seja, falhas na comunicação celular do grupo de neurônios envolvidos no comportamento, pensamento e senso-percepção (LARA & ABREU, 2000; OHARA, 2006).

A dopamina foi investigada por muitos anos, observando-se, a princípio, que certas drogas que reduzem a ação da dopamina no cérebro também reduzem os sintomas psicóticos. Por outro lado, drogas que aumentam a atividade da dopamina aumentam estes sintomas ou agravam a esquizofrenia. Pesquisas revelaram, também, baixa atividade de receptores de dopamina, D1, ocorrendo no córtex pré-frontal do cérebro, o que pode ser relacionado a sintomas negativos (ALFIMOVA et al, 2006).

Atualmente, os especialistas sugerem que um equilíbrio anormal de dopamina, e não só a hiperatividade, é também gatilho para a síndrome da esquizofrenia. Outros neurotransmissores e neuromoduladores supostamente envolvidos na esquizofrenia são o glutamato, a glicina, a serina, a serotonina e a adenosina (MURRAY & LOPEZ 1996; LARA & ABREU, 2000).

Componente Genético

Nas décadas passadas, vários estudos feitos com familiares mostraram uma forte correlação entre o grau de parentesco e as chances de surgimento da esquizofrenia. Os indivíduos com predisposição familiar à esquizofrenia possuem várias anormalidades estruturais no cérebro, incluindo tamanho reduzido e ventrículos aumentados, comuns em pacientes com esquizofrenia. Entretanto, a hereditariedade não explica todos os casos da doença (RILEY & KENDLER, 2006; CRADDOCK & FORTY, 2006).

Pessoas sem nenhum parente esquizofrênico têm 1% de chances de virem a desenvolver esquizofrenia; com algum parente distante, essa chance aumenta para 3 a 5%. Já para aqueles que têm um membro familiar direto com a doença, o risco é de 10%, e de aproximadamente 40% se a doença afeta ambos os pais. No caso de gêmeos idênticos, as chances podem chegar a 65%. Aproximadamente 60% dos portadores de esquizofrenia não possuem parentes próximos com a doença (MURRAY & LOPEZ, 1996; ANOKHIN et al., 2006). O componente genético, portanto, explica boa parte da doença. Se explicasse tudo, a incidência de esquizofrenia entre os gêmeos idênticos seria de 100% (CARPENTER & BUCHANAN, 1999).

Com relação aos fatores ambientais, também são muito importantes no surgimento da doença, o componente genético seja mais preponderante no surgimento da doença. Sobre o fator ambiental alguns autores relataram que a um número maior de casos nas populações sócio-econômicas mais baixas. O componente ambiental pode ser separado em dois grupos o dos fatores biológicos como, por exemplo, intoxicações, infecções problemas durante a

gestação, etc. O outro grupo, se refere ao fator psicológico que está relacionado a perdas de pessoas importantes, problemas familiares na infância e outros fatores estressantes.

A união do componente genético ao ambiental é o mais aceito para determinar o surgimento da esquizofrenia.

1.8 Marcadores Moleculares da Esquizofrenia

Atualmente é inegável a presença de um componente genético na etiologia da esquizofrenia. A seleção racional de genes candidatos para estudos de associação genética em esquizofrenia tem sido baseada em evidências farmacológicas, neuroquímicas e clínicas que apontam para receptores específicos, enzimas e outras moléculas que possam estar envolvidas na etiopatogênese da doença. Exemplos são os genes codificadores de receptores de dopamina e serotonina que apresentam alta afinidade por agentes antipsicóticos (OJOPI et al., 2003).

Os genes que parecem estar envolvidos estão distribuídos em muitas regiões do nosso genoma e, de acordo com isso, loci genéticos que parecem conferir suscetibilidade para desenvolver esquizofrenia têm sido mapeados em diversos cromossomos, incluindo 1q21-22, 6p25, 8p21, 10p14, 13q32, 18p11 e 22q11-13 (BERRETTINI, 2000; BRZUSTOWICS et al. 2000; STRAUB et al. 1995; BLOUIN et al. 1998; EKELUND et al. 2001). Embora a lista de genes candidatos continue crescendo, nenhum gene candidato confiável para esquizofrenia apareceu até o momento.

Pacientes que apresentam uma microdeleção no cromossomo 22q11 são portadores da chamada Síndrome Velocardiofacial. Estes pacientes apresentam um alto risco para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas, incluindo-se a esquizofrenia (SAGIV et al, 2002). Em 1999, Murphy et al verificaram que em um grupo de pacientes com Síndrome Velocardiofacial 20 a 30% haviam desenvolvido esquizofrenia (MURPHY et al, 1999).

O gene da catecol-O-metiltransferase (COMT) é um dos genes que está deletado no cromossomo 22q11 e parece ser um dos responsáveis pela alta incidência de esquizofrenia nos pacientes com Síndrome Velocardiofacial. A COMT é uma das enzimas que degradam catecolaminas, dentre elas a dopamina (EGAN et al, 2001; SAGIV et al, 2002).

Polimorfismos da COMT como a substituição de uma Valina (com maior atividade da enzima) por Metionina (com menor atividade da enzima) nos códons 108 e 158 da COMT foram investigados, porém sem uma correlação significativa, segundo uma metanálise recente (FAN et al, 2005). A função biológica da COMT, sua localização na microdeleção do cromossomo 22q11 a tornam um gene candidato a ser marcador molecular da esquizofrenia (EGAN et al, 2001; SAGIV et al, 2002).

Outra região cromossômica que tem chamado à atenção como um possível marcador para a esquizofrenia são os genes do cromossomo 13q34. Dois genes têm recebido especial atenção, o G72 e a proteína D-aminoácido oxidase (DAAO). A DAAO estimula a produção de N-metil-D-aspartato, que é um potente estimulante dos receptores de glutamato no cérebro. Quatro SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) deste gene foram associados com a esquizofrenia (CHUMAKOV et al, 2002).

O gene da neuregulina 1 (NRG1) é um gene candidato a ser marcador para a esquizofrenia (HARRISON e LAW, 2006). A NRG1 é expressa nas sinapses do Sistema Nervoso Central e atua na expressão e ativação dos receptores dos neurotransmissores, incluindo os receptores glutamatérgicos. Camundongos mutantes para a NRG1 apresentam fenótipos com algumas características semelhantes aos modelos de esquizofrenia em roedores (STEFANSSON et al, 2002).

O gene localizado na região 6p22.3 (proteína de ligação da distrobrevina), a disbindina, é outro gene que tem associação com a esquizofrenia. Sobre a possível função da proteína acredita-se que ela participa das sinapses glutamatérgicas. Sibylle, em 2003, demonstrou associação significativa entre o gene 6p22.3 e a esquizofrenia (SIBYLLE et al, 2003).

2 MITOCÔNDRIA

2.1 Produção de energia aeróbica

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas de forma arredondada ou alongada (estruturas cilíndricas), existentes em praticamente todos os tipos de células eucariontes (vegetais e animais), em número proporcional à atividade metabólica de cada uma, sendo então variável nas diferentes células, indo de quinhentas, mil ou até dez mil dessas estruturas por célula (CONRADT, 2006).

A função das mitocôndrias é produzir energia para todos os processos vitais das células (LY & VERSTREKEN, 2006). Essa energia é conseguida através de uma série de reações químicas entre as moléculas dos alimentos e o oxigênio.

A mitocôndria localiza-se proximamente aos locais onde existe grande consumo de energia. É uma organela basicamente membranosa (LY & VERSTREKEN, 2006). Seu envoltório é formado por duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, ambas com composição química e estrutural semelhante, cada qual com funções e proteínas diferentes associadas à sua bicamada lipídica (CONRADT, 2006).

A cadeia respiratória ocorre na membrana mitocondrial interna e compreende três complexos enzimáticos principais, através dos quais elétrons fluem do NADH e do FADH₂ para o O₂, utilizando a energia daí gerada para bombear H⁺ da matriz para o espaço intermembrana (DEVIN & RIGOLET, 2006). Na membrana nativa, os carreadores de elétrons móveis ubiquinona e citocromo c completam a cadeia transportadora de elétrons ao mediar a

transferência de elétrons entre os complexos enzimáticos. Por fim, os elétrons são transferidos para o oxigênio molecular (O_2), essencial ao processo aeróbico, unindo-se a átomos de hidrogênio para formar água (FONTANESI et al, 2006).

O gradiente eletroquímico de prótons resultante é adaptado para sintetizar ATP por outro complexo protéico transmembrana, ATP sintetase, através do qual H^+ flui de volta à matriz. Esse complexo está localizado nos corpúsculos elementares (GIBSON, 2005).

2.2 Hipótese Endossimbiótica, Multiplicação e Herança

O caráter procariótico do sistema genético das mitocôndrias, bem como dos cloroplastos, sugere que essas organelas originaram-se de bactérias endocitadas há mais de um bilhão de anos, quando o oxigênio atmosférico terrestre atingiu níveis elevados. De fato, evidencia-se uma grande semelhança entre o funcionamento e constituição das mitocôndrias e bactérias (PATRON et al, 2006).

Segundo essa hipótese, as células eucarióticas iniciaram sua existência estabelecendo uma relação endossimbiótica com uma bactéria, responsável pelo sistema de fosforilação oxidativa (PATRON et al, 2006). Grande parte dos genes codificadores das atuais proteínas mitocondriais e cloroplastídicas está no núcleo celular. Portanto, uma extensa transferência de genes deve ter ocorrido do DNA das organelas para o DNA nuclear durante a evolução eucariótica. Em contraste, o genoma das organelas de hoje é estável,

indicando que uma transferência de sucesso é um raro processo evolucionário (ODINTSOVA & IURINA, 2005).

As mitocôndrias sempre se originam de outras pré-existentes, por fissão, podendo também se fundir umas com as outras. Os processos de duplicação e fusão são controlados e capazes de manter um número sempre estável de mitocôndrias por célula. O número de mitocôndrias pode ser ainda regulado de forma adaptativa; o músculo esquelético submetido a esforço prolongado, por exemplo, possui 5 a 10 vezes mais mitocôndrias (KARP, 1999).

2.3 DNA e Genoma Mitocondrial

O genoma mitocondrial, representado na figura 1, se restringe a uma dupla fita de DNA circular na célula animal, sendo o sistema genético mais simples conhecido, no qual os nucleotídeos fazem parte de seqüências codificantes. O DNA mitocondrial (DNAm_t) está localizado no interior da mitocôndria, na região conhecida como matriz (ANDERSON et al, 1981; ATTIMONELLI et al, 1999).

O DNA mitocondrial possui um sistema independente de replicação, transcrição e translação do seu genoma. O DNA mitocondrial é herdado da mãe, porque as mitocôndrias presentes no espermatozóide estão localizadas na cauda deste, que não penetra no óvulo durante a fecundação. Assim, as mitocôndrias presentes no embrião são de herança exclusivamente materna (WALLACE, 1992).

O DNAm, uma molécula circular, possui cerca de 37 genes para a realização de funções mitocondriais. Contem cerca de 16.500 pares de bases. Isso é suficiente para que seja capaz de sintetizar suas próprias proteínas e se autoduplicar. Esse material genético é capaz de codificar 2 RNAs ribossomais r(RNA) e 22 RNAs transportadores (tRNA) utilizados para tradução de RNAm mitocôndrias. O DNAm possui, ainda, 13 segmentos capazes de codificar um polipeptídeo com mais de 50 aminoácidos. Como nas bactérias, o DNA mitocondrial não é envolto em histonas e seu empacotamento não é bem entendido (ANDERSON et al, 1981; ATTIMONELLI et al, 1999).

De modo diferente dos outros genomas, aproximadamente todos os nucleotídeos parecem fazer parte de seqüências codificadoras para proteínas ou para um dos rRNAs ou para tRNAs. Como as seqüências se dispõem diretamente umas após as outras, há pouco espaço disponível para seqüências reguladoras de DNA (ANDERSON et al, 1981; ATTIMONELLI et al, 1999).

As mitocôndrias só possuem 22 tRNAs, enquanto na célula existem mais de 30 tRNAs. Dessa forma, as regras normais do pareamento códon-anticódon são mais flexíveis nas mitocôndrias, de tal forma que muitas moléculas de tRNA reconhecem qualquer um dos quatro nucleotídeos da terceira posição. Tal pareamento 2 por 3 faz com que um tRNA pareie com qualquer um de quatro códons, e permite a síntese de proteínas com um número menor de moléculas de tRNA (BRANDON, 2005).

A comparação entre as seqüências dos genes mitocondriais e as seqüências de aminoácidos das proteínas correspondentes indica que o código genético é diferente, de tal forma que 4 dos 64 códons têm significados

diferentes daqueles mesmos códons de outros genomas (ANDERSON et al, 1981).

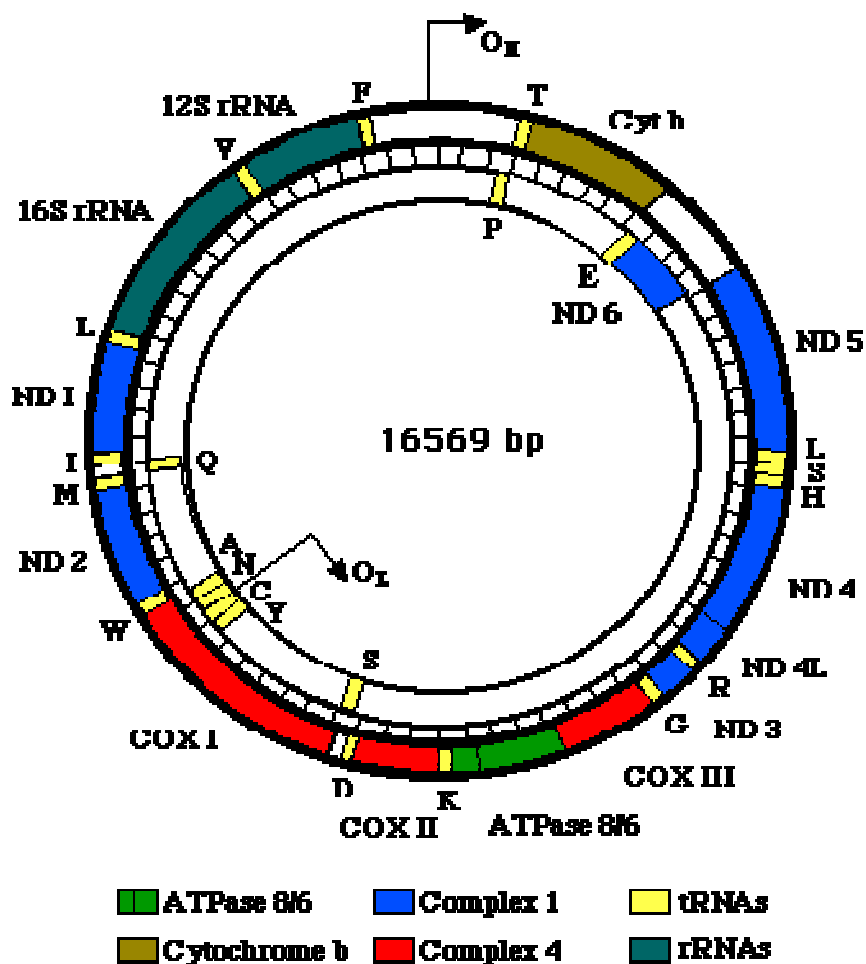


Figura 1: Genoma mitocondrial

Fonte: disponível em www.mitomap.org

2.4 Mutações no DNA mitocondrial causam vários distúrbios genéticos no homem

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é uma molécula circular que, ao contrário do DNA nuclear (nDNA), não se encontra complexo a histonas, e

localiza-se em um microambiente altamente oxidativo (STUART & BROWN, 2006).

A falta da proteção proporcionada pelas histonas e a presença de radicais livres continuamente gerados durante a Fosforilação Oxidativa tornam o DNAm muito mais vulnerável que o nDNA às modificações oxidativas, que, por sua vez, favorecem as mutações (STUART & BROWN, 2006; LENAZ et al, 2004).

Acredita-se que a taxa de mutações somáticas do DNAm seja 10 a 20 vezes maior que a do nDNA (SHENKAR et al, 1996). O acúmulo de mutações somáticas, principalmente de deleções do DNAm, tem sido implicado como um importante mecanismo molecular do envelhecimento (CORTOPASSI & ARNHEIM, 1990; CORRAL-DEBRINSKI et al, 1992; WALLACE, 1992).

As alterações do DNA mitocondrial foram descritas primariamente em um grupo de doenças conhecido como encefalomiopatias mitocondriais (HOUSTEK et al, 2006). Embora essas anormalidades (deleções, duplicações, mutações de ponto e depleções) tenham sido associadas a várias síndromes clínicas, desde oftalmoplegia até doenças multi-sistêmicas, pequenas quantidades de deleções do DNAm também foram encontradas em tecidos envelhecidos normais (LENAZ et al, 2004).

Quando uma mutação ocorre, ela pode estar presente nas mitocôndrias de todas as células do organismo. Esse evento é conhecido como homoplasmia. Dessa forma, na divisão celular todas as células filhas terão mitocôndrias com o mesmo DNA mitocondrial mutante. Em outra situação conhecida como heteroplasmia, a mutação pode estar presente em apenas algumas mitocôndrias de uma célula de um determinado órgão ou tecido; e, na

divisão celular, esta célula pode segregar o DNA mitocondrial mutante e transmitir para as células filhas pouca ou nenhuma quantidade de DNA mitocondrial mutante. Neste caso, uma mãe pode transmitir ou não uma mutação mitocondrial aos seus filhos (CARVALHO & RIBEIRO, 2002).

Na medida em que aumenta a porcentagem de DNA mutante, declina a capacidade de produção de energia celular, até atingir o limiar bioenergético: o mínimo de energia necessária para a célula ou tecido funcionar normalmente (HOUSTEK et al, 2006). Além deste ponto, aparecem os sintomas, que pioram progressivamente (LENAZ et al, 2004).

Este limiar bioenergético pode ser atingido por excesso de produção de radicais livres, que lesam as estruturas da cadeia de produção de ATP, ou por déficit dos nutrientes que compõem esta cadeia (HOUSTEK et al, 2006). Assim, compreende-se que os sintomas só irão ocorrer tardiamente, quando muitas alterações bioquímicas já aconteceram (BEAL, 1995; JOHNS, 1996).

A gravidade da doença causada por uma mutação no DNAMt depende da natureza da mutação e da proporção de DNA mutante e do tipo selvagem presentes num tipo celular específico. O genótipo de DNAMt flutua de uma geração e de uma divisão celular para a geração/divisão seguinte e pode derivar para DNAMt predominante do tipo original, ou predominantemente mutante (SINGH, 2004). Já o fenótipo de uma doença mitocondrial vai depender da gravidade da mutação e da necessidade de produção de energia do órgão envolvido (ZEVIANI & SPINAZZOLA, 2003).

Todas as células possuem mitocôndrias, exceto as hemáceas. Ainda assim, as mutações ocorrentes no DNAMt podem afetar apenas alguns tecidos. Os tecidos mais comumente afetados são aqueles com grande necessidade do

ATP produzido por fosforilação oxidativa e de tecidos que necessitam da maioria ou mesmo de todo o DNAm da célula para sintetizar proteínas mitocondriais funcionais. Um exemplo disso é o cérebro, que é um tecido extremamente exigente de energia (LY & VERSTREKEN, 2006) e que, na falta dela promove danos irreparáveis às suas células, como na neuropatia óptica hereditária de Leber e nas doenças neurodegenerativas (Doença de Alzheimer e Mal de Parkinson), (LESNEFSKY & HOPPEL, 2006; SULLIVAN & BROWN, 2005).

Embora haja um grande número de associações de polimorfismos de DNAm com doenças neurodegenerativas, não existem muitos estudos demonstrando associação entre esquizofrenia e polimorfismos no DNAm, o que demonstra a necessidade de estudos associativos entre polimorfismos mitocondriais e esquizofrenia, distúrbios bipolares, epilepsia, etc.

3 CITOCROMO C OXIDASE

3.1 Função da citocromo c oxidase na mitocôndria

A oxidação de NADH e FADH₂ é promovida pela cadeia transportadora de elétrons, uma série de complexos protéicos contendo centros redox com afinidade progressiva por elétrons (aumento do potencial de redução padrão). Os elétrons são passados através dessa cadeia, do menor ao maior potencial de redução padrão (LESNEFSKY & HOPPEL, 2006).

Os elétrons são carreados do complexo I e do complexo II para o complexo III pela coenzima Q (CoQ ou ubiquinona), e do complexo III para o complexo IV pela proteína periférica da membrana, o citocromo c (FONTANESI et al, 2006).

O complexo I catalisa a oxidação de NADH pela ubiquinona. O complexo III catalisa a oxidação da ubiquinona pelo citocromo c e, por fim, o complexo IV catalisa a oxidação do citocromo c reduzido pelo O₂, o acceptor terminal de elétrons do processo de transporte de elétrons (HANAGASI et al, 2005).

Conforme um par de elétrons atravessa sucessivamente os complexos I, III e IV, é liberada energia livre suficiente em cada uma das etapas para gerar síntese de uma molécula de ATP (MANEG et al, 2004).

O centro do complexo IV consiste das três maiores subunidades e mais hidrofóbicas subunidades I, II e III, as quais são codificadas pelo DNA mitocondrial. As subunidades remanescentes são codificadas pelo DNA nuclear e devem ser transportadas para a mitocôndria (MANEG et al, 2004).

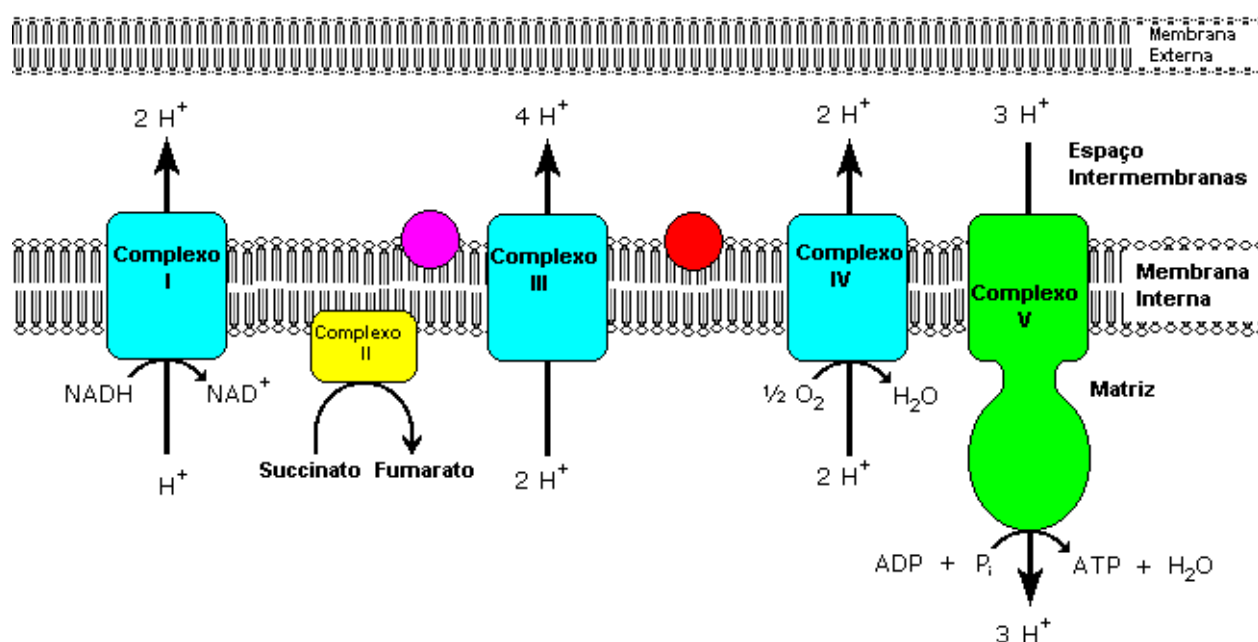


Figura 2: Cadeia Respiratória e os Citocromos.

Fonte: www.fundamentosdebioquimica.hpg.ig.com.br, 2006.

3.2 Polimorfismos da citocromo c oxidase

A mitocôndria é o maior sítio de produção de energia na célula. Por esta razão, mutações no DNAm t podem causar alterações no metabolismo mitocondrial, acarretando danos aos tecidos (LESNEFSKY & HOPPEL, 2006). Estas alterações podem prejudicar órgãos importantes dos seres humanos, dentre eles o cérebro que, constantemente, requer altos níveis de energia para seu funcionamento adequado (LY & VERSTREKEN, 2006; FONTANESI et al, 2006).

Estudos recentes sugerem que a diminuição da atividade da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria está relacionada com doenças neurodegenerativas (LESNEFSKY & HOPPEL, 2006), dentre elas o Mal de Parkinson e Alzheimer, devido, principalmente, ao acúmulo de deleções no

DNAmt, que predispõe os pacientes a tais doenças (OHTA & OHSAWA, 2006). Em relação à esquizofrenia, a atividade e/ou expressão do mRNA do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons podem estar envolvidas no surgimento da doença (RICHTER et al., 1988; KATO, 2001).

Recentes pesquisas relataram algumas mutações presentes no DNAmt, que diminuem a atividade da citocromo c oxidase podem estar relacionadas com o aumento do risco para esquizofrenia e Alzheimer, na população (OHTA & OHSAWA, 2006). Num estudo, foram investigados cinco polimorfismos numa população de 81 pacientes e cinco grupos de controles. Os resultados indicaram uma pequena relação entre os polimorfismos e a esquizofrenia, porém os resultados necessitam de maiores estudos e sugerem cuidados para interpretar tais polimorfismos (LINDHOLM et al, 1997).

O artigo de Cavelier (1995) reafirma a tese de que alterações na produção de energia podem implicar em muitas doenças neurodegenerativas, dentre elas, o Mal de Parkinson (CORTOPASSI, 1990) e a Esclerose Amiotrófica lateral (CAVELIER et al, 1995; SHENKAR et al, 1996). Neste artigo, estudou-se uma deleção no DNAmt 4977, na qual se investigou a correlação entre esta deleção e doença de Alzheimer e esquizofrenia. Não houve uma relação significativa entre esta deleção e a doença de Alzheimer. No entanto, encontrou-se uma significativa associação entre a deleção DNAmt 4977 e a esquizofrenia, sugerindo que esta deleção esteja envolvida na patogênese da esquizofrenia (RICHTER, 1988; CAVELIER et al, 1995).

Seguindo a hipótese de que alterações genéticas no DNAmt podem comprometer o metabolismo energético mitocondrial, alguns autores citam que, além de significativa importância no surgimento de doenças

neurodegenerativas (WALLACE, 2005) e neuropatias (CARELLI et al, 2004), há uma forte associação com hipertrofia do músculo cardíaco (TOKORO et al, 1996), formação de carcinomas (BRANDON et al, 2006), e diabetes mellitus tipo 2 (MOHLKE et al., 2005). Tais pesquisas dimensionam o grau de comprometimento que estas alterações genéticas podem trazer para a saúde.

Outro polimorfismo em DNA mitocondrial é o polimorfismo G12147A para um RNA(His) transportador. Esta mutação está associada ao fenótipo da encefalomiopatia e tem, como resultado fisiológico, uma alteração na síntese protéica mitocondrial. Como é um polimorfismo que está relacionado com a atividade da citocromo c oxidase, é conveniente verificar sua associação com a esquizofrenia (MELONE et al, 2004).

3.3 Polimorfismos C7028T e mutação C6489A do Citocromo Oxidase gene 1 – CO1

Tanto o polimorfismo C7028T, quanto a mutação C6489A pertencem ao Citocromo Oxidase gene 1 (CO1). A mutação C6489A ocorre na posição 6489 do DNA mitocondrial. Nos indivíduos normais, encontra-se a base nitrogenada citosina. Já nos indivíduos que têm a mutação puntual, observa-se a base adenina (MITOMAP- Reporting Mitochondrial DNA Base Substitution Diseases: Coding and Control Region Point Mutations).

Em relação ao polimorfismo C7028T, ocorre na posição 7028 do DNA mitocondrial. Nos indivíduos normais, encontra-se a base nitrogenada citosina, enquanto, nos que possuem a mutação, observa-se a base nitrogenada

timina (MITOMAP- Reporting Mitochondrial DNA Base Substitution Diseases: Coding and Control Region Point Mutations).

A mutação C6489A foi identificado por Varlamov et al (2002) em uma jovem de 17 anos que sofria de epilepsia parcial contínua. As análises revelaram cerca de 30% de DNAm_t mutante. Os pesquisadores também verificaram um decréscimo da atividade da cadeia respiratória, devido à mutação do gene que codifica para a citocromo c oxidase. A diminuição na atividade da citocromo c oxidase foi mais acentuada nas fibras do tecido muscular, no qual foi encontrada uma incidência de mais de 95 % de DNAm_t mutado (VARLAMOV et al, 2002). Dessa forma, é de grande relevância investigar a incidência desta mutação em doenças como a esquizofrenia e outras doenças neurodegenerativas, pois a mutação comprovadamente diminui a produção energética das células. Sendo assim, é conveniente investigar a ocorrência da mutação numa população de esquizofrênicos.

Já o polimorfismo C7028T, segundo a literatura (JIANG, ELLIS & GREENLEE, 2004), está correlacionado ao Mal de Parkinson. Sabendo-se que este polimorfismo também se encontra no gene que codifica para a citocromo c oxidase, é importante verificar sua correlação com outras patologias que podem ter origem na falência ou diminuição da atividade da citocromo c oxidase. Neste caso, cita-se a esquizofrenia como uma patologia alvo para investigação desta hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-DARGHAM, A. Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D1 receptors tell us? **World Psychiatry**, v.2, n.3, p.166-71, 2003.

ALBUS, M. et al.. The impact of familial loading on gender differences in age at onset of schizophrenia. **Acta Psychiatr Scand**, n.89, p.132-134, 1994.

ALFIMOVA, M.V. et al. Dopamine system genes interaction and neurocognitive traits in patients with schizophrenia, their relatives and healthy controls from general population. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, v.106, n.7, p.57-63, 2006.

ALMEIDA, Marcelo Machado de et al. Diagnóstico diferencial entre esquizofrenia, transtornos invasivos do desenvolvimento e transtorno obsessivo-compulsivo na infância. **Rev. psiquiatr. clín.**, v.30, n.5, p.173-176, 2003.

ALMEIDA, N.F. et al. Estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas brasileiras (Brasília, São Paulo, Porto Alegre). **Rev ABP-APAL**, v.16, p.93-104, 1992.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV**. 4. ed. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1994.

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, n.290, p.457-465, 1981.

ANDREASSEN, O.A.; STEEN, V.M. Pharmacogenetics and tailored drug treatment in schizophrenia. **Tidsskr Nor Laegeforen**, v.21, n.126, p.2400-2402, 2006.

ANOKHIN, A.P. et al. Genetic and environmental influences on sensory gating of mid-latency auditory evoked responses: A twin study. **Schizophr Res**, 2006.

ATTIMONELLI, M. et al. "Update of the Human MitBASE database". **Nucleic Acids Research**, v.27, n.1, p.143-146, 1999.

BADURA, F. et al. A study of cranial computer tomograms in very early and early onset schizophrenia. **J Neural Transm**, v.108, n.11, p.1335-44, 2001.

BEAL, M.F. Aging energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann Neurol**, n.38, p.357-366, 1995.

BEM-SHACHAR, D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. **Jornal of Neurochemistry**, v.83, p.1241-1251, 2002.

BEN-SCHACAR, D. et al.. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. **Int J Neuropsychopharmacol**, n.2, p.245-253, 1999.

BERRETTINI, W.H. - Are schizophrenic and bipolar disorders related? A review of family and molecular studies. **Biol Psychiatry** n.48, p. 531-8, 2000.

BLOUIN, J.L.; DOMBROSKI, B.A.; NATH, S.K. et al. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. **Nature Genet**, n.20, p.70-73, 1998.

BRANDON, M. et al. Mitochondrial mutations in cancer. **Oncogene**, v.7;25, n.34, p.4647-62, 2006.

BRANDON, M.C. et al. "MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update". **Nucleic Acids Research**, n.33, (Database Issue): D611-613, 2005.

BREWIN, J. et al. Incidence of schizophrenia in Nottingham. **Br J Psychiatry**, n.171, p.140-4, 1997.

BRZUSTOWICZ, L.M.; HODGKINSON, K.A.; CHOW, E.W.; HONER, W.G.; BASSETT, A.S. - Location of a major susceptibility locus for familiar schizophrenia on chromosome 1q21-q22. **Science**, n.288, p. 678-82, 2000.

BUSNELLO, E.D. et al. Morbidade psiquiátrica na população urbana de Porto Alegre. **J Bras Psiquiatr**, n.32, p.55-60, 1993.

CAHIR, M. British Association for Psychopharmacology Summer Meeting 23-26 July 2006, Oxford, United Kingdom. **Expert Opin Pharmacother**, v.7, n.14, p.2007-10, 2006.

CARELLI, V.; ROSS-CISNEROS, F.N.; SADUN, A.A. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. **Prog Retin Eye Res**, v.23, n.1, p.53-89, 2004.

CARPENTER, W.T.; BUCHANAN, R.W. Esquizofrenia: introdução e panorama geral. In: KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J. **Tratado de psiquiatria**. Trad. Andrea Callefi et al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. p.959-972.

CARVALHO, Maria F.P.; RIBEIRO, Fernando A. Quintanilha. Hearing loss related to mitochondrial DNA changes. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v.68, n.2, p.268-275, 2002.

CAVELIER, L. et al. Decreased cytochrome-c oxidase activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics. **Genomics**, v.29, n.1, p.217-224, 1995.

CHUMAKOV et al. Genetic and Physiological data implicating the new human gene G72 and gene for D amino acid oxidase em schizophrenia. **PNAS** v.99, n.21, p.13675-13680, 2002.

CONRADT, B. Cell biology: Mitochondria shape up. **Nature**, v.443, n.7112, p.646-7, 2006.

CORRAL-DEBRINSKI, M. et al. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. **Nat. Genet.**, v.2, p.324-329, 1992.

CORTOPASSI, G.A.; ARNHEIM, N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. **Nucleic Acids Res**, v.18, p.6927-6933, 1990.

CRADDOCK, N.; FORTY, L. Genetics of affective (mood) disorders. **Eur J Hum Genet.**, v.14, n.6, p.660-8, 2006.

DEVIN, A.; RIGOULET, M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2006.

Disponível em:<<http://www.fundamentosdebioquimica.hpg.ig.com.br>>
Acesso em Julho de 2006.

EGAN, M.F. et al.. Effect of COMT Val 108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for a schizophrenia. **Proc Natl Acad Sci USA**, n.98, p.6917-6922, 2001.

EKELUND, J.; HOVATTA, I.; PARKER, A.; PAUNIO, T.; VARILO, T.; MARTIN R.; SUHONEN J.; ELLONEN P.; ET AL. - Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. **Hum Mol Genet** **10**, p.1611-7, 2001.

FAN JB, et al. Catechol-O-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia: a large-scale association study plus meta-analysis. **Biol Psychiatry**, 57(2):139-44, 2005.

FONTANESI, et al. Assembly of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase, a Complicated and Highly Regulated Cellular Process. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2006.

FUJIMOTO, T. et al.. Study of chronic schizophrenics using ³¹p magnetic resonance chemical shift imaging. **Acta Psychiatrica Scandinavia**, v.86, p.455-462, 1992.

GARVER, D.L. Evolution of antipsychotic intervention in the schizophrenic psychosis. **Curr Drug Targets.**, v.7, n.9, p.1205-15, 2006.

GIBSON, B.W. The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.37, n.5, p.927-34, 2005.

GRANT, J.E.; KIM, S.W. Medication management of pathological gambling. **Minn Med**, v.89, n.9, p.44-8, 2006.

GRAWE, R.W. et al. Two years of continued early treatment for recent-onset schizophrenia: a randomised controlled study. **Acta Psychiatr Scand**, v.114, n.5, p.328-36, 2006.

GREEN, M.F. Cognitive impairment and functional outcome in schizophrenia and bipolar disorder. **J Clin Psychiatry**, v.67, Suppl 9:3-8, Discussion, p.36-42, 2006.

HANAGASI, H.A. et al. Mitochondrial complex I, II/III, and IV activities in familial and sporadic Parkinson's disease. **Int J Neurosci**, v.115, n.4, p.479-93, 2005.

HARRISON PJ, LAW AJ. Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. **Biol Psychiatry**. 60(2):132-40,2006.

HOENIG, J. Schizophrenia: clinical section. In: Porter GBR, editor. **A history of clinical psychiatry**. London: The Athlone Press, 1995. p. 336-48.

HOUSTEK, J. et al. Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. **Biochim Biophys Acta**, v.1757, n. 9-10, p.1400-5, 2006.

JIANG, Yiguo; ELLIS, Tammy; GREENLEE, Anne R. Genotyping Parkinson-Associated Mitochondrial Polymorphisms. **Clinical Medicine & Research**, v.2, n.2, p.99-106, 2004.

JOHNS, D.R. Mitochondrial DNA and diseases. **N Engl J Med**, n.334, p.270-281, 1996.

KANE, J.M.; MALHOTRA, A. The future of pharmacotherapy for schizophrenia. **World Psychiatry**, v.2, n.2, p.81-6, 2003.

KAPETANOVIC, S.; SIMPSON, G.M. Review of antipsychotics in children and adolescents. *Expert Opin Pharmacother*, v.7, n.14, p.1871-85, 2006.

KARP, G. **Cell and Molecular Biology**: concepts and experiments. Second edition. John Wiley & Sons: New York, 1999. 816p.

KATO, C.; et al. Mitochondrial DNA polymorphism and extraversion. **Am J Med B Neuropsychiar Genet**, 1.128, B(1), p.76-79, 2004.

KATO, T. The other, forgotten genome: mitochondrial DNA and mental disorders. **Mol Psychiatry**, v.6, n.6, p.625-633, 2001.

KATO, T.; KUNUGI, H.; NANKO, S.; KATO, N.. Association of bipolar disorder with 5178 polymorphism in mitochondrial DNA. **American Jornal of Medical Genetics**, n.96, p.182-186, 2000.

KATO, T.; KUNUGI, H.; NANKO, S.; KATO, N.. Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. **J Affect Disord**, n.61, p.151-164, 2001.

KATO, T.; TAKAHASHI, Y.. Deletion of leukocyte mitochondrial DNA in bipolar disorder. **J Affect Disord**, n.37, p.67-73, 1996.

KEGELES, L.S.; HUMARAN, T.J.; MANN, J.J.. In vivo neurochemistry of the brain in schizophrenia as revealed by magnetic resonance spectroscopy. **Biol Psychiatric**, n.44, p.382-398, 1998.

KELLY, D.L. First-episode schizophrenia: a focus on pharmacological treatment and safety considerations. **Drugs**, v.65, n.8, p.1113-38, 2005.

KOHL, F. The beginning of Emil Kraepelin's classification of psychoses. A historical-methodological reflection on the occasion of the 100th anniversary of his "Heidelberg Address" 27 November 1898 on "nosologic dichotomy" of endogenous psychoses. **Psychiatr Prax**, v.26, n.3, p.105-11, May. 1999. German.

KRAEPELIN, E. **Dementia praecox and paraphrenia**. (From the German 8th Edition of the Textbook of Psychiatry ed.). Edinburgh: E & S Livingstone, 1919. p.74-5.

LACHMAN, H.M.; PAPOLOS, D.F.; SAITO, T.; YU, Y.M.; SZUMLANSKI, C.L.; WEINSHILBOUM, R.M. Human cathecol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. **Pharmacogenomics**, v.6, p.243-250, 1996.

LARA D.R.; ABREU P.B. Esquizofrenia. In: KAPCZINSKI F.; QUEVEDO J.; IZQUIERDO, I. (edits.). **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. Porto Alegre: Artmed, p. 109-117, 2000.

LENAZ, G. et al. Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. **Biochim Biophys Acta**, v.1658, n.1-2, p.89-94, 2004.

LESNEFSKY, E.J.; HOPPEL, C.L. Oxidative phosphorylation and aging. **Ageing Res Rev.**, v.5, n.4, p.402-33, 2006.

LINDHOLM, E. et al. Mitochondrial sequence variants in patients with schizophrenic. **Eur J Hum Genet**, v.5, n.6, p.406-412, 1997.

LY, C.V.; VERSTREKEN, P. **Mitochondria at the synapse**. **Neuroscientist**, v.12, n.4, p.291-9, 2006.

MANEG, O. et al. Interaction of cytochrome c with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. **Biochim Biophys Acta**, v.1655, n.1-3, p.274-81, 2004.

MARCHBANKS, R.M. et al.. A Mitochondrial sequence variant associated with schizophrenia and stress oxidative. **Schizophrenia Research**, v.65, p.33-38, 2003.

MAURER, I.; ZIERZ, S.; MOLLER, H.. Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v.48, p.125-136, 2001.

MELBERG, A. et al. Anticipation of autossomal dominant progressive external ophthalmoplegia with hypogonadism. **Muscle and Nerve**, v.19, p.1561-1569, 1996.

MELONE, M.A. et al. Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/MERFF phenotype. **Arch Neurol**, v.61, n.2, p.269-72, 2004.

MITOMAP - Reporting Mitochondrial DNA Base Substitution Diseases: Coding and Control Region Point Mutations. Disponível em: <<http://www.mitomap.org>> Acesso em Julho de 2006.

MOHLKE, K.L. et al. Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. **Hum Genet**, v.118, n.2, p.245-54. 2005.

MORRINSON, Paul D.; MURRAY, Robin M. Schizophrenia. **Current Biology**, v.15, n.24.

MURPHY, K. C. et al (1999). High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. **Arch Gen Psychiatry**, n.56, p.940-945.

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. **The global burden of disease**. Harvard School of Public Health, 1996.

NEWMAN, S.C.; BLAND, R.C. Mortality in a cohort of patients with schizophrenia: a record linkage study. **Can J Psychiatry**, n.36, p.239-245, 1991.

ODINTSOVA, M.S.; IURINA, N.P. Genomics and evolution of cellular organelles. **Genetika**, v.41, n.9, p.1170-82, 2005.

OEXLE, K.; ZWIRNER, A.. Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. **Human Molecular Genetics**, v.6, p.905-908, 1997.

OHARA, K. The n-3 fatty acid/dopamine hypothesis in schizophrenia. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**, v.26, n.4, p.149-53, 2006.

OHTA, S.; OHSAWA, I. Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. **J Alzheimers Dis**, v.9, n.2, p.155-66, 2006.

OJOPI, Elida P. et al. O genoma humano e as perspectivas para o estudo da esquizofrenia. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 2003.

ORTH, M.; SCHAPIRA, A.H.. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet*, n.106, p.27-36, 2001.

ORTH, M.; SCHAPIRA, A.H.. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int*, n.40, p. 533-541, 2002.

OTTONI, Gustavo L.; LARA, Diogo R. **Associação do Polimorfismo 2592C**: Tins do Gene do Receptor A2A de Adenosina e Esquizofrenia. Tese (pós-graduação em ciências biológicas–bioquímica), Porto Alegre: UFRGS, 2004. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

PALHA, A.P.; ESTEVES, M.F. The origin of dementia praecox. *Schizophr Res*, v.19;28, n.2-3, p.99-103, 1997.

PATRON, N.J.; ROGERS, M.B.; KEELING, P.J. Comparative rates of evolution in endosymbiotic nuclear genomes. *BMC Evol Biol*, v.14, n.6, p.46, 2006.

REGIER, D.A. et al. One-month prevalence of mental disorders in the United States. Based on five epidemiologic catchment area sites. *Arch Gen Psychiatry*, v.45, p.977-86, 1988.

RICHTER, C.; PARK, J.W.; AMES, B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.85, p.6465-6467, 1988.

RIECHER-ROSSLER, A. et al. Early detection and treatment of schizophrenia: how early? *Acta Psychiatr Scand*, Suppl., n.429, p.73-80, 2006.

RILEY, B.; KENDLER, K.S. Molecular genetic studies of schizophrenia. *Eur J Hum Genet*. v.14, n.6, p.669-80, 2006.

ROSS, C.A. et al. Neurobiology of Schizophrenia. *Neuron*, v.5;52, n.1, p.139-153, 2006.

ROSSLER, W. et al. The costs of schizophrenia. *Fortschr Neurol Psychiatr*, v.66, n.11, p.496-504, 1998.

SAGIV, S et al. (2002). A Highly Significant Association between COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet* 71:1296-1302.

SANCHES, Rafael Faria et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of the frontal lobe in schizophrenics: a critical review of the methodology. **Rev. Hosp. Clin.**, 2004, v.59, n.3, p.145-152.

SCHEPHERD, M. et al. The natural history of schizophrenia: a 5-year follow-up study of outcome and prediction in a representative sample of schizophrenia. **Psychological Med**, Supl 15, p.1-46, 1989.

SCHNEIDER, K. Primary and secondary symptoms of schizophrenia (1957). In: SHEPPERD, S.H.M. (edit.). **Themes and variations on european psychiatry**. Bristol: John Wright & Sons Ltd, 1974. p.40-4.

SCHON, E.A.. Mitochondrial genetics and disease. **Trends Biochem Sci**, 2000, v.25, p.560.

SCHORK, N.J.; GREENWOOD, T.A.; BRAFF, D.L. Statistical Genetics Concepts and Approaches in Schizophrenia and Related Neuropsychiatric Research. **Schizophr Bull**, n.11, 2006.

SHENKAR, R. et al. The mutation rate of the human mtDNA deletion mtDNA4977. **Am. J. Hum. Genet**, v.50, p.772-780, 1996.

SHEPHERD, M. Emil Kraepelin and modern psychiatry. **Kaohsiung J Med Sci**, v.14, n.7, p.395-404, 1998.

SIBYLLE, et al. Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage in an additional sample of triade families. **Am. J. Hum. Genet.**, v.72, n.185-190, 2003.

SINGH, K.K. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability. **FEMS Yeast Res**, v.5, n.2, p.127-32, 2004.

STEFANSSON et al. Neuregulin 1 and susceptibility for schizophrenia. **Am. J. Hum.**, n.71, p877-892, 2002.

STOTZ-INGENLATH, G. Epistemological aspects of Eugen Bleuler's conception of schizophrenia in 1911. **Med Health Care Philos**, v.3, n.2, p.153-9, 2000.

STRAUB, R.E.; MACLEAN, C.J.; O'NEILL, F.A.; BURKE, J.; MURPHY, B.; DUKE, F.; SHINKWIN, R.; WEBB, B.T.; ZHANG, J.; WALSH, D. ET AL - A potential vulnerability locus for schizophrenia on chromosome 6p24-22: evidence for genetic heterogeneity. **Nature Genet** 11: 287, 1995.

STUART, J.A.; BROWN, M.F. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. **Biochim Biophys Acta**, v.1757, n.2, p.79-89, 2006.

SULLIVAN, P.G.; BROWN, M.R. Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.29, n.3, p.407-10, 2005.

TOKORO, T.; ITO, H.; SUZUKI, T. Alterations in mitochondrial DNA and enzyme activities in hypertrophied myocardium of stroke-prone SHRS. **Clin Exp Hypertens**, v.18, n.5, p.595-606, 1996.

VARLAMOV, D.A. et al. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. **Human Molecular Genetics**, v.11, n.16, p.1797-1805, 2002.

VICENTE, B. et al. Trastornos psiquiátricos en diez comunas de Santiago: Prevalência de seis meses. **Rev Psiquiatr Chile**, n.4, p.194-202, 1994.

WALLACE, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annu Rev Genet**, n.39, p.359-407, 2005.

WALLACE, D.C. Diseases of the mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Biochem**, n.61, p.1175-212, 1992.

WALLACE, D.C. Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? **Science**, v.256, p.628-632, 1992.

ZEVIANI, M.; SPINAZZOLA, A. Mitochondrial disorders. **Curr Neurol Neurosci Rep.**, v.3, n.5, p.423-32, 2003.

ORIGINAL ARTICLE

**ASSOCIATION BETWEEN MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES
VARIANTS OF CO1 GENE AND SCHIZOPHRENIA**

Matias Nunes Frizzo¹, Juliana Fredo¹, Roseane Boeck¹, Gustavo
Ottoni², Mauricio Bogo¹, Diogo R. Lara¹.

Correspondence to the authors: mnfrizzo@hotmail.com

¹Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 6610, Partenon, CEP. 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

² Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Schizophrenia is a serious neuropsychiatric disease with high heritability that affects nearly 1% of the world population. The mitochondria are the largest site of energy production in the cell and for this reason mutations in DNAm (deletion/polymorphisms) can cause alterations in mitochondrial metabolism, causing tissue damage. Alterations in energy production have been shown in neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Some DNAm mutations diminish cytochrome c oxidase activity and may be related to increased risk of schizophrenia in the population. In the present work, we investigated allele prevalence in two polymorphisms in the DNAm of schizophrenic and control patients. We analyzed the C6489A and C7028T polymorphisms in the CO1 gene that codifies cytochrome c oxidase. Specific oligonucleotides were used with the objective of amplifying the polymorphic regions. The PCR products were purified and sequenced (MegaBACE 1000/GE Healthcare TM) and the generated sequences analyzed using the Chromas v2.31 program. Eighty (80) schizophrenic patients and 80 controls were analyzed. The mutant A allele in polymorphic region C6489A was not found. Regarding the C7028T polymorphism, 64 patients and 55 controls presented the mutant T allele, with a significant association between the T allele and the risk to develop schizophrenia. The T allele may be a risk factor for schizophrenia, warranting further investigation.

Key-Words: schizophrenia, mtDNA, polymorphisms.

INTRODUCTION

Several lines of evidence suggest that mitochondrial dysfunction may be involved in the pathophysiology of mental disorders such as bipolar disorder and schizophrenia (Kato and Kato, 2000; Ben-Shachar, 2002). Mitochondria are organelles directly involved in energy production (Lesnefsky and Hoppel, 2006), which is essential for most cellular processes, particularly those of nerve cells (Marchbanks et al., 2003; Fontanesi et al., 2006).

The major source of adenosine 5'-triphosphate (ATP) in neurons is mitochondrial oxidative phosphorylation. This process is accomplished by the respiratory chain, requiring the role of cytochrome c oxidase in complex IV. Defects in oxidative phosphorylation in the central nervous system (CNS) have deleterious effects causing mitochondria encephalopathy (Wolfram et al., 2004). Respiratory chain disturbances have a variety of consequences that may be linked to schizophrenia. Oxidative phosphorylation impairment can result in reduced energy supply, neuronal depolarization, increases in intracellular calcium, which are buffered by mitochondria, and activation of NMDA receptors followed by neuronal death due to slow excitotoxic mechanisms (Maurer et al., 2001; Kato, 2001). Oxidative stress caused by an increase in free radical generation may be related to the state of chronic oxidative stress documented in schizophrenia (Maurer et al., 2001).

Some patients with mitochondrial diseases have both mental symptoms and physical manifestations. Comorbidity of bipolar disorder or depression with chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO) has been reported, and comorbidity of schizophrenia with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) have also been documented (Melberg, 1996; Oexle and Zwirner, 1997). These clinical findings indicate that altered mitochondrial function may also contribute to the pathophysiology of psychiatric disorders.

Genetic contribution in schizophrenia pathogenesis involves multiple genes of small effect rather than a single gene of large effect (Morrison and Murray, 2005). Most studies have focused on nuclear DNA. Association studies of mtDNA polymorphisms with other neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, bipolar mood disorder and epilepsy have been reported (Kato and Takahashi, 1996; Kato et al., 2000; Orth and Shapira, 2001; Kato et al., 2001; Orth and Shapira, 2002; Kato et al., 2004), but not for schizophrenia.

COI gene encodes cytochrome c oxidase of complex IV of the respiratory chain. Previous studies have reported an association between two mtDNA variants C6489A and C7028T with epilepsy and Parkinson's disease (Varlamov et al., 2002, Jiang et al., 2004). *In vivo* investigations of mitochondrial function showed that C6489A point mutations lead to a mild deficiency in cytochrome c oxidase activity, with considerable

consequences in oxidative tissues (Varlamov et al., 2002). The objective of this study is to evaluate if these COI 1 mitochondrial variants could be associated with schizophrenia.

METHODS

A case-control study was performed comparing schizophrenia and healthy control groups on C6489A and C7028T COI gene polymorphisms. Schizophrenia subjects were enrolled from Psychiatric services located in Porto Alegre Metropolitan Area, Rio Grande do Sul, Brazil. Healthy subjects from University and Psychiatric services without familial neuropsychiatry diseases were invited to participate in the study. All cases met DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) criteria for schizophrenia, evaluated with SCID-I. Demographic and clinical data were collected in both groups. The study was previously approved by Pontifícia Universidade Católica Ethical Committee and all subjects signed an informed consent form.

Peripheral blood samples were collected and lymphocytes were used to extract mtDNA in controls and schizophrenia patients. DNA was extracted with a commercial kit stored at -20 °C. The sample set contained DNA from 80 patients with schizophrenia and 80 controls.

DNA amplification

The 827 and 886 bp fragments, containing the mtDNA C6489A and C7028T polymorphism sites, respectively, were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the following primer sets: 5855F (9F) 5'-GAGGCCTAACCCCTGTCTTT-3' and 6642 (9R) 5'-

ATTCCGAAGCCTGGTAGGAT-3' for the C6489A; and 6469 (10F) 5'-CTCTTCGTCTGATCCGTCCT-3' and 7315 (10R) 5'-AGCGAAGGCTTCTCAAATCA-3' for the 7028 polymorphism.

The PCR reaction was performed in a 20 μ l volume containing 20 ng of genomic template, 0.20 μ M of each primer, 200 μ M each dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 0.50 U of Taq Polymerase (Invitrogen), 1.5 Mm of MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), and 50 mM KCl. The parameters of the PCR reaction were as follows: an initial denaturation step for 5 min at 94°C followed by 40 cycles of denaturation for 15s at 94°C, annealing for 15s for 60°C, and extension of 3 min at 72°C, with a final extension for 10 min at 72°C.

DNA sequencing

Following DNA amplification unincorporated PCR primers and deoxynucleotide triphosphates into the samples were inactivated prior to sequencing by an enzymatic treatment.

For sequencing the treated PCR was subdivided in two reactions as follows: 150 ng of the DNA, 0.25 μ M of specific primer (reverse and forward). Sequencing reactions were denatured for 20 seconds at 95 °C followed by 34 cycles at 95 °C for 20 seconds, 50 °C for 15 seconds, 60 °C for 1 minute and 4 °C for 1 hour.

After the sequencing the reactions were pooled and subjected to ethanol precipitation. The extension products were sequenced by DNA

“MegaBACE” 1000 (GE HealthcareTM) for Genomic and Molecular Biology Center by PUCRS.

The chromatograms generated by electrophoretic running of the sequencing reactions were analysed in the Chromas software (www.technelysium.com.au, 2006) and the alleles and genotypes were determined.

Statistical analysis

MtDNA variants frequencies in two different COI 1 gene positions were calculated. Chi-square test was used to analyze the association between each COI gene variants and schizophrenia. Mean age between groups were compared by Student t test. Age, sex were investigated with possible intervenient variables in association analysis. All statistical analysis with $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The study included 80 schizophrenia patients and 80 health volunteers. Mean age of healthy and schizophrenia subjects was 41.90 ± 13.51 and 37.58 ± 9.18 , respectively. 43.75% (35) males and 56.25% (45) females compound the healthy group and 68.8% (55) and 31.3% (25) compound the schizophrenia group. C6489A heteroplasmic missense mutation analysis showed that all healthy and schizophrenia subjects present wild-type mtDNA (C).

C7028T polymorphism comparison between healthy and schizophrenia group is described in Table 1. The results showed that T variant was more prevalent in schizophrenia when we compared the two groups ($p=0.001$), with an odds ratio of 3.27 for carrying the C allele in schizophrenic patients. We did not find gender influence in this result since in male and female the association was significantly maintained. Male odds ratio was 3.384 (CI95%= 1.347-8.503, $p=0.008$) and female was 3.837 (CI95%=1.130-13.021, $p=0.025$).

Table 1: Comparison of C7028T mt-DNA variant frequencies between healthy and schizophrenia subjects.

Mt-DNA Variants	Groups		OR	Confidence
	Schizophrenia	Healthy		Interval 95% Lower-Upper
	% (n)	% (n)		
T	80.0 (64)	55 (44)	3.273	1.620-6.610
C	20.0 (16)	45.0 (36)		

DISCUSSION

We described here, for the first time, a possible association between one polymorphism of mitochondrial COI 1 gene and schizophrenia (C7028T). The odds ratio analysis suggests that the association between T variant and schizophrenia is moderate and occurs in both males and females.

The results also showed no subjects with C6489A mutation in the sample analyzed. This mutation was previously found in a therapy-resistant epileptic patient (Varlamov et al., 2002). As epilepsy, and other neuropsychiatry diseases including schizophrenia could have common pathogenesis elements, we investigated this mutation in schizophrenia. This idea was corroborated by biological plausibility that shows association between chronic oxidative stress caused by metabolic conditions as COX deficiency and symptoms of schizophrenia.

Several independent lines of evidence suggest that changes in energy generation may occur in schizophrenia. An association of oxidative phosphorylation in the schizophrenia pathogenesis was first suggested by Takahashi (1954), who observed a reduced oxygen uptake in brain specimens from schizophrenics. Additional clinical studies using positron emission tomography (PET) corroborated this hypothesis showing decreased oxidative metabolism in the frontal cortex of schizophrenic patients (Maurer et al., 2001).

Neuroimaging studies using phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy (³¹P-MRS) showed lower levels of ATP in the basal ganglia, temporal and frontal lobes of schizophrenia patients (Fujimoto et al., 1992; Kegeles et al., 1998). Furthermore, Cavelier et al (1995) examined cytochrome oxidase activity in the brains of schizophrenic patients postmortem and compared them with those of patients with Alzheimer's disease. Activity was significantly decreased in caudate (63%) and frontal cortex (43%) in schizophrenic patients compared with controls (Cavelier et al., 1995). From these results, it can be suggested that decreased oxidative metabolism in schizophrenia may be caused by an abnormality in energy generation in the mitochondrial respiratory chain. Our results regarding COI gene are in line with this hypothesis

The limitations of this study are small sample size and lack of haplogroup characterization. Also, it is yet unknown if C7028T polymorphism results in function alterations in cytochrome c oxidase activity. Therefore, further studies in independent samples will be needed to confirm and expand these results.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported with grants from FAPERGS and CNPq.

REFERENCES

1. Bem-Shachar, D.(2002). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *Jornal of Neurochemistry*. 83:1241-1251.
2. Cavelier, L, Jazin, EE, Eriksson, I, Prince, J, Bave, U., Orelund, L, Gyllensten, U. (1995). Decreased cytochrome-c oxidase activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics. *Genomics*. 1:217-224.
3. Fontanesi, et al. (2006). Assembly of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase, a Complicated and Highly Regulated Cellular Process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 6:1129-47.
4. Fujimoto, T, Nakano, T, Takano, T, Hokazono, Y, Asakura, T, Tsuji, T. (1992). Study of chronic schizophrenics using ³¹p magnetic resonance chemical shift imaging. *Acta Psychiatrica Scandinavia*, 86:455-462.
5. Jiang, Y, Ellis, T, Greenlee, AR. (2004) Genotyping Parkinson disease-associated mitochondrial polymorphisms. *Clinical Medicine & Research*, 2:99-106.
6. Kato, C, Umekage, T, Tochigi, M, Otowa T, Hibino, H, Ohtani, T, Kohda, K, Kato, N, Sasaki, T. (2004). Mitochondrial DNA polymorphism and extraversion. *Am J Med B Neuropsychiar Genet*, 1:76-79.
7. Kato, T. (2001). The other, forgotten genome: mitochondrial DNA and mental disorders. *Mol Psychiatry*. 6:3625-3633.
8. Kato, T, Kunugi, H, Nanko, S, Kato, N. (2000). Association of bipolar disorder with 5178 polymorphism in mitochondrial DNA. *American Jornal of Medical Genetics* 96:182-186.
9. Kato, T, Kunugi, H, Nanko, S, Kato, N. (2001). Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *J Affect Disord* 61:151-164.
10. Kato, T, Takahashi, Y. (1996). Deletion of leukocyte mitochondrial DNA in bipolar disorder. *J Affect Disord* 37:67-73.

11. Kegeles, LS, Humaran, TJ, Mann, JJ. (1998). In vivo neurochemistry of the brain in schizophrenia as revealed by magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatric* 44:382-398.
12. Lesnefsky, EJ, Hoppel, CL. (2006). Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res Rev*, 4:402-33.
13. Lindholm, E, Cavelier, L, Howell, WM, Eriksson, I, Jalonen, P, Adolfsso, Blackwood DH, Muir, WJ, Brooker, AJ, Gyllensten, U, Jazin, EF. (1997). Mitochondrial sequence variants in patients with schizophrenic. *Eur J Hum Genet*. 6:406-412.
14. Ly, CV, Verstreken, P. (2006). Mitochondria at the synapse. *Neuroscientist*, 4:291-299. Review.
15. Marchbanks, RM, Ryan, M, Day, INM, Owen, M, McGuffin P, Whatley, SA. (2003). A Mitochondrial sequence variant associated with schizophrenia and stress oxidative. *Schizophrenia Reserch* 65:33-38.
16. Maurer, I, Zierz, S, Moller, H. (2001). Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 48:125-136.
17. Melberg, A, Arnell, H, Dahl, N, Stalberg, E, Raininko, R, Oldfors, A, Bakall, B, Lunderberg, PO, Holme, E. (1996). Anticipation of autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with hypogonadism. *Muscle end Nerve* 19:1561-1569.
18. Morrison, Paul D. and Murray, Robin M. Schizophrenia. *Current Biology*, v.15, n.24.
19. Murphy, KC et al. (1999). High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatric* 56:940-945.
20. Murray, CJL, Lopez, AD. (1996). *The global burden of disease*. Harvard School of Public Health.
21. Oexle, K, Zwirner, A. (1997). Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. *Human Molecular Genetics* 6:905-908.
22. Orth, M, Schapira, AH. (2001). Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* 106:27-36.

23. Orth, M, Schapira, AH. (2002). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 40:533-541.
24. Sagiv, S et al. (2002). A Highly Significant Association between COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet* 71:1296-1302.
25. Varlamov, DA, Kudin, AP, Vielhaber, S, Schöder, R, Sassen, R, Becker, A, Kunz, D, Haug, K, Rebstock, J, Heils, A. (2002). Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. *Human Molecular Genetics*, 16:1797-1805.
26. Wolfram, S, Kunz, Nana Yaw-B, Bimpong-Buta, Alexei P, Kudin, and Christian E. Elger. (2004). The Role of Mitochondrial in Epilepsy: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Toxicology Mechanisms and Methods* 14:19-23.

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO

Revista Psychiatric genetics – impacto 2,3.

Double spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate page: title page, abstract and keywords, text, acknowledgements, references, individual tables and captions. Margins should be not less than 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the title page, and the page number should be placed in the top right hand corner of each page. Abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided.

Brief reports should be of no more than 1500 words and two tables or figures. Please contact the editorial office to discuss the suitability of topics for review (up to 7500 words), commentary (up to 2500 words) or other material falling outside the usual categories.

Presentation of papers

Title page

The title page should carry the full title of the paper and a short title to be used as a ‘running head’ (and which should be so identified). The first name, middle initial and last name of each author should appear. If the work is to be attributed to a department or institution, its full name should be included. Any disclaimers should appear on the title page, as should the name

and address of the author responsible for correspondence concerning the manuscript and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made. Finally, the title page should include the sources of any support for the work in the form of grants, equipment, drugs, or any combination of these.

Abstracts

The second page should carry a structured abstract of no more than 250 words. The abstract should state the Objective(s) of the study or investigation, basic Methods (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main Results (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal Conclusions. It should emphasise new and important aspects of the study or observations. Review articles, brief reports and commentaries should include an unstructured summary of no more than 150 words.

Keywords

The abstract should be followed by a list of 3–10 keywords or short phrases which will assist the cross-indexing of the article and which may be published. When possible, the terms used should be from the Medical Subject Headings list of the National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Text

Full papers of an experimental or observational nature may be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results and Discussion (including a conclusion), although reviews may require a different format.

Acknowledgements

Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions.

References

For references, please follow the Harvard system. In the text give the author(s) name and, in parenthesis the date of the paper/book being cited. Differentiate between papers by the same author in the same year by a, b, c, d, etc., immediately after the date. Where there are three or more authors use et al. in the text and a, b, c, to resolve ambiguities. All works cited must be listed at the end of the paper, ordered alphabetically by first author's name. For each first author, list single authored works in chronological order. References should include the names of all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first six names and add et al. References should also include full title and source information. Journal names should be abbreviated as in MEDLINE (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Articles in journals**Standard journal article:**

McGuigan, FEA, Ralston, SH. (2002). Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatr Genet* 12:133-136.

Books**Book:**

First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (1997). Structured clinical interview for DSM-IV Axis I and II disorders. Washington, DC: American Psychiatric Press.

Chapter in a book:

Venables P (1964). Input dysfunction in schizophrenia. In: Maher BA, editor. *Progress in Experimental Research*. New York: Academic Press, pp. 1-47.

Personal communications and unpublished work should not feature in the reference list but should appear in parentheses in the text. Unpublished work accepted for publication but not yet released should be included in the reference list with the words 'in press' in parentheses beside the name of the journal concerned. References must be verified by the author(s) against the original documents.

Tables

Each table should be typed on a separate sheet in double spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Table 3) and a brief title. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram avaliados dois polimorfismos de DNA mitocondrial que codificam para citocromo c oxidase e sua associação com a esquizofrenia.

Como resultados, encontramos apenas associação com um polimorfismo, o C7028T, na qual verificou-se que o alelo T, mutado, tem uma incidência mais elevada na população de esquizofrênicos do que na população de indivíduos controle. Através desse resultado, verificou-se que o alelo T é 3,27 vezes mais incidente que o alelo C, sugerindo que os portadores do alelo T possuem um risco maior para desenvolver esquizofrenia do que os portadores do alelo C.

Esse estudo tem limitações a serem consideradas. As amostras são relativamente pequenas e é aconselhável realizar a haplogrupagem dos pacientes estudados. Dessa forma poderá se saber os seus respectivos haplogrupos e excluir a hipótese de algum haplogrupo possuir um destes polimorfismos como marcador e assim induzir a uma falsa associação. Também será importante investigar a relevância funcional do polimorfismo C7028T.

Portanto, para clarear os resultados e obter associações mais significantes é importante que se aumente a população amostral dos grupos estudados e se realize a haplogrupagem de todos os pacientes. No entanto, esse resultado aponta para o polimorfismo C7028T como um potencial candidato com relevância para o risco de vir a desenvolver esquizofrenia.