



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Título da Dissertação de Mestrado:

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES ND2 E ND3
QUE CODIFICAM PARA SUBUNIDADES DA NADH DESIDROGENASE EM
DNA MITOCONDRIAL DE PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS**

PÓS-GRADUANDA:
JULIANA FOLETTO FREDO RONCATO

ORIENTADOR:
MAURÍCIO REIS BOGO

CO-ORIENTADOR:
DIOGO RIZZATO LARA

Porto Alegre, RS
Janeiro/2007

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Título da Dissertação de Mestrado:

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES ND2 E ND3
QUE CODIFICAM PARA SUBUNIDADES DA NADH DESIDROGENASE EM
DNA MITOCONDRIAL DE PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS**

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: Juliana Foletto Fredo Roncato
Orientador: Maurício Reis Bogo
Co-Orientador: Diogo Rizzato Lara**

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Maurício Reis Bogo pela confiança que depositou em mim desde que nos conhecemos e que foi quem sempre acreditou que alcançaríamos os objetivos determinados.

Também ao Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara por disponibilizar o Banco de Dados e incluir-me no fascinante mundo da pesquisa dos transtornos neuropsiquiátricos.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS, que de alguma maneira contribuíram para a minha “empreitada” que foi o mestrado em Biologia Celular e Molecular.

À colega e também professora e Mestre Jacqueline Piccoli pela disposição de auxiliar em todos os momentos (mesmo nos mais difíceis para ela).

À colega Josiane Bandinelli que foi a minha “tábua de salvação” num momento em que tudo parecia perdido, obrigada de coração.

À Bióloga Cladinara Roberts Sarturi sem a qual esse projeto não seria possível.

Aos colegas de curso e agora grandes amigos: Paula Heinen, Márcia Kober, Siomara Dias da Costa Lemos, Matias Frizzo, Paulo Raimann e Fábio Maito, pela amizade e companheirismo. Sempre sentirei saudades...

E por fim, mas nunca menos importante:

Aos meus pais Clareci e Vilmar Fredo que sempre me apoiaram nas minhas decisões e projetos de vida, que nunca me deixaram desistir diante das dificuldades e obstáculos, que me ensinaram superação, a lutar pelos meus objetivos, enfim, a crescer e me tornar a pessoa que sou hoje. Amo vocês desde sempre e para sempre!!!

E ao meu namorado – noivo e agora amado marido Ricardo Roncato que soube entender e aceitar as minhas ausências, que acreditou no meu potencial para concluir mais essa etapa, que me “empurrava pra frente” em cada desânimo, que soube me amar e me incentivar nesses dois anos e em todos os outros da nossa vida em comum... Te amo muito!!!

SUMÁRIO

RESUMO	5
INTRODUÇÃO.....	7
1. <i>Esquizofrenia</i>	7
I – Conceitos	7
II – Causas	8
III – Sintomas.....	10
IV– Neuroquímica	11
V – Tratamento	15
2. <i>Mitocôndria</i>	16
I – Características.....	16
II – Mutações no mtDNA e Patologias	17
III - Polimorfismos nos genes ND2 e ND3 das subunidades 2 e 3 da NADH Desidrogenase – A4769G e A10398G.....	19
JUSTIFICATIVA.....	21
OBJETIVO.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
POSITIVE ASSOCIATION AMONG MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISMS AND SCHIZOPHRENIA.....	27
CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
NORMAS PARA PUBLICAÇÃO:.....	39

Resumo:**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES ND2 E ND3 QUE CODIFICAM PARA SUBUNIDADES DA NADH DESIDROGENASE EM DNA MITOCONDRIAL DE PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS****Mestranda:** Juliana Foletto Fredo Roncato¹**Orientador:** Prof. Dr. Maurício Reis Bogo²**Co-Orientador:** Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara³

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica que afeta cerca de 1% da população mundial e que, devido aos seus diversos sintomas, acarreta um enorme custo social direto (hospitalizações, atendimentos, medicações) e indireto (improdutividade, repercussões familiares). Os estudos de genética populacional indicam que a esquizofrenia tenha um componente genético relevante além da influência do ambiente.

Neste sentido, além de estudos no DNA nuclear, têm sido investigadas as alterações no DNA Mitocondrial (mtDNA). O mtDNA apresenta herança materna, e por isso é muito útil em estudos populacionais. Estudos com doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer sugerem que, ao menos em parte, o mtDNA contribua para suas etiologias. Manifestações neuropsiquiátricas características de encefalopatias mitocondriais causadas por mutações do mtDNA são convulsões, demência e dor de cabeça. Além disso, um estado confusional agudo, com alguns sintomas semelhantes aos que ocorrem na esquizofrenia (desorganização mental e alucinações), às vezes é observado em MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*), uma encefalopatia mitocondrial típica. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi averiguar uma possível associação entre polimorfismos A4769G e A10398G de mtDNA, que já foram descritos como predisponentes a outras doenças neuropsiquiátricas, com o desenvolvimento

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

² Orientador/ Centro de Biologia Genômica e Molecular /PUCRS

³ Co-Orientador / Laboratório de Bioquímica/ PUCRS

da esquizofrenia. Os polimorfismos A4769G e A10398G estão respectivamente localizados nos genes ND2 e ND3, que codificam para subunidades 2 e 3 da NADH Desidrogenase. Para relacionar esses polimorfismos com a esquizofrenia, testamos 76 pacientes esquizofrênicos quanto à ocorrência ou não destas variantes polimórficas no mtDNA e comparamos com as amostras de 88 controles sadios. Esses polimorfismos foram analisados utilizando-se o seqüenciador automático de DNA “MegaBACE” 1000 (GE HealthcareTM) do Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS. Os cromatogramas gerados pela corrida eletroforética das reações de seqüenciamento foram analisadas no programa Chromas para determinar a ocorrência ou não da variação polimórfica. Quanto à análise estatística, foi realizado teste do qui-quadrado para variáveis categóricas. O nível de significância estatística foi $p \leq 0,05$.

Em relação ao polimorfismo A4769G, foram analisadas amostras de 76 pacientes dos quais 61 (80,3%) apresentaram o alelo G e 15 (19,7%) apresentaram o alelo A nesta posição. Das 88 amostras de controles analisadas, obtivemos 82 (93,2%) com o alelo G e 6 (6,8%) com o alelo A (Qui-quadrado $p=0,014$, Odds ratio=2.895). Em relação ao polimorfismo A10398G, dos 62 pacientes analisados, 17 (27,4%) apresentaram o alelo G e 45 (72,6%) o alelo A. Dos 76 controles, 34 (44,7%) apresentaram a presença do alelo mutante G e 42 (55,3%) apresentaram o alelo A para esta posição (Qui-quadrado $p=0,036$, Odds ratio=1.313).

O estudo mostra diferenças estatisticamente significativas na frequência dos sistemas polimórficos estudados entre pacientes esquizofrênicos e controles. Estudos adicionais são necessários para avaliar sua relevância do ponto de vista funcional.

INTRODUÇÃO

1. Esquizofrenia:

I – Conceitos:

Esquizofrenia é um distúrbio neuropsiquiátrico crônico que afeta aproximadamente 1% da população mundial (Busnello et al., 1993; Murray & Lopez, 1996). 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 (primeira admissão hospitalar em média aos 25 anos) do que em mulheres (em média aos 30 anos). No entanto, naqueles indivíduos 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).

O curso de esquizofrenia se dá ao longo da vida. Ocasionalmente, a doença tem um começo rápido, e com episódios de recuperação satisfatória entre as crises. Porém, freqüentemente acontecem outros padrões da doença, com um começo insidioso, recuperação parcial, ou uma falta notável de recuperação entre episódios (Bleuler, 1978). Na maioria das pessoas afetadas, uma deterioração profunda na função psicossocial acontece dentro dos primeiros anos da doença (Lieberman, 1999). Depois dos anos de deterioração iniciais, o curso da doença resume-se a um patamar baixo de estabilidade dos sintomas. Surpreendentemente, os sintomas podem melhorar posteriormente, depois dos 50 anos de idade.

Estes dados são consistentes com vários outros resultados, na Europa e nos EUA, que relatam uma freqüente melhora dos sintomas nos anos posteriores para indivíduos com esquizofrenia (Tsuang et al, 1979), embora divergências existam (Harvey et al., 2003). O curso da esquizofrenia pode ser distinguido facilmente de doenças neurodegenerativas tradicionais, que apresentam declínio progressivo das funções neurológicas (como doença de Parkinson ou de Alzheimer) e de doenças do neurodesenvolvimento tradicionais (como retardo mental), em que a progressão é lenta, mas de início precoce (Tamminga et al., 2005).

II – Causas:

As atuais evidências relativas às causas da esquizofrenia são um mosaico, visto o caráter multifatorial da patologia. Isso inclui, além dos fatores genéticos, fatores não genéticos como, por exemplo, infecções virais e traumas encefálicos no período de desenvolvimento fetal e no primeiro ano de vida (Carter & Chung, 1980; McGue et al., 1983).

Nas décadas passadas vários estudos realizados com familiares mostraram uma correlação entre o grau de parentesco e as chances de surgimento da esquizofrenia (Gottesman, 1991; Kendler & Gardner, 1997). 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%; com um dos pais aumenta para 10 a 15%; com um irmão esquizofrênico as chances aumentam para aproximadamente 20%; e finalmente, entre gêmeos monozigóticos se um dos irmãos é afetado as chances do outro irmão vir a ter esquizofrenia são de 50 a 60% (Gottesman, 1991). Esses dados demonstram que a esquizofrenia tem um componente genético, mas que ele por si só não é determinante para

o desenvolvimento da doença, já que se a base desta patologia fosse devida somente a fatores genéticos, em gêmeos idênticos, se um irmão é esquizofrênico, o outro teria 100% de chance de desenvolver também a doença.

A herdabilidade na esquizofrenia é aproximadamente 80%, mas não é um padrão simples. Sabendo-se que a esquizofrenia tem um componente genético muito relevante e poligênico foi iniciada a procura por genes de susceptibilidade ou predisposição para a doença utilizando-se técnicas de genética molecular. Estudos de associação se mostram vantajosos em patologias poligênicas e multifatoriais (Rish & Merikangas, 1996), pois possibilitam a detecção de genes com efeitos pequenos ou moderados na etiologia de uma doença.

Considera-se que há genes de suscetibilidade múltiplos, cada um de efeito pequeno junto com fatores epigenéticos e ambientais influentes. Como a esquizofrenia não tem mostrado uma forma monogênica e também não apresenta nenhum marcador molecular ou celular, os resultados que tratam da base genética da esquizofrenia são ainda não conclusivos. No entanto, foram feitos estudos de associação em várias regiões cromossômicas, incluindo a 8p, 22q, 2, 3, 5q, 6p, 11q, 13q, e 20p (Owen et al., 2003) e há vários genes dentro destas regiões que foram associados com a doença, incluindo a *neuregulina* (NRG1) (Stefansson et al., 2002), a *disbindina* (DTNBP1) (Schwab et al., 2003), o *G72* (Chumakov et al., 2002), a *D-aminoácido oxidase* (DAAO), o *regulador de sinalização 4 da proteína G* (RGS4) (Chowdari et al., 2002), a *prolina desidrogenase* (ProDH) (Liu et al., 2002), e *catecol-O-metiltransferase* (COMT) (Egan et al., 2001; Shifman et al., 2002). Cada um destes genes pode ser associado racionalmente com um mecanismo de doença pretendido (Harrison & Owen, 2003), mas nenhum mecanismo fisiopatológico explicou totalmente a doença até os dias atuais.

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. Diversas variações gênicas nesses receptores têm sido estudadas; entretanto, os resultados têm-se mostrado contraditórios. Essa seleção pode agora ser aprimorada se forem incorporadas as seqüências genômicas que não estavam disponíveis anteriormente. Quando as análises baseadas em localização e função gênica são conjugadas, pode ser obtida uma lista de genes de interesse, que podem estar mapeados em regiões genômicas importantes para a esquizofrenia (Ojopi et al., 2004).

Considera-se, portanto, que a esquizofrenia tenha um forte componente genético, mas que este sofre influências ambientais, demonstrando assim o seu caráter multifatorial.

III – Sintomas:

Os pacientes com esquizofrenia apresentam diversos tipos de sintomas. Várias meta-análises de grandes populações esquizofrênicas demonstraram o agrupamento de sintomas em pelo menos três domínios de sintomas distintos no curso da esquizofrenia: (1) sintomas positivos, incluindo alucinações, ilusões, desordem de pensamento e paranóia; (2) deficiência cognitiva, especialmente em atenção, memória, função executiva e de resolução de problemas; (3) sintomas negativos, como embotamento afetivo, isolamento social, falta de motivação e apatia. Geralmente esses grupos de sintomas aparecem conjuntamente, entretanto um agrupamento pode predominar; um sintoma não é exclusivo de um grupo ou de outro (Liddle, 1987; Andreasen et al. 1995).

A divisão dos sintomas psicóticos em positivos e negativos tem por finalidade sintetizar de maneira objetiva o estado do paciente. Tendo como ponto de referência a normalidade: os sintomas positivos são aqueles que não deveriam estar presentes, como as alucinações, e os negativos aqueles que deveriam estar presentes, mas estão ausentes, como os déficits de ânimo e da capacidade de planejamento e execução, por exemplo.

Se estes domínios de sintomas são manifestações fisiopatológicas múltiplas de uma única doença ou, se cada sintoma é uma doença parcialmente independente, ainda se constitui em uma pergunta sem resposta definitiva. Porém, presume-se que a heterogeneidade da doença seja, pelo menos em parte, devido a etiologias diversas (Tamminga et al., 2005).

IV– Neuroquímica:

A ênfase nos distúrbios relacionados à dopamina como causa da esquizofrenia emergiu na década de 50, resultante de uma descoberta fortuita onde uma classe de medicamentos denominados fenotiazinas atuava no controle dos sintomas positivos da doença (Carlsson, 1988). Estudos posteriores demonstraram que essas substâncias atuam bloqueando os receptores de dopamina D2. Ao mesmo tempo, a anfetamina, já conhecida como indutora de alucinações e delírios em usuários habituais, estimula a liberação de dopamina no cérebro (Laurelle et al., 1999). Essas evidências levaram à "teoria da dopamina", segundo a qual a maioria dos sintomas psicóticos da esquizofrenia deriva do excesso de liberação de dopamina em regiões importantes do cérebro, como o sistema límbico (considerado o regulador das emoções).

Nos últimos 40 anos, tanto a força como os limites dessa teoria tornaram-se aparentes. Para alguns pacientes, especialmente aqueles com sintomas positivos, a hipótese provou ser

consistente, caso o tratamento fosse realizado com adequação. Para aqueles que só exibem as manifestações positivas, a resposta terapêutica em geral é satisfatória. Para muitos, no entanto, a hipótese não se aplica particularmente naqueles pacientes em que os sintomas surgem gradualmente e nos quais os negativos sobrepõem-se aos positivos (Laurelle et al., 1999).

Essas observações levaram alguns pesquisadores a modificar a hipótese dopaminérgica. Uma correção sugere, por exemplo, que os sintomas negativos e cognitivos podem derivar de níveis dopaminérgicos reduzidos em certas partes do cérebro, como no córtex préfrontal. Como os receptores dopaminérgicos no lobo frontal são basicamente D1 (em lugar de D2), uma estratégia seria buscar drogas que estimulem receptores D1 enquanto inibem os D2.

No final da década de 80, ficou constatado que certas drogas, como a clozapina, por exemplo, têm menos probabilidade de causar rigidez e outros efeitos colaterais neurológicos do que os tratamentos antigos à base de clorpromazina ou haloperidol, e são mais eficazes para sintomas persistentes, tanto positivos como negativos (Lieberman et al., 1989). A clozapina, conhecida como um antipsicótico atípico produz uma menor inibição nos receptores dopaminérgicos do que as drogas mais antigas e atua melhor sobre vários outros neurotransmissores. Essas descobertas levaram ao desenvolvimento e à ampla adoção de vários antipsicóticos atípicos mais recentes, baseados na ação da clozapina. As descobertas também conduziram à proposição de que a dopamina não é o único neurotransmissor em desequilíbrio na esquizofrenia (Brunello et al., 1995).

As teorias amplamente focadas na dopamina são problemáticas ainda sob outros aspectos. O desequilíbrio dopaminérgico não explica por que cerca de 30% dos pacientes

não respondem ao tratamento. Além disso, não oferece uma boa explicação para os sintomas negativos ou cognitivos.

Outra teoria em relação à neuroquímica da esquizofrenia surgiu com o uso de outra droga, o PCP (fenciclidina). Ao contrário da anfetamina, que produz só os sintomas positivos da doença, o PCP induz sintomas semelhantes ao conjunto das manifestações da esquizofrenia: negativos e cognitivos e, por vezes, positivos (Snyder, 1980; Javitt & Zukin, 1991; Tamminga, 1998). Esses efeitos são observados não só em usuários do PCP, mas também em pacientes aos quais são ministradas doses baixas de PCP ou cetamina (um anestésico com efeitos similares) em testes controlados com drogas.

Por volta dos anos 60, esses estudos permitiram traçar os primeiros paralelos entre os efeitos do PCP e os sintomas de esquizofrenia. Sob o efeito da cetamina, principalmente, pessoas normais apresentam dificuldade de pensamento abstrato, aprendizado de novas informações, mudanças estratégicas ou armazenamento temporário de informações. Elas exibem lentidão motora e a redução na emissão da fala, similar à que observamos na esquizofrenia. A administração de PCP ou cetamina torna-as também introvertidas, chegando, por vezes, ao mutismo; a fala, quando existente, é tangencial e concreta. O PCP e a cetamina raramente induzem alucinações em voluntários normais, mas exacerbam esses distúrbios nos portadores de esquizofrenia (Adler et al., 1999).

A capacidade do PCP e da cetamina de induzir um amplo espectro de sintomas esquizofrênicos sugere que essas drogas replicam algum desequilíbrio molecular relevante no cérebro dos esquizofrênicos (Coyle, 1996). Em escala molecular, essas drogas prejudicam o funcionamento do sistema de impulsos cerebrais do glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do cérebro. Mais precisamente, bloqueiam a ação de uma forma de receptor glutamatérgico, conhecido como receptor NMDA (*N-methyl-D-*

aspartate), que desempenha um papel decisivo no desenvolvimento do cérebro, no aprendizado, na memória e no processamento neural em geral. Esse receptor também participa na regulação da liberação da dopamina, e o bloqueio dos receptores NMDA produz os mesmos distúrbios da função dopaminérgica observados tipicamente na esquizofrenia. Portanto, uma disfunção no receptor NMDA, pode, por si só, explicar tanto os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia como as irregularidades dopaminérgicas presentes na raiz dos sintomas positivos (Kemp et al., 1993; Johnson et al., 1987).

Se a redução da atividade do receptor NMDA produz os sintomas da esquizofrenia, o que causaria, então, essa diminuição? A resposta ainda não está clara. Alguns achados sugerem que esquizofrênicos apresentam poucos receptores NMDA, apesar dos genes que codificam esses receptores não estarem, aparentemente, afetados. Se os receptores NMDA estão intactos e presentes em quantidade suficiente, talvez o problema seja uma falha na liberação de glutamato ou na estrutura química de compostos que bloqueiam a atividade do receptor NMDA (Akbarian et al., 1996; Gao et al., 2000).

Há evidências sustentando cada uma dessas hipóteses. Estudos *post mortem* de pacientes esquizofrênicos, por exemplo, revelam não só baixos níveis de glutamato (Kim et al, 1980), como também altos níveis de dois compostos (NAAG [*N-acetyl-aspartyl-glutamate*] e o ácido cinurênico) que prejudicam a atividade dos receptores NMDA (Coyle, 1997; Tsai et al, 1998; Schwarcz et al, 2001). Além disso, os níveis sanguíneos de homocisteína estão elevados. A homocisteína, assim como o ácido cinurênico, bloqueia os receptores de NMDA do cérebro. Geralmente o padrão de ataque da esquizofrenia e seus sintomas sugerem que as moléculas que desestabilizam os receptores NMDA podem se acumular no cérebro do doente, apesar de não haver consenso na questão.

V – Tratamento:

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. Algumas pesquisas na área informam que somente um terço dos pacientes recebem dosagem corretas, o que determina fortemente a eficácia ou não do tratamento (Busnello et al., 1993).

Há implicações terapêuticas quanto a heterogeneidade de sintomas da esquizofrenia: existe um tratamento para a doença? Ou há vários sintomas e vários tratamentos síndrome-específicos?

No início da década de 30, a esquizofrenia foi tratada com procedimentos incomuns e improváveis como a “terapia febril”, adrenalectomia e vasectomia. Até o fim da Segunda Guerra Mundial, a reserpina era usada com alguma eficácia, mas com um fardo de efeitos colaterais considerável. A clorpromazina foi a primeira droga antipsicótica efetiva e seu uso rapidamente se difundiu pelo mundo ocidental.

Os antipsicóticos não curam a doença nem restabelecem a saúde completamente. As drogas antipsicóticas típicas não são muito bem sucedidas na redução dos sintomas negativos, embora as pessoas freqüentemente demonstrem um menor isolamento e apatia em virtude da redução dos episódios psicóticos. Já a sintomatologia positiva tem melhora acentuada (Garver, 2006). Hoje, com drogas antipsicóticas de segunda geração, a situação de pacientes esquizofrênicos melhorou, ainda que permaneçam vários sintomas residuais consideráveis e prejuízos psicossociais vitalícios.

No total, 10–20% dos pacientes apresentam um resultado muito bom com o tratamento. Outros 15–20% são resistentes ao tratamento (resultado altamente problemático). O grupo mediano sofre uma gama de prejuízos mentais contínuos (prejuízos cognitivos, afetivos e psicóticos) apesar dos medicamentos. O impedimento maior para progredir em terapêuticas é a falta de conhecimento consistente sobre a fisiopatologia da doença (Tamminga et al., 2005).

Como os modelos clássicos para a esquizofrenia parecem ter chegado ao seu limite do ponto de vista terapêutico, o estudo de novos modelos fisiopatológicos deve contribuir para a compreensão da doença e para o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. É provável que o conhecimento das alterações genéticas relacionadas à esquizofrenia possa nortear tratamentos mais eficazes em relação aos sintomas e ao curso da doença. A meta de confirmar um gene de suscetibilidade para esquizofrenia é adquirir informação molecular sobre os mecanismos da doença que poderiam conduzir potencialmente a uma compreensão mais específica da doença e poderiam servir de base para o desenvolvimento de tratamentos modernos.

2. Mitocôndria:

I – Características:

As mitocôndrias têm seu próprio material genético, que é duplicado e transmitido às células filhas de maneira independente do DNA (ácido desoxirribonucléico) nuclear. Estas organelas constituem os principais locais celulares de síntese de ATP (adenosina trifosfato), durante o processo de fosforilação oxidativa. Os genes mitocondriais codificam

proteínas essenciais ao seu funcionamento e também os RNA (ácido ribonucléico) ribossômicos e transportadores necessários para sua tradução.

O mtDNA humano foi completamente seqüenciado (Anderson et al., 1981). É uma molécula circular contendo 16.569 pares de bases, que codificam os dois rRNA encontrados nos ribossomos mitocondriais (12S rRNA e 16S rRNA), os 22 tRNA utilizados para a tradução de mRNA mitocondriais e 13 subunidades de proteínas da cadeia de transporte de elétrons. Estão incluídos os genes que codificam para as sete subunidades do complexo I da NADH desidrogenase (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 e ND6), uma subunidade do complexo III da citocromo C oxidase (Cyt b), três subunidades do complexo IV da citocromo C oxidase (COI, COII, e COIII) e duas subunidades do complexo V da ATP sintase (ATP6 e ATP8) (Anderson et al., 1981). Os genes que codificam para as outras subunidades das proteínas mitocondriais estão localizados no genoma nuclear.

Mutações em genes mitocondriais não são herdadas de acordo com as regras mendelianas que governam a herança dos genes nucleares, e obedecem a uma herança chamada *Herança não-mendeliana* ou *Herança plasmática*. Também se costuma denominar a herança mitocondrial de *Herança Materna*, pois características devidas a genes mitocondriais são passadas da mãe para os filhos (Egger & Wilson, 1983).

II – Mutações no mtDNA e Patologias:

Mutações somáticas, como deleções de bases ou de segmentos de oligonucleotídeos do mtDNA são geradas através de lesão por oxigênio, durante toda a vida de um indivíduo. Mutações somáticas no mtDNA ocorrem a uma taxa muito mais alta que no DNA nuclear. São responsáveis por doenças associadas com o processo da fosforilação oxidativa e

também podem estar envolvidas em envelhecimento e desenvolvimento de doenças degenerativas (Tanhauser et al., 1995).

Deficiências nas funções mitocondriais de transporte (por exemplo, carnitina-palmitoil-CoA transferase) e em componentes da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (NADH desidrogenase, citocromo b, citocromo a, a₃ ou F₁F₀-ATPase) têm sido descritas (Petty et al., 1986 e Schoffner et al., 1994).

Uma doença envolvendo especificamente a transdução de energia mitocondrial foi relatada pela primeira vez em 1962, tratando-se de uma miopatia denominada Doença de Luft. Desde então, mais de 100 doenças mitocondriais foram identificadas, incluindo as que envolvem várias enzimas e sistemas de transporte necessários para a manutenção correta e controle da conservação de energia. Muitas afetam o músculo esquelético e o sistema nervoso central (Luft, 1994).

A localização primária das enzimas do Ciclo de Krebs é mitocondrial, embora isoenzimas de algumas delas sejam encontradas no citosol. Esse tipo de distribuição é apropriado, pois o complexo multienzimático piruvato desidrogenase e a seqüência de β-oxidação de ácidos graxos, as duas fontes primárias que geram acetil-CoA, também estão localizadas na mitocôndria. A função catabólica deste ciclo é gerar equivalentes reduzidos (NADH e FADH₂ [*flavin adenine dinucleotide, reduced form*]), que são utilizados para gerar energia, isto é, ATP, na seqüência do transporte de elétrons, durante a fosforilação oxidativa - outro processo contido exclusivamente na mitocôndria.

A gravidade da doença causada por uma mutação no mtDNA depende da natureza da mutação e da proporção de DNA mutante e selvagem presente no tipo celular específico. Entretanto, os tecidos mais comumente afetados são aqueles com grande necessidade de ATP produzido por fosforilação oxidativa e tecidos que necessitam da maioria ou mesmo

de todo o mtDNA na célula para sintetizar proteínas mitocondriais funcionais, como nos sistemas muscular e nervoso.

Kato (2001) levantou a hipótese de que alterações no mtDNA poderiam explicar a patofisiologia de doenças neurodegenerativas, da esquizofrenia e dos transtornos de humor. Kato et al. (2001) relataram associação positiva entre o alelo C do polimorfismo C5178A (*odds ratio*=1.3) e do alelo A do polimorfismo A10398G (*odds ratio*=1.7) no mtDNA com o Distúrbio Bipolar. Uma tendência semelhante foi relatada por McMahon (2000) para o polimorfismo A10398G. Washizuka et al. (2003) encontraram que o alelo A do polimorfismo A10398G foi associado à melhor resposta dos pacientes ao tratamento com Lítio. No entanto, não há estudos de associação entre esses polimorfismos e a esquizofrenia.

III - Polimorfismos nos genes ND2 e ND3 das subunidades 2 e 3 da NADH Desidrogenase – A4769G e A10398G

Os polimorfismos A4769G (ND2) e A10398G (ND3), *Cambridge Reference Sequence* (Anderson et al., 1981; Andrews et al. 1999), foram escolhidos entre os descritos, por três razões: (I) estarem localizados nas regiões codificadoras das subunidades 2 (A4769G) e 3 (A10398G) da NADH desidrogenase, (II) descritos previamente na literatura como associados a algum transtorno neuropsiquiátrico ou neurodegenerativo e (III) não corresponderem à polimorfismos marcadores dos haplogrupos mitocondriais (Herrnstadt et al., 2002).

O polimorfismo A4769G foi relacionado por Kazuno et al. (2005) em pacientes com “psicoses atípicas”. A troca do nucleotídeo de A para G resulta em aminoácido sinônimo (Abu-Amero, 2005). O polimorfismo A10398G foi associado em alguns estudos com o

Distúrbio Bipolar (McMahon et al., 2000; Kato et al., 2001 e Washizuka et al.,2003). Até o momento não foi testada sua associação diretamente com a esquizofrenia. A troca do nucleotídeo A para G resulta na troca do aminoácido alanina para uma treonina no gene que codifica para a subunidade 3 (ND3) da NADH Desidrogenase (Kato et al., 2001) e poderia alterar a funcionalidade da enzima.

JUSTIFICATIVA

A esquizofrenia é uma doença associada a alterações em múltiplos genes e multifatorial. Mutações no mtDNA têm sido apontadas em diversos estudos como fator importante na etiologia de transtornos de humor e doenças neurodegenerativas. No entanto, não há estudos de associação entre polimorfismos em mtDNA e a esquizofrenia.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre a esquizofrenia e os polimorfismos A4769G do gene ND2 e A10398G do gene ND3 do mtDNA que codificam para subunidades da NADH Desidrogenase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Amero KK (2005). MITOMAP mtDNA Sequence Data, <http://www.mitomap.org/cgi-bin/mitomap/tb115gen.p1#20050919017>.

Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, et al. (1999). Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 156, 1646-1649.

Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, et al. (1996). Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J. Neurochem.*, 16, 19-30.

Albus M, Scherer J, Hueber S, Lechleuthner T, Kraus G, Zausinger S et al. (1994). The impact of familial loading on gender differences in age at onset of schizophrenia. *Acta Psychiatr. Scand.*, 89, 132-134.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465.

Andreasen NC, Arndt S, Alliger RJ, Miller D, Flaum M (1995). Symptoms of schizophrenia. Methods, meanings, and mechanisms. *Arch. Gen. Psychiatry*, 52, 341-351.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, 23, 147.

Bleuler M (1978). *The Schizophrenic Disorders: Long-Term Patient and Family Studies.* Yale University Press: New Haven, CT.

Brunello N, Massoto C, Steardo L, Markstein R, Racagni G (1995). New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropsychopharmacology*, 13, 177-213.

Busnello ED, Pereira MO, Knapp WP, Salgado CA, Taborda JGV, Knijnik L et al. (1993). Morbidade psiquiátrica na população urbana de Porto Alegre. *J. Brás. Psiquiatr.*, 32, 55-60.

Carter CL, Chung CS (1980). Segregation analysis of schizophrenia under a mixed genetic model. *Hum. Hered.*, 30, 350-356.

Carlsson A (1988). The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1, 179-186.

Chowdari KV, Mirnics K, Semwal P, Wood J, Lawrence E, Bhatia T et al. (2002). Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 1373–1380.

Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H et al. (2002). Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13675–13680.

Coyle JT (1996). The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv. Rev. Psychiatry*, 3, 241–253.

Coyle JT (1997). The nagging question of the function of N-acetylaspartylglutamate. *Neurobiol. Disease* 4:231–38.

Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE et al. (2001). Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 6917–6922.

Egger J, Wilson J (1983). Mitochondrial inheritance in a mitochondrially mediated disease. *N. Engl. J. Med.*, 21, 142-146.

Gao XM, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, et al. (2000). Ionotropic glutamate receptors and expression of Nmethyl- D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 157, 1141–1149.

Garver DL (2006). Evolution of antipsychotic intervention in the schizophrenic psychosis. *Curr. Drug Targets*, 7, 1205-1215.

Gottesman II (1991). *Schizophrenia Gênesis: The Origins of Madness*. New York: WH Freeman Co.

Harrison PJ, Owen M (2003). Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet*, 361, 417–419.

Harvey PD, Bertisch H, Friedman JI, Marcus S, Parrella M, White L (2003). The course of functional decline in geriatric patients with schizophrenia: cognitive-functional and clinical symptoms as determinants of change. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, 11, 610–619.

Herrnstadt C, Elson, JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, Ghosh SS, Olefsky JM, Beal MF, Davis RE and Beal F (2002). Reduced-Median-Network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for major african, asian and european haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.*, 70, 1152-1171.

Javitt DC, Zukin SR (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiat.*, 148, 1301– 1308.

Johnson JW, Ascher P (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325, 529–531.

Kato T (2001). The other, forgotten genome: mitochondrial DNA and mental disorders. *Am. J. Psychiatry.*, 6, 625-33.

Kato T, Kato N (2000). Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disord.*, 2, 180-90.

Kato T, Kunughi H, Nanko S, Kato N (2001). Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.*, 62, 151-64.

Kazuno AA, Munakata K, Mori K, Tanaka M, Nanko S, Kunugi H, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Akiyama T, Washizuka S, Kato N, Kato T (2005). Mitochondrial DNA sequence analysis of patients with 'atypical psychosis'. *Psychiatry Clin Neurosci.*, 59, 497-503

Kemp JA, Leeson PD (1993). The glycine site of the NMDA receptor five years on. *Trends Pharmacol. Sci.*, 141, 20–25.

Kendler K, Gardner C (1997). The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol. Med.*, 27, 411-419.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B (1980). Low cerebro-spinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci. Lett.*, 20, 379–82.

Laurelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R (1999). Increased dopamine transmission in schizophrenia relationship to illness phases. *Biol. Psychiatry*, 46, 56-72.

Lieberman JA, Kane JM, Johns CA (1989). Clozapine: guidelines for clinical management. *J. Clin. Psychiatry*, 50, 329-38.

Liddle PF (1987). The symptoms of chronic schizophrenia: a reexamination of the positive-negative dichotomy. *Br. J. Psychiatry*, 151, 145–151.

Lieberman JA (1999). Pathophysiologic mechanisms in the pathogenesis and clinical course of schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry*, 60, 9–12.

Liu H, Heath SC, Sobin C, Roos JL, Galke BL, Blundell ML et al. (2002). Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 3717–3722.

Luft R (1994). The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8731-8738.

McGue M, Gottesman II, Rao DC (1983). The transmission of schizophrenia under a multifactorial threshold model. *Am. J. Hum. Genet.*, 35, 1161-1178.

McMahon FJ, Chen YS, Patel S, Kokoszka J, Brown MD, Torroni A, DePaulo JR, Wallace DC (2000). Mitochondrial DNA sequence diversity in bipolar affective disorder. *Am. J. Psychiatry* 157, 1058–1064.

Murray CJL, Lopez AD (1996). The global burden of disease. Harvard School of Public Health.

Ojopi EPB, Gregorio SP, Guimarães PEM, Fridman C, Dias Neto E (2004). O genoma humano e as perspectivas para o estudo da esquizofrenia. *Rev. Psiqu. Clín.*, 31, 9-18.

Owen M, Williams N, O'Donovan M (2003). The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol. Psychiatry*, 9, 14–17.

Petty RKH, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1986). The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain*, 109, 915.

Rish N, Merikangas K (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273, 1516-1517.

Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann- Hassenbach M, Albus M et al. (2003). Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am. J. Hum. Genet.*, 72, 185–190.

Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu H-Q, Medoff DR, Tamminga CA, et al. (2001). Increased cortical kynureninate content in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* In press.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A et al. (2002). A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 1296–1302.

Snyder SH (1980). Phencyclidine. *Nature*, 285, 355–356.

Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S et al. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 877–892.

Tamminga CA (1998). Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 12, 21–36

Tamminga CA, Holcomb HH (2005). Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol. Psychiatry*, 10, 27–39.

Tanhauser SM, Laipis PJ (1995). Multiple deletions are detectable in mtDNA of aging mice. *J. Biol. Chem.*, 270, 24769-24775.

Tsai G, van Kammen D, Chen S, Kelley ME, Coyle JT (1998). Glutamatergic neurotransmission involves structural and clinical deficits of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 44, 667–74.

Washizuka S, Ikeda A, Kato N, Kato T (2003). Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 6, 421-4.

Tsuang MT, Woolson RF, Fleming JA (1979). Long-term outcome of major psychoses. I. Schizophrenia and affective disorders compared with psychiatrically symptom-free surgical conditions. *Arch. Gen. Psychiatry*, 36, 1295–1301.

POSITIVE ASSOCIATION AMONG MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISMS AND SCHIZOPHRENIA

Juliana Foletto Fredo Roncato, Matias Nunes Frizzo, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Josiane Bettim Bandinelli, Diogo Rizzato Lara, Maurício Reis Bogo

Abstract

Mitochondria are cytoplasmic organelles that are essential for energy production. Several lines of evidence suggest that mitochondrial dysfunction may be involved in the pathophysiology of schizophrenia. We evaluated the association of the A4769G and A10398G polymorphisms in the mtDNA - two regions that codify for ND2 and ND3 subunits of NADH dehydrogenase - with schizophrenia. Methods: 76 schizophrenics patients and 88 controls were evaluated for the A4769G polymorphism and 62 schizophrenics patients and 76 controls were evaluated for the A10398G polymorphism. Results: there were significant differences in allelic frequencies in the schizophrenic patients and controls: for the A4769G polymorphism, the A allele was present more often in schizophrenic patients than in controls (19.7% and 6.8%, respectively; $p= 0.014$; $OR=2.895$), for the A10398G genotype, the A allele was also more frequent in patients than in controls (72.6% and 55.3%, respectively; $p=0.036$; $OR=1.313$). Conclusions: these polymorphisms may be associated with the susceptibility to develop schizophrenia. Understanding the role of mitochondria in schizophrenia may provide new insights into the pathophysiology and etiology of the disorder, possibly leading to novel treatment approaches.

Keywords: schizophrenia, mtDNA, polymorphisms, electron transport chain, neurodegenerative disorders, NADH dehydrogenase.

1. Introduction

Schizophrenia is a severe neuropsychiatric disorder with strong heritability (Riley and Kendler, 2006) Bipolar disorder and schizophrenia are the two major psychiatric disorders, each affecting around 1% of the population worldwide. Despite decades of extensive genetic and pharmacological studies, the etiology or pathophysiology of these disorders remains unclear. Twin, adoption, family and linkage studies suggest that they are complex genetic diseases (Gershon and Cloninger, 1994).

Accumulating evidence suggests that mitochondrial dysfunction underlies the pathophysiology of bipolar disorder and schizophrenia (Iwamoto et al. 2005; Ben-Shachar, 2002; Kato and Kato, 2000). Mitochondria are cytoplasmic organelles that are essential for energy production. Some patients with mitochondrial disease have mental symptoms as well as physical manifestations (Kakiuchi et al. 2005). Comorbidity of schizophrenia with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) has also been documented (Melberg et al., 1996; Oexle and Zwirner, 1997; Prayson and Wang, 1998; Siciliano et al., 2003; Suomalainen et al., 1992).

Therefore, schizophrenia-like syndromes may occur in some patients as a result of subclinical mitochondrial encephalomyopathy caused by mtDNA mutation. For this reason the pathophysiological involvement of mtDNA abnormalities is of clinical and research interest for mental disorders (Kato, 2001).

Many studies have addressed which polymorphisms from nuclear DNA are associated with schizophrenia (Tamminga and Holcomb, 2005), but relatively little has been research in terms of mitochondrial DNA (mtDNA), which has maternal transmission. Interestingly, for both bipolar disorder and schizophrenia, a higher rate of affected mothers than affected

fathers has been reported, compatible with the theory of maternal inheritance (Goldstein et al., 1990; Shimizu et al., 1987; Wolyniec et al., 1992).

Association studies between mtDNA and psychiatric disorders are scarce. In bipolar disorder was observed a positive association with the C allele of C5178A polymorphism (*odds ratio*=1.3) and with A allele of A10398G polymorphism (*odds ratio*=1.7). However, for schizophrenia there are no studies addressing mtDNA polymorphisms (Kato et al., 2001).

The A4769G polymorphism was found in patients with various psychotic disorders (Kazuno et al., 2005) and it alters the nucleotide tends for consequence a synonymous amino acid (Abu-Amero, 2005).

The A10398G polymorphism was the only polymorphism found with different allelic frequencies in bipolar disorder patients and controls. This polymorphism alters evolutionary conserved threonine codon in the NADH dehydrogenase subunit-3 to alanine. The A10398G polymorphic variant are frequently seen in Caucasians (Kato *et al.*, 2001).

Our objective was to evaluate the allele frequency of two polymorphisms (A4769G and A10398G) in the gene that codify for NADH dehydrogenase in a sample of schizophrenic patients and controls.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

Blood samples were collected from patients with schizophrenia and controls. All cases met *DSM-IV* (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed.- American Psychiatric Association, 1994) criteria for schizophrenia with diagnosis being determined using following a semi-structured interview. A case-control study was

performed comparing schizophrenia and healthy control groups regarding A4769G and A10398G, which are NADH dehydrogenase gene polymorphisms. Schizophrenia subjects were enrolled from Associação Gaúcha de Familiares e Pacientes com Esquizofrenia (AGAFAPE) and Psychiatric services located in Porto Alegre Metropolitan Area, Rio Grande do Sul, Brazil. Healthy subjects from University and Psychiatric services from Hospital São Lucas/PUCRS without familial neuropsychiatry diseases were invited to participate of the study. DNA was extracted by standard methods (Perfect gDNA Blood Mini[®] – Eppendorf) aliquoted into eppendorfs and stored at -20°C until genotyping. The study was previously approved by Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Ethical Committee and all subjects signed an informed consent form. In total, 164 subjects [control (n=88) and schizophrenia (n=76)] were genotyped for these polymorphisms by a researcher who was not aware of the subjects' diagnoses.

2.2. Patients and control samples

Demographic and clinical data were collected in both groups. Euro-descendants, African-descendants and mixed origin individuals as ascertained by morphological characteristics. Although the schizophrenia affects approximately 1% of the population independent of the sex, these data are included in the study, for patients and for controls. The individuals' age if it turns relevant to guarantee that the controls are above the age where the schizophrenic symptoms are already present in affected patients. There were not statistical differences among sex and age data. Data for sex, age and ethnic group of the controls and patients are represented in the table 1.

Table 1 – Age, sex and ethnic group of the controls and patients for polymorphisms A4769G e A10398G

A4769G						A10398G					
Schizophrenia subjects (n=76)			Healthy control (n=88)			Schizophrenia subjects (n=62)			Healthy control (n=76)		
ETHNIC GROUP						ETHNIC GROUP					
Eur.	Afr.	Mix.	Eur.	Afr.	Mix.	Eur.	Afr.	Mix.	Eur.	Afr.	Mix.
60 (78,9%)	07 (9,2%)	09 (11,8%)	67 (76,1%)	07 (7,9%)	14 (15,9%)	51 (82,3%)	04 (6,4%)	07 (11,3%)	59 (77,6%)	07 (9,2%)	10 (13,1%)
SEX						SEX					
Female			Male			Female			Male		
27 (35,5%)			49 (64,5%)			19 (30,6%)			43 (69,4%)		
AGE						AGE					
36,9 (±10,5)			47,6 (±16,8)			36,8 (±10,4)			49,6 (±17,8)		

Eur. – Euro-descendants
Afr. – African-descendants
Mix. – Mixed origin

2.3. DNA amplification

Total DNA was extracted from peripheral blood using standard protocols. The specific primer pairs and their nucleotide sequences were previously described (Rieder et al, 1998).

The mtDNA sequences were amplified separately within each primer pair using following methodology: in 25 µl reactions containing a standard PCR buffer [20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2 mM primer, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen)] and 20 ng genomic DNA. PCR was performed in DNA Thermal Cycler (MJ Research, model PTC 100) was performed with an initial denaturation step at 94°C for 4 min followed by 39 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing for 1 min at 68°C and primer extension at 72°C for 2 min. Following this a final extension was carried out at 72°C for 5 min.

2.4. DNA sequencing

Following DNA amplification, unincorporated PCR primers and deoxynucleotide triphosphates were inactivated prior to sequencing by enzymatic treatment. This was accomplished by mixing 6µl PCR product with 1µl exonuclease and 1µl shrimp alkaline phosphatase (GE Healthcare™) and incubating at 37°C for 15 min followed by 80°C for 15 min to inactivate the exonuclease and alkaline phosphatase enzymes prior to sequencing.

Sequencing reactions were denatured for 20 s at 95°C followed by 34 cycles incubating at 95°C for 20 s, 50°C for 15s, and 60°C for 1 min and 4°C for 60 min. After sequencing, the A, C, G and T reactions were pooled and subjected to ethanol precipitation. The extension products were loaded onto a MegaBACE 1000 (GE Healthcare™) Sequencer. The chromatogram generated by the race eletroforetic of the sequencing reactions was analyzed in the program Chromas ([http:// www.techneesium.com.au](http://www.techneesium.com.au)).

2.5. Statistical analysis

mtDNA variants frequencies in two different NADH dehydrogenase gene polymorphisms were calculated. Chi-square test was used to analyze the association of each NADH dehydrogenase gene variant in schizophrenia and control. All statistical analysis with $p \leq 0,05$ were considered significant.

3. Results

Regarding both A4769G and A10398G polymorphisms, there were significant differences in the frequencies of alleles between schizophrenic patients and controls (Table 2). For the A4769G polymorphism, the A4769 genotype was present more often in schizophrenic patients than in controls (19.7% and 6.8%, respectively; $p=0.014$). For the

A10398G polymorphism, the A10398 genotype was also more frequent in patients than in controls (72.6% and 55.3%, respectively; p=0.036).

Table 2 - Comparison of A4769G and A10398G mtDNA frequencies between healthy and schizophrenia subjects

	A4769G		chi-square	Odds ratio (CI) for A allele
	allele G	allele A		
Schizophrenia subjects	61(80.3%)	15 (19.7%)	6,096, p=0.014	2.895 (1.182-7.089)
Healthy control	82 (93.2%)	6 (6.8%)		
	A10398G			
	allele G	allele A		
Schizophrenia subjects	17(27.4%)	45(72.6%)	4,395, p=0.036	1.313 (1.019-1.693)
Healthy control	34(44.7%)	42(55.3%)		

4. Discussion and conclusion

We have found differences statistical significant in genotype frequencies for both A4769G and A10398G polymorphisms. These polymorphisms are associated with ND2 e ND3 units from NADH dehydrogenase. This is the first association study to address these mtDNA polymorphisms in schizophrenia. Interestingly, we found a similar odds ratio for the 10398A genotype in schizophrenia as reported by Kato et al. (2001) in bipolar disorder (OR=1.693). It is worth pointing out that schizophrenia and bipolar disorder may share some genetic factors (Maier *et al*, 2006).

Other lines of evidence suggest that mitochondrial dysfunction underlies the pathophysiology of schizophrenia (Ben-Shachar, 2002; Ben-Shachar and Laifenfeld, 2004). Altered activity and expression of mitochondrial respiratory chain components in lymphocyte and postmortem brains of patients with schizophrenia have been reported

(Whatley et al., 1996; Dror et al., 2002). Also, an electron micrograph study reported a decreased number of mitochondria per axon in the striatum of medication-free schizophrenia patients (Kung and Roberts, 1999).

Several independent lines of clinical, genetic and neuroimaging evidence suggest the possible involvement of altered cerebral energy metabolism in the pathophysiology of schizophrenia. Cellular energy is primarily generated by mitochondrial oxidative phosphorylation system, a process requiring a co-ordinated action of four respiratory enzyme complexes arranged in a specific orientation in the inner mitochondrial membrane, termed the mitochondrial respiratory chain. Electrons generated from reduced electron carriers NADH and FADH₂, which are produced from oxidation of nutrients such as glucose, are ultimately transferred through the respiratory chain to molecular oxygen. Alterations in the mitochondrial oxidative phosphorylation system have been observed in brain as well as blood cells in schizophrenia (Ben-Shachar, 2002).

Although the influence of the polymorphic variations found on NADH dehydrogenase gene for energy metabolism of the patients with schizophrenia is still unclear, the positive associations involving G allele (A4769G) and A allele (A10398G) described on this study give support to this hypothesis. The G allele of A4769G polymorphism results in a synonymous amino acid. For this reason it is possible to speculate that it could alter the rate of translation of the gene or that it could be in the linkage disequilibrium with another polymorphic site. The change of an A to G at A10398G polymorphism results in an alanine to a threonine substitution and, as a consequence, it could have an effect on the functionality of the NADH dehydrogenase enzyme.

Low sample number is a limitation of this investigation. Nevertheless, these results encourage further studies with larger samples and the inclusion of other polymorphisms in mtDNA, which may lead to a better understanding of the etiology and pathophysiology of schizophrenia.

REFERENCES

Abu-Amero KK (2005). MITOMAP mtDNA Sequence Data, <http://www.mitomap.org/cgi-bin/mitomap/tb115gen.p1#20050919017>.

American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. American Psychiatric Association, Washington, DC.

Ben-Shachar D (2002). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J. Neurochem.* 83, 1241–1251.

Ben-Shachar D, Laifenfeld D (2004). Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol.*, 59, 273–296.

Dror N, Klein E, Karry R, Sheinkman A, Kirsh Z, Mazor M, Tzukerman M, Ben-Shachar D (2002). State-dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 7, 995–1001.

Goldstein JM, Faraone SV, Chen WJ, Tolomiczenko GS, Tsuang MT (1990). Sex differences in the familial transmission of schizophrenia. *Br. J. Psychiatry*, 156, 819-26.

Gershon ES, Cloninger CR (1994). Genetic Approaches to Mental Disorders. American Psychiatric Press, Washington, DC.

Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2005). Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 241-253.

Kakiuchi C, Ishiwata M, Kametani M, Nelson C, Iwamoto K, Kato T (2005). Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletions in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 8, 515–522.

Kato T, Kato N (2000). Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disord.*, 2, 180-90.

Kato T (2001). The other, forgotten genome: mitochondrial DNA and mental disorders. *Am. J. Psychiatry*, 6, 625-33.

Kato T, Kunugui H, Nanko S, Kato N (2001). Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *J Affect Disord.*, 62,151-64.

Kung L, Roberts RC (1999). Mitochondrial pathology in human schizophrenic striatum: a postmortem ultrastructural study. *Synapse*, 31, 67–75

Maier W, Zobel A, Wagner M (2006). Schizophrenia and bipolar disorder: differences and overlaps. *Curr. Opin. Psychiatry*, 19, 165-70.

Melberg A, Arnell H, Dahl N, Stalberg E, Raininko R, Oldfors A, Bakall B, Lundberg PO, Holme E (1996). Anticipation of autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with hypogonadism. *Muscle Nerve*, 19, 1561–1569.

Oexle K, Zwirner A (1997). Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 905–908.

Prayson RA, Wang N (1998). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS) syndrome: an autopsy report. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 122, 978–981.

Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA (1998). Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.*, 26, 967–973.

Riley B, Kendler KS (2006). Molecular genetic studies of schizophrenia. *Eur. J. Hum. Genet.*, 14, 669–80.

Siciliano G, Tessa A, Petrini S, Mancuso M, Bruno C, Grieco GS, Malandrini A, DeFlorio L, Martini B, Federico A, Nappi G, Santorelli FM, Murri L (2003). Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANT1 gene. *Neuromuscul. Disord.*, 13, 162–165.

Shimizu A, Kurachi M, Yamaguchi N, Torii H, Isaki K (1987). Morbidity risk of schizophrenia to parents and siblings of schizophrenic patients. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.*, 41, 65–70.

Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lonnqvist J, Savontaus ML, Peltonen L (1992). Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J. Clin. Invest.*, 90, 61–66.

Tamminga CA, Holcomb HH (2005). Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol. Psychiatry*, 10, 27–39.

Whatley SA, Curti D, Marchbanks RM (1996). Mitochondrial involvement in schizophrenia and other functional psychoses. *Neurochem. Res.*, 21, 995–1004

Wolyniec PS, Pulver AE, McGrath JA, Tam D (1992). Schizophrenia: gender and familial risk. *J. Psychiatr. Res.*, 26, 17–27.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Cada vez mais, procura-se identificar o componente genético, genes ou conjuntos de genes que, quando herdados, deixam um indivíduo mais susceptível a desenvolver alguma patologia. As variações polimórficas encontradas no genoma humano que poderiam desencadear doenças de base genética precisam ser também identificadas a fim de desenvolver tratamentos mais específicos e eficazes. No caso de patologias complexas, que incluem a esquizofrenia, processos multifatoriais são regulados por vários genes e interferências do ambiente, tornando, ainda mais difícil a descoberta de fatores genéticos de risco.

A proposta deste estudo foi buscar a relação entre polimorfismos encontrados nos genes que codificam para as subunidades 2 e 3 da NADH desidrogenase e a esquizofrenia. Não há registro na literatura de estudos com objetivo semelhante.

Os resultados obtidos sugerem uma possível associação entre os genótipos 4769A e 10398A e a esquizofrenia. Interessantemente, o genótipo 10398A já havia sido descrito na literatura como relacionado à pacientes com transtorno bipolar com semelhante odds ratio ao encontrado no nosso estudo (Kato et al., 2001). Já foi sugerido que esquizofrenia e transtorno bipolar possam apresentar bases genéticas com algum grau de sobreposição. Por esta razão, é possível que as variantes polimórficas avaliadas neste estudo possam contribuir para esta hipótese. O aumento do número de indivíduos analisados e a replicação deste estudo com outras populações são importantes.

Neuropsychobiology

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online: [Online Manuscript Submission](#)

Should you experience any problems with your submission, please contact:
Prof. W. Strik - University Hospital of Psychiatry Waldau CH-3000 Bern 60 (Switzerland)
E-Mail neuropsychobiology@puk.unibe.ch

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by any other publication. Submission of an article for publication implies transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Neuropsychobiology' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

Arrangement

Title page: The first page of each paper should indicate the title, the authors' names, the institute where the work was conducted, and a short title for use as running head.

NB: Authors wishing to preserve the phonetic meaning of diacritics (PubMed reduces diacritics to their root characters) must spell their names accordingly when submitting manuscripts (e.g. Müller should be Mueller).

Full address: The exact postal address of the corresponding author complete with postal code must be given at the bottom of the title page. Please also supply phone and fax numbers, as well as e-mail address.

Key words: For indexing purposes, a list of 3–10 key words in English is essential.

Abstract: Each paper needs an abstract in 4 paragraphs and not exceeding 250 words.

Footnotes: Avoid footnotes.

Tables and illustrations: Tables and illustrations (both numbered in Arabic numerals) should be prepared on separate pages. Tables require a heading and figures a legend, also prepared on a separate page. For the reproduction of illustrations, only good drawings and original photographs can be accepted; negatives or photocopies cannot be used. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm) or provide crop marks. Electronically submitted b/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800–1,200 dpi.

Color Illustrations

They are reproduced at the author's expense.

Online and print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at the price of CHF/USD 660.00 per page.

Online edition only: Reproduced at the price of CHF/USD 50.00 per illustration. In print they are black and white. Avoid therefore referring to colors in the text and in the figure legends.

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as ‘unpublished data’ and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, please cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. (Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1997;336:309–315. www.icmje.org)

Digital Object Identifier (DOI) S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Examples

(a) Papers published in periodicals: Chatel J-M, Bernard H, Orson FM: Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. Int Arch Allergy Immunol 2003;131:14–18.

(b) Papers published only with DOI numbers: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. Int Arch Allergy Immunol DOI: 10.1159/000063858.

(c) Monographs: Matthews DE, Farewell VT: Using and Understanding Medical Statistics, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

(d) Edited books: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, Dubois RN (eds): COX-2. Prog Exp Tum Res. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124–137.

Page Charge

There are no page charges for papers of 5 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). Each additional complete or partial page is charged to the author at CHF / USD 290.00. The allotted size of a paper is equal to approx. 15 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author.

Reprint

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.