

Vanessa Kiyomi Arashiro Ota

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E METILAÇÃO DE DNA DE
PACIENTES EM PRIMEIRO EPISÓDIO PSICÓTICO VIRGENS DE
TRATAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências

São Paulo

2015

Vanessa Kiyomi Arashiro Ota

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E METILAÇÃO DE DNA DE
PACIENTES EM PRIMEIRO EPISÓDIO PSICÓTICO VIRGENS DE
TRATAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Sintia Iole Nogueira
Belangero

Co-orientadora: Dra. Patrícia Natália Oliveira
da Silva

São Paulo

2015

Ota, Vanessa Kiyomi Arashiro

Análise de expressão gênica e metilação de DNA de pacientes em primeiro episódio psicótico virgens de tratamento/Vanessa Kiyomi Arashiro Ota. -- São Paulo, 2015.

xxiii, 144 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Título em Inglês: *Gene expression and DNA methylation analyses in drug-naïve first episode of psychosis patients.*

1.Esquizofrenia; 2. Metilação de DNA; 3.Expressão gênica; 4.Genética; 5.Transtornos Psicóticos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional

Chefe da Disciplina de Genética:

Prof^a. Dr^a. Marília de Arruda Cardoso Smith

Chefe do Departamento de Morfologia e Genética:

Prof^a. Dr^a. Sima Godosevicius

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional:

Prof^a. Dr^a. Sintia Iole Nogueira Belangero

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Reitor: Prof^a. Dr^a. Soraya Soubhi Smaili

Vice-reitor: Prof^a. Dr^a. Valéria Petri

Chefe de Gabinete: Prof^a. Dr^a. Maria José da Silva Fernandes

Este estudo foi desenvolvido na seguinte instituição:

Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina (UNIFESP /
EPM)
Departamento de Morfologia e Genética
Disciplina de Genética

Auxílio financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Bolsa de doutorado: processo 2010/19176-3

Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE): processo 2013/11781-3

Auxílio à pesquisa: processo 2010/08968-6

Auxílio à pesquisa (Convênio FAPESP-MCT/CNPq-PRONEX): processo
2011/50740-5

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Auxílio à pesquisa (Convênio FAPESP-MCT/CNPq-PRONEX)

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Sintia Iole Nogueira Belangero

Professora Adjunta

Disciplina de Genética

Departamento de Morfologia e Genética

Departamento de Psiquiatria

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

CO-ORIENTADORA:

Dr^a. Patrícia Natália Oliveira da Silva

Disciplina de Genética

Departamento de Morfologia e Genética

Departamento de Psiquiatria

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

COLABORADORES:

Disciplina de Genética - Departamento de Morfologia e Genética Universidade Federal de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Sintia Iole Nogueira Belangero
Prof.^a Dr.^a Marília Arruda Cardoso Smith
Prof.^a Dr.^a Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno
MS. Marcos Leite Santoro
BS. Letícia Maria Nery Spíndola
BS. Carolina Muniz Félix de Araújo
BS. Daniela da Silva Martinez
Acad. Fernanda Talarico
Acad. Gabriela Xavier
Prof.^a Dr.^a Elizabeth Suchi Chen
Dr.^a Carolina Gigeck

Departamento de Psiquiatria - Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Jair de Jesus Mari
Prof. Dr. Rodrigo Affonseca Bressan
Prof.^a Dr.^a Elisa Brietzke
Dr. Ary Gadelha de Alencar Araripe Neto
Dr. Cristiano da Silva Noto
Dr. Bruno Bertolucci Ortiz
Dr. Elvis Henrique Santos Andrade
Dr.^a Mariane Nunes Noto
Dr.^a Patrícia Natália Oliveira da Silva
BS. Cinthia Hiroko Higuchi

Departamento de Psicobiologia - Universidade Federal de São Paulo

Dr. Diego Robles Mazzotti

Departamento de Psiquiatria - Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

Prof. Dr. Quirino Cordeiro Júnior
Dr. Eduardo Sauerbronn Gouvea
Dr.^a Carolina Garcia Olmos Fernandez
Dr. Pedro H. S. Honda
Dr. Brazilio de Carvalho Tasso
Dr. Rodrigo Lancelote

Centro de Terapia Celular e Molecular - Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Sang Won Han
MS. Roberta Sessa Stilhano
MS. Priscila Keiko Matsumoto

Centro de Matemática, Computação e Cognição – Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. João Ricardo Sato

McGill Group for Suicide Studies – Douglas Mental Health University Institute

Prof. Dr. Gustavo Turecki
Prof. Dr. Carl Ernst
Dr. Gilles Maussion
Dr. Gary Gang Chen

Vanessa Kiyomi Arashiro Ota

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E METILAÇÃO DE DNA DE
PACIENTES EM PRIMEIRO EPISÓDIO PSICÓTICO VIRGENS DE
TRATAMENTO**

Presidente da banca: Prof^a. Dr^a. Sintia Iole Nogueira Belangero

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Aprovada em: __/__/__

Dedico esse trabalho à minha família e meus amigos, pois cada um contribuiu para o meu crescimento e me ajudou a superar mais um desafio.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, **Prof.^a Dr.^a Sintia Iole Nogueira Belangero** por ter me ensinado tanto a genética quanto a vida e a quem admiro muito. Obrigada pela confiança, pelos conselhos sinceros, que me incentivaram a continuar nessa jornada, pelas aulas que foram fonte de inspiração, pelas lições de organização, pelas terapias constantes e pela amizade.

Aos **pacientes e seus familiares** que concordaram em participar do estudo.

À minha querida amiga e co-orientadora, **Patricia**, por ter me incentivado sempre e ter me norteado quando tudo parecia perdido, principalmente nesse final. Obrigada pelas ajudas científicas e não-científicas, pelas muitas risadas e por ser um exemplo de pessoa que também admiro muito.

À **banca examinadora**, **Prof. Dr. Quirino Cordeiro**, **Prof. Dr. Jaime Hallak**, **Prof.^a Dr.^a Silvia Toledo**, **Prof.^a Dr.^a Denise Christofolini**, **Prof. Dr. Helio Elkis** e **Dr.^a Carolina Cappi**, e à **banca da Qualificação**, **Prof.^a Dr.^a Marília Smith**, **Prof.^a Dr.^a Helena Brentani**, **Prof. Dr. Quirino Cordeiro** e **Dr. Diego Mazzotti**, pelas correções e conselhos.

Às amigas e aos amigos da Genética durante esses dez anos: **Anelisa, Fê Wis, Mileny, Pat, Mari, Marizinha, Carol Gigek, Betty, Léo, Roberta, Marquinhos, Letícia, Carol Muniz, Fê Talarico, Gabi, Ana, Vera, Luísa, Adriana, Fê Bellucco, Si, Denise, Renata, Tuty, Diego**, aos mais novos integrantes e às funcionárias **Mara, Lilian e Cleide**; por todos os momentos compartilhados, tanto bons quanto difíceis; por terem me ensinado muito mais do que genética e por fazerem parte da minha vida.

Às professoras **Prof.^a Dr.^a Marília de Arruda Cardoso Smith**, por ter sido a minha primeira orientadora e ter aberto as portas do laboratório, **Prof.^a Dr.^a Maria Isabel Melaragno**, **Prof.^a Dr.^a Gianna Carvalheira**, **Prof.^a Dr.^a Elizabeth Chen** e **Prof.^a Dr.^a Janete Cerutti** pela amizade e contribuição na formação acadêmica.

Ao grupo de Genética Psiquiátrica, **Sintia, Pat, Marquinhos**, amigo me ensinou e ajudou muito, companheiro da desorganização, **Letícia, Carol, Fê, Gabi, Eduardo e Ary**, por ser um grupo fantástico que me ajudou demais ao longo do doutorado, e que são amigos muito especiais. Passamos por muitos momentos e discussões, mas que só ajudaram no nosso crescimento.

Ao grupo do Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC), em especial ao **Ary**, colaborador e amigo exemplar (sempre dando os melhores conselhos), **Cris**, essencial para esse projeto, dedicado e que se tornou um amigo, **Mari, Eduardo, Bruno Ortiz, Elvis, Cinthia, Lucas**; aos professores **Dr Rodrigo Bressan**, **Dr.^a Andrea Jackowski**, **Dr.^a Mirian Hayashi**, **Dr.^a Vanessa Abilio**, **Dr.^a Elisa Brietzke**, **Dr. João Sato**, **Dr. Acioly Lacerda** e **Dr. Jair Mari**, pela confiança e por terem me recebido no grupo de Psiquiatria, às funcionárias **Lucy e Marina**,

pelo auxílio na parte burocrática e pela companhia, e aos demais membros do LiNC, pela amizade e colaborações.

Ao grupo do Centro de Atenção Integrada à Saúde Mental (CAISM) da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, principalmente ao **Dr. Quirino Cordeiro Júnior**, pela colaboração fundamental ao trabalho e pela total dedicação, aos psiquiatras **Eduardo, Cris, Mari, Carolina, Pedro, Fernanda, Brazilio e Rodrigo** pelo atendimento aos pacientes e colaboração; e aos demais funcionários do centro, que auxiliaram na coleta e seguimento dos participantes.

Ao grupo **McGill Group for Suicide Studies** do **Douglas Mental Health University Institute**, por me acolher durante a minha estadia para o doutorado sanduíche, em especial ao **Prof. Dr. Gustavo Turecki**, pela supervisão e pelos ensinamentos científicos, **Prof. Dr. Carl Ernst, Dr. Gilles Maussion, Dr. Gary Gang Chen, Dr.^a Carolina Gigek e Prof.^a Dr.^a Elizabeth Chen**, pela colaboração, e **Camila Medeiros e Paola Niola** pela amizade.

Aos colaboradores, **Prof. Dr. Sang Won Han, Ro e Pri**, pelo auxílio nos sequenciamentos para metilação.

Às minhas queridas irmãs da faculdade, **Pri, Ro, Jú, Tuty e Mari**, que admiro tanto, pelos grandes conselhos que me ajudaram nos momentos difíceis, pela dedicação ao longo desses anos e pela companhia.

Ao **Diego e Tuty**, um exemplo de casal, por terem lido a tese, pela grande amizade e pelos conselhos científicos e estatísticos.

Ao **meu pai**, à **minha mãe**, aos meus irmãos, **Valéria, Jorginho e Vivi**, por todo o amor, carinho, compreensão e por terem se esforçado tanto durante todos esses anos.

À **minha família**: avós, tios e primos, por terem me acolhido durante toda a minha vida, pelas risadas e carinho. Em especial à minha **obá, tia Lúcia, tia Kei, tia Hiroko, tio Toshi, Hitomi, Sayuri, Kaori e Simone**.

Ao meu namorado e amigo **Shindi**, por ter me incentivado e ajudado a crescer. Obrigada por tudo, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e me dado razão para continuar. Por nunca ter desistido e nem ter me deixado desistir dos nossos sonhos.

Ao **Departamento de Morfologia e Genética** pela infraestrutura cedida.

À **FAPESP**, pelo auxílio financeiro.

À **todos** que contribuíram tanto para a minha formação pessoal quanto profissional e **àqueles** que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE SÍMBOLOS	xxi
RESUMO	xxii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 A esquizofrenia e o primeiro episódio psicótico (PEP)	7
2.1.1 Modelo do neurodesenvolvimento da esquizofrenia	9
2.1.2 Via dopaminérgica	10
2.1.3 Via glutamatérgica	10
2.1.4 Via GABAérgica	10
2.2 Bases genômicas da esquizofrenia	11
2.2.1 Estudos de expressão gênica em esquizofrenia	14
2.2.2 Controle epigenético da expressão gênica	18
3 ESTUDO I: ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA / METILAÇÃO EM PRIMEIRO EPISÓDIO PSICÓTICO (PEP)	25
3.1 Métodos	25
3.1.1 Avaliação clínica dos pacientes em primeiro episódio psicótico	25
3.1.2 Indivíduos controles	28
3.1.3 Delineamento geral do estudo	28
3.1.4 Coleta de material e extração de ácidos nucleicos	29
3.1.5 Análise de expressão gênica	30
3.1.6 Análise de metilação de DNA	39
3.1.7 Análise Estatística	43
3.2 Resultados	44
3.2.1 Análise de expressão	45
3.2.2 RT2 Profiler™ PCR Array System	45
3.2.3 TaqMan® Low Density Array	50
3.2.4 Análise epigenética - metilação de DNA	57
3.3 Discussão	60
3.3.1 <i>GCH1</i> (GTP cyclohydrolase 1)	60
3.3.2 <i>GABRR2</i> (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 2)	64
3.3.3 Gene <i>MBP</i> (<i>myelin basic protein</i>)	67
3.3.4 Gene <i>NDEL1</i> (<i>nudE neurodevelopment protein 1-like 1</i>)	70
4 ESTUDO II: ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE <i>MBD5</i> : CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DE UM GENE NO NEURODESENVOLVIMENTO	76
4.1 Apresentação	76
4.2 Introdução	76
4.3 Método	78
4.3.1 Cultura celular	78
4.3.2 Geração de linhagens celulares <i>knockdown</i> , RNAseq e PCR em tempo real	78
4.3.3 Proliferação celular e análise do ciclo celular	80

4.3.4	Resultados.....	80
4.4	Discussão	83
5	CONCLUSÕES.....	87
6	ANEXOS.....	90
	Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP	90
	Anexo 2: Ota et al. <i>Psychiatry Research</i> , 2013d	92
	Anexo 3: Ota et al. <i>Journal of Psychiatric Research</i> , 2014b.....	93
	Anexo 4: Ota et al. <i>Schizophrenia Research</i> , 2014c	94
7	REFERÊNCIAS	96
8	ABSTRACT.....	120
9	APÊNDICES	123
	Apêndice 1: Christofolini et al. <i>Schizophrenia Research</i> , 2011	123
	Apêndice 2: Ota et al. <i>Schizophrenia Research</i> , 2012	124
	Apêndice 3: Gadelha et al. <i>PloS One</i> , 2012	125
	Apêndice 4: Ota et al. <i>Psychiatry Research</i> , 2013a	126
	Apêndice 5: Ota et al. <i>Schizophrenia Research</i> , 2013b	127
	Apêndice 6: Ota et al. <i>Psychiatry Research</i> , 2013c.....	128
	Apêndice 7: Zugman et al. <i>Schizophrenia Research</i> , 2013	129
	Apêndice 8: Assunção Leme et al. <i>CNS Spectrums</i> , 2013.....	130
	Apêndice 9: Ota et al. <i>PloS One</i> , 2014a.....	131
	Apêndice 10: Asevedo et al. <i>Physiology & Behavior</i> , 2014	132
	Apêndice 11: Chen et al. <i>BMC Genomics</i> , 2014	133
	Apêndice 12: Santoro et al. <i>Schizophrenia Research</i> , 2014a.....	134
	Apêndice 13: Santoro et al. <i>Psychiatry Research</i> , 2014b.....	135
	Apêndice 14: Turecki et al. <i>The Lancet Psychiatry</i> , 2014.....	136
	Apêndice 15: Noto & Ota et al. <i>The International Journal of Neuropsychopharmacology</i> , no prelo.....	137
	Apêndice 16: Noto & Ota et al. <i>Schizophrenia Research</i> , no prelo.....	138
	Apêndice 17: Gadelha et al. <i>Schizophrenia Research</i> , no prelo.....	139
	Apêndice 18: Gigek et al., submetido para a <i>Biological Psychiatry</i>	140
	Apêndice 19: Santoro et al., submetido para a <i>World Journal of Biological Psychiatry</i>	141
	Apêndice 20: Spíndola et al., submetido para a <i>World Journal of Biological Psychiatry</i>	142
	Apêndice 21: Gouvea et al., em redação	144

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho do estudo I, indicando as etapas em que foram realizadas as coletas de sangue e as avaliações psiquiátricas (antes e após o tratamento), seguidas pela análise da expressão gênica e de metilação de DNA.	29
Figura 2. Esquema da placa PAHS-060.	31
Figura 3. Esquema da placa CAPH10883.	33
Figura 4. Resultado do PCR <i>array</i> (PAHS-060) de uma amostra, em que podem ser observados o <i>threshold</i> estabelecido em 0,1 e as curvas de amplificação dos 84 genes de receptores e reguladores de neurotransmissores, dos cinco genes endógenos e dos outros controles presentes na placa.	34
Figura 5. <i>Layout</i> TLDA 24.....	36
Figura 6. Resultado do Custom TaqMan®Array de um cartão, analisando 24 genes, em duplicatas para 8 amostras, as 384 curvas de amplificação são modificadas ao se escolher o método de Crt (<i>relative threshold</i>).....	38
Figura 7. <i>Layout</i> TLDA 16.....	39
Figura 8. Região do gene <i>GCH1</i> amplificada após a conversão com o <i>EpiTect Bisulfite Kit</i> , que modifica as citosinas (C) não-metiladas para uracilas e mantém as citosinas metiladas como C. Após as etapas da PCR, as uracilas são substituídas por timinas (T).....	40
Figura 9. Vetor <i>pGEM®-T Easy</i> de 3015 pb, que contém marca de seleção a resistência a ampicilina (<i>Amp^r</i>) e como controle de ligação o gene da β -galactosidase (<i>lacZ</i>)	41
Figura 10. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de <i>GCH1</i>	49
Figura 11. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de <i>GABRR2</i>	50
Figura 12. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de <i>MBP</i>	56
Figura 13. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de <i>NDEL1</i>	56
Figura 14. Envolvimento do <i>GCH1</i> na biossíntese da dopamina, serotonina e óxido nítrico.	61
Figura 15. Hipótese da deficiência de BH4 na esquizofrenia.....	63

Figura 16. Análise de redes pelo <i>software</i> Metacore.	66
Figura 17. Análise do silenciamento de <i>MBD5</i> KD. A) Resultados do PCR em tempo real; B) Resultados do <i>Western Blotting</i>	81
Figura 18. Resultados do RNAseq para células <i>MBD5</i> KD comparadas com controles. A) vias superrepresentadas para genes hipoexpressos; B) vias superrepresentadas para genes hiperexpressos.	82
Figura 19. Replicação com PCR em tempo real. A) análise de expressão do gene <i>MBD5</i> em linhagens <i>MBD5</i> KD e controles, mostrando uma hipoexpressão do gene em <i>MBD5</i> KD; B) análise do gene <i>VGF</i> , mostrando uma superexpressão do gene em <i>MBD5</i> KD; C) análise do gene <i>EEF1A2</i> , mostrando uma superexpressão do gene em <i>MBD5</i> KD.....	82
Figura 20. Resultados do teste de proliferação. A) células após 20h e 44h da tripsinização; B) contagem de células após marcação com azul de tripan; C) Representação das células analisadas para o FACS e marcação com IP visualizado no microscópio; D) perfil do FACS após a marcação com IP, mostrando células em fase G0/G1, S ou G2/M; E) comparação entre células <i>MBD5</i> KD e controle (LacZ) em diferentes fases do ciclo celular medidas por FACS.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Genes que foram analisados utilizando os cartões TLDA 24 da figura 13. .37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados descritivos dos pacientes em primeiro episódio psicótico e controles avaliados.	44
Tabela 2. Genes analisados na placa customizada CAPH10883 e os resultados do teste t-student (comparando PEP vs. controle), bem como valores de <i>Fold change</i> (grupo controle como referência).	46
Tabela 3. Genes analisados na placa customizada CAPH10883 e os resultados do teste <i>t</i> pareado (comparando o paciente antes vs. após o tratamento), bem como valores de <i>Fold change</i> (grupo PEP antes do tratamento como referência).	46
Tabela 4. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de ΔCt e variáveis clínicas antes do tratamento.	47
Tabela 5. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de ΔCt e variáveis clínicas após o tratamento.	48
Tabela 6 Genes analisados na placa TLDA e os resultados do teste t-student (comparando PEP vs. controle), bem como valores de <i>Fold change</i> (grupo controle como referência).	51
Tabela 7. Genes analisados na placa TLDA e os resultados do teste <i>t</i> pareado (comparando o paciente antes vs. após o tratamento), bem como valores de <i>Fold change</i> (grupo PEP antes do tratamento como referência).	52
Tabela 8. Genes analisados na placa TLDA e os resultados do GLM de medidas repetidas (para três tempos).	53
Tabela 9. Correlação de Pearson entre os ΔCrt dos genes <i>MBP</i> e <i>NDEL1</i> (para três tempos).	54
Tabela 10. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de ΔCt e variáveis clínicas antes do tratamento.	54
Tabela 11. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de ΔCt e variáveis clínicas após o tratamento.	55
Tabela 12. Média de metilação de cada sítio CpG analisado para o gene <i>GCH1</i> para cada grupo. Os valores de p foram calculados pelo teste Mann-Whitney U.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas gerais

Δ Ct	<i>Delta cycle threshold</i>
Δ Crt	<i>Delta relative threshold</i>
5-HT	serotonina
5mC	5'-metilcitosina
A	Adenina
AMPc	AMP cíclico
ANOVA	análise de variância
BA9	<i>Brodman area 9</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BH4	tetrahidrobiopterina
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CDSS	<i>Calgary Depression Scale fo Schizophrenia</i>
CGI	<i>Clinical global impression</i>
CNV	Variação no número de cópias
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
Ct	<i>threshold cycle</i>
D2	receptor de dopamina-2
DA	dopamina
DALY	<i>Disability-Adjusted Life Year</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DP	Desvio Padrão
DRD	Distonia Responsiva à Levodopa
DSM-IV	<i>Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
et al	e colaboradores
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
G	Guanina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAF	<i>Global assessment of functioning</i>
GLM	<i>General Linear Model</i>
Glu	glutamato
GWAS	<i>genome-wide association study</i>
HGDC	<i>Human Genomic DNA Control</i>
IP	iodeto de propídeo
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Luria-Bertani
MBD	domínio de ligação a metil-CpG
MG	Média Geométrica

miRNA	microRNA
N	Número amostral
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
PANSS	<i>Positive and negative syndrome scale</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEP	Primeiro episódio psicótico
PPC	<i>Positive PCR Control</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAseq	Sequenciamento de RNA
RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SAM	S-adenosil-metionina
SCID-I	<i>Structured Clinical Interview for DSM-IV</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SOC	Super Optimal Broth
T	Timina
TEA	transtornos do espectro autista
TLDA	TaqMan Low Density Array
TRC	The RNAi Consortium
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

Nomes de genes e proteínas

<i>ABAT</i>	<i>4-aminobutyrate aminotransferase</i>
<i>ACTB</i>	<i>Actin, beta</i>
<i>ADAMTS2</i>	<i>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2</i>
<i>AKT</i>	proteína kinase B
<i>AKT1</i>	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
<i>ATF4</i>	<i>activating transcription factor 4</i>
<i>B2M</i>	<i>beta-2-microglobulin</i>
<i>BDNF</i>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<i>CALHM1</i>	<i>calcium homeostasis modulator 1</i>
<i>CHRNB1</i>	<i>cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)</i>
<i>CHRNE</i>	<i>cholinergic receptor, nicotinic, epsilon (muscle)</i>
<i>CNNM2</i>	<i>cyclin M2</i>
<i>CNP</i>	<i>2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase</i>
<i>CNR1</i>	<i>Cannabinoid receptor 1 (brain)</i>
<i>COMT</i>	<i>Catechol-O-methyltransferase</i>
<i>CREB</i>	cAMP response element-binding protein
<i>CSMD1</i>	<i>CUB and Sushi multiple domains 1</i>

<i>DGCR2</i>	<i>Digeorge syndrome critical region gene 2</i>
<i>DGCR8</i>	<i>Digeorge syndrome critical region gene 8</i>
<i>DICER1</i>	<i>Dicer 1, ribonuclease type III</i>
<i>DISC1</i>	<i>Disrupted in schizophrenia 1</i>
<i>DNMT</i>	enzima DNA metiltransferase
<i>DNMT1</i>	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1</i>
<i>DNMT3b</i>	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta</i>
<i>DNTM3a</i>	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha</i>
<i>DRD2</i>	<i>dopamine receptor D2</i>
<i>DROSHA</i>	<i>Drosha, ribonuclease type III</i>
<i>EEF1A2</i>	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2</i>
<i>EHF</i>	<i>ets homologous factor</i>
<i>EHMT1</i>	<i>euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1</i>
<i>FAM63B</i>	<i>family with sequence similarity 63, member B</i>
<i>GABRR2</i>	<i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 2</i>
<i>GAD</i>	enzima glutamato descarboxilase
<i>GAD1</i>	<i>Glutamate Decarboxylase 1 (Brain, 67kDa)</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>GCH1</i>	<i>GTP cyclohydrolase 1</i>
<i>GCHFR</i>	<i>GTP cyclohydrolase I feedback regulator</i>
<i>GFP</i>	<i>Green fluorescent protein</i>
<i>GRIK3</i>	<i>glutamate receptor, ionotropic, kainate 3</i>
<i>GSK</i>	<i>glicogênio sintase kinase</i>
<i>HPRT1</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
<i>IL2</i>	<i>Interleukin 2</i>
<i>IL6</i>	<i>Interleukin 6</i>
<i>IPO8</i>	<i>Importin 8</i>
<i>lacZ</i>	<i>beta-galactosidase</i>
<i>LIS1</i>	<i>Lissencephaly-1 Protein</i>
<i>LPL</i>	<i>lipoprotein lipase</i>
<i>Luc</i>	<i>Luciferase</i>
<i>MAOA</i>	<i>Monoamine oxidase A</i>
<i>MBD5</i>	<i>Methyl-CpG Binding Domain Protein 5</i>
<i>MBP</i>	<i>myelin basic protein</i>
<i>MeCP</i>	proteína ligante de metil
<i>MeCP2</i>	<i>methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)</i>
<i>Nde1</i>	<i>nudE neurodevelopment protein 1</i>
<i>NDEL1</i>	<i>nudE neurodevelopment protein 1-like 1</i>
<i>NLGN4</i>	<i>neuroligin 4, X-linked</i>
<i>NOS</i>	óxido nítrico sintase
<i>NRG1</i>	<i>neuregulin 1</i>
<i>NRXN1</i>	<i>neurexin 1</i>
<i>PAFAH1B1</i>	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 (45kda)</i>
<i>PAH</i>	fenilalanina hidroxilase

PKA	proteína kinase A
PLP1	<i>Proteolipid protein 1</i>
POLR2A	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa</i>
PRODH	<i>Proline Dehydrogenase (Oxidase) 1</i>
PTPS	<i>6-piruvil-tetrahidropterina sintase</i>
RELN	<i>reelin</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RFX2	<i>regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)</i>
RISC	<i>RNA- induce silencing complex</i>
RPL13A	<i>ribosomal protein L13a</i>
S100B	<i>S100 calcium binding protein B</i>
SELENBP1	<i>selenium binding protein 1</i>
SHANK1	<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1</i>
SLC6A3	<i>Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3</i>
SNCA	<i>synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)</i>
SOX10	<i>SRY (sex determining region Y)-box 10</i>
SR	<i>sepiapterina redutase</i>
SYN2	<i>synapsin II</i>
SYNGAP1	<i>synaptic Ras GTPase activating protein 1</i>
TACR2	<i>tachykinin receptor 2</i>
TACR3	<i>tachykinin receptor 3</i>
TCF4	<i>transcription factor 4</i>
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
TH	<i>tirosina hidroxilase</i>
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i>
TPH	<i>triptophano hidroxilase</i>
TSPO	<i>translocator protein (18kDa)</i>
TUBB2A	<i>tubulin, beta 2A class IIa</i>
UFD1L	<i>Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)</i>
VEGF	<i>VEGF nerve growth factor inducible</i>
VLCAD	<i>very long-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
ZDHHC8	<i>zinc finger, DHHC-type containing 8</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
kb	Kilobase
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Militro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
pb	Par de base
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto

RESUMO

A esquizofrenia é o transtorno mental mais grave e incapacitante dentre os distúrbios psiquiátricos. A demora em instituir tratamento adequado e a duração do primeiro episódio psicótico estão entre os principais fatores de mau prognóstico da doença. O presente projeto propôs a investigação de marcadores genéticos e epigenéticos para o diagnóstico e tratamento da esquizofrenia por meio do estudo da expressão de genes alvos e do estudo do padrão de metilação de DNA (estudo de expressão gênica I). Paralelamente, em células progenitoras de neurônios, estudamos o efeito do silenciamento do gene *MBD5* (*Methyl-CpG Binding Domain Protein 5*), importante para o neurodesenvolvimento e possivelmente relacionado à metilação de DNA (estudo funcional II). Para o estudo I, pacientes em primeiro episódio psicótico (PEP) virgens de tratamento e controles saudáveis foram submetidos à avaliação clínica e à coleta de sangue periférico. Os pacientes resubmeteram-se às mesmas avaliações após oito semanas do início do tratamento com risperidona, sendo que parte deles também foram reavaliados após um ano de inclusão na pesquisa. Em todas as etapas de seguimento do estudo, o sangue dos pacientes foi recoletado, seguido pela extração de DNA e RNA das amostras. O estudo de expressão gênica I foi realizado por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativo, e a análise metilação por meio de sequenciamento após conversão com bissulfato de sódio. Para o estudo funcional II, o silenciamento do gene *MBD5* foi realizado em células progenitoras de neurônios. Elas foram submetidas ao sequenciamento de RNA, PCR em tempo real, *Western blotting*, e à citometria de fluxo. No estudo I os resultados indicaram uma redução na expressão do gene *GCH1* (*GTP cyclohydrolase 1*) e um aumento na expressão dos genes *NDEL1* (*nudE neurodevelopment protein 1-like 1*) e *MBP* (*myelin basic protein*) no sangue de pacientes em PEP quando comparados aos controles. Quando comparamos os pacientes antes e após o tratamento, o gene *GABRR2* (*gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 2*) mostrou-se hipoexpresso após o tratamento com risperidona. Além disso, embora os dados sejam promissores, a expressão de *GCH1* não parece ser regulada por metilação de DNA. Quanto ao estudo funcional II, foi observado que o silenciamento do gene *MBD5* levava a um desbalanço entre proliferação e diferenciação das células progenitoras de neurônios. Os resultados desse estudo indicaram três genes possivelmente envolvidos na psicose propriamente dita, estando relacionados às vias dopaminérgicas e serotoninérgicas (*GCH1*), ao neurodesenvolvimento (*NDEL1*) e à mielinização (*MBP*). Além disso, o gene *GABRR2*, embora não pareça ser alvo direto da risperidona, pode estar associado à

resposta ao tratamento ou evolução da doença, indicando, assim, a importância da via GABAérgica. Estes dados poderão futuramente auxiliar a identificação de marcadores biológicos, tanto para a psicose quanto para o tratamento da esquizofrenia, possibilitando uma ação terapêutica precoce e acarretando na redução do tempo de psicose não tratada, o que pode resultar em diminuição da morbidade e melhor qualidade de vida para os pacientes. Também observamos que reduções na expressão de um gene envolvido em doenças do neurodesenvolvimento (*MBD5*) promovem um estado mais diferenciado que proliferativo de células progenitoras de neurônios, um fenômeno que parece estar presente nas alterações de outros genes envolvidos nessas doenças podendo, assim, ser um mecanismo convergente de doenças do neurodesenvolvimento, como o autismo, a deficiência intelectual e a esquizofrenia.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A presente tese faz parte da linha de pesquisa em genética psiquiátrica que a Prof.^a. Dr.^a. Sintia Iole Belangero vem desenvolvendo no Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC) da UNIFESP desde 2008. Essa linha de pesquisa vêm sendo ampliada e desenvolvida, e assim, essa tese foi financiada pela FAPESP por dois projetos principais:

- FAPESP 2010/08968-6. Investigação de marcadores genéticos e epigenéticos: uma abordagem translacional para o tratamento de esquizofrenia. Responsável: Prof.^a Dr.^a Sintia Iole Belangero. Finalizado. Publicação dos resultados: 1) Ota et al, 2013d (Anexo 2); 2) Ota et al, 2014b (Anexo 3); 3) Ota et al, 2014c (Anexo 4); 4) Santoro et al, 2014a (Apêndice 12); 5) Santoro et al, 2014b (Apêndice 13).
- FAPESP-MCT/CNPq-PRONEX 2011/50740-5. Prevenção na esquizofrenia e no transtorno bipolar da neurociência à comunidade: uma Plataforma Multifásica, Multimodal e Translacional para Investigação e Intervenção. Responsável: Prof. Dr. Rodrigo Affonseca Bressan, sendo a Prof.^a Dr.^a Sintia Iole Belangero Pesquisadora Associada. Em andamento. Publicação dos resultados: 1) Noto & Ota et al, (no prelo, Apêndice 15); 2) Noto & Ota et al, (no prelo, Apêndice 16).

Esses dois auxílios envolveram a investigação da expressão de genes específicos em sangue de pacientes em primeiro episódio psicótico (PEP) virgens de antipsicóticos e após 2 meses ou 1 ano de tratamento com risperidona, investigando, assim, a fase inicial da doença.

A esquizofrenia é caracterizada por delírios, alucinações, discurso e comportamentos desorganizados, e outros sintomas que causam disfunção social ou ocupacional. Os cinco primeiros anos da doença são particularmente críticos, uma vez que é durante esse período que as deteriorações sintomática e psicossocial progridem rapidamente (Birchwood et al, 1998).

Fatores genéticos e ambientais parecem gerar alterações no neurodesenvolvimento, contribuindo para a etiologia da esquizofrenia. Essa doença segue um modelo de herança multifatorial e apresenta uma herdabilidade de 83%, uma das mais altas dentre os transtornos psiquiátricos (Cannon et al, 1998).

Atualmente, a esquizofrenia é aceita como uma doença poligênica, envolvendo variantes comuns em múltiplos genes que individualmente não são capazes de desencadear a doença, mas que atuam como um conjunto e em combinação com fatores ambientais para aumentar o risco de desenvolvê-la (Gejman et al, 2011). Estudos mais recentes sugerem que além de milhares de variantes comuns (cada um com pequeno efeito), a arquitetura genética da esquizofrenia também inclui variantes raras, como algumas variações no número de cópias (CNVs), com um maior impacto sobre o risco de desenvolver a doença. O maior estudo de *genome-wide association* com esquizofrenia realizado até o momento identificou 108 *loci*, entretanto, a maior parte das variantes encontradas não parece afetar a estrutura proteica, mas pode exercer um papel importante na regulação da expressão gênica (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014).

Assim, o estudo da expressão gênica, que sofre influência de fatores genéticos e ambientais, pode auxiliar no melhor entendimento da doença e de seu tratamento. Utilizando tecidos periféricos, é ainda possível identificar marcadores biológicos que possam servir como ferramentas de diagnóstico e prognóstico para portadores de esquizofrenia, ao contrário do uso de tecido cerebral *postmortem*. O mesmo se aplica a estudos com metilação de DNA, uma modificação epigenética que pode regular a expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA.

Entretanto, uma vez que a maior parte dos estudos investigam pacientes com esquizofrenia crônica, a expressão gênica e a metilação de DNA podem ser influenciadas pelo uso de antipsicóticos ou mesmo pela evolução da doença. Dessa forma, a investigação de uma amostra de pacientes no início da doença, como no primeiro episódio psicótico (PEP), virgens de tratamento, é de grande importância.

Diversos genes implicados na esquizofrenia também foram associados a outras doenças do neurodesenvolvimento como transtornos do espectro autista (TEA) e deficiência intelectual, principalmente em estudos que investigam variantes raras, tais como algumas CNVs (Kavanagh et al, 2014). Isso indica como mudanças na dosagem gênica influenciam no neurodesenvolvimento (Malhotra, Sebat, 2012), e isso pode ser melhor explorado com o estudo de células progenitoras de neurônios. Um gene interessante a se investigar é o *MBD5* (*methyl CpG binding domain protein 5*), que parece exercer um papel importante na

metilação do DNA e cuja deleção vem sendo amplamente associado a doenças do neurodesenvolvimento, incluindo a deficiência intelectual e os TEA.

1.1 Objetivos

Este estudo tem como objetivo geral a busca por marcadores genéticos que auxiliem no entendimento tanto da etiologia do PEP, quanto na resposta ao tratamento com antipsicótico, a fim de proporcionar um melhor sistema de diagnóstico aliado a um tratamento mais eficiente da doença.

A presente tese foi dividida, em dois estudos: 1) estudo de expressão/metilação; e 2) estudo funcional, cujos objetivos específicos estão descritos abaixo.

Estudo I: Estudo de expressão gênica / metilação em primeiro episódio psicótico (PEP)

Objetivos:

1) Avaliar a expressão / metilação de genes envolvidos no neurodesenvolvimento, neurotransmissão, mielinização, neuroplasticidade, interleucinas e maquinaria de miRNA entre o sangue de pacientes em PEP virgens de tratamento e o de indivíduos controles, a fim de identificar marcadores relacionados à psicose;

2) Avaliar a expressão / metilação de genes envolvidos no neurodesenvolvimento, neurotransmissão, mielinização, neuroplasticidade, interleucinas e maquinaria de miRNA entre o sangue de pacientes em PEP virgens de tratamento e o após o tratamento com antipsicóticos, a fim de identificar marcadores relacionados ao tratamento;

3) Para os genes diferencialmente expressos nos dois objetivos acima descritos: a) correlacionar a expressão gênica com as variáveis clínicas de psicopatologia; b) verificar diferenças entre os grupos controle e após o tratamento; c) verificar se a expressão gênica está associada à resposta ao tratamento.

Estudo II: Análise funcional do gene *MBD5*: Caracterização da importância biológica de um gene no neurodesenvolvimento

Objetivos:

4) Modelar a haploinsuficiência de *MBD5*, um gene cuja deleção leva a doenças do neurodesenvolvimento, em células progenitoras de neurônios e identificar genes com expressão alterada, levando ao melhor entendimento e formulando novas hipóteses sobre a patogênese dessas doenças.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A esquizofrenia e o primeiro episódio psicótico (PEP)

A esquizofrenia é uma doença multifatorial que compreende um conjunto de sinais e sintomas de origem desconhecida. Dentre os sintomas que compõem a doença estão as alucinações e os delírios, que compõem o quadro de sintomas positivos, o embotamento afetivo, alogia e avolição, que representam os sintomas negativos, e sintomas cognitivos como déficit de atenção, de memória e de funções executivas (Ibrahim, Tamminga, 2010). Essa doença apresenta uma incidência média de casos novos ao ano em torno de 1,5 por 10.000 habitantes (McGrath et al, 2004; Menezes et al, 2007) e uma prevalência entre 0,3 a 1,6% na população (Kessler et al, 2005).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquizofrenia é a 3ª principal causa de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (*Disability-Adjusted Life Year – DALY*) na população jovem de 10-24 anos (Gore et al, 2011). Dentre os transtornos mentais, ela representa o principal custo direto com tratamento, com cerca de 1,3 a 2,5% do total de custos em saúde em países ocidentais (Rössler et al, 2005). Em 2002, os custos totais da doença nos Estados Unidos foram estimados em U\$62,7 bilhões (Wu et al, 2005). Em 1998, no estado de São Paulo, o custo direto total da esquizofrenia foi de R\$222 milhões, o que equivale a 2,2% do total de gastos em saúde do Estado (Leitao et al, 2006). Além disso, existe um grande custo indireto para a sociedade em termos do sofrimento aos parentes e perda de produtividade que a doença causa (Knapp et al, 2004).

Os cinco primeiros anos da doença são particularmente críticos, uma vez que é durante esse período que as deteriorações sintomática e psicossocial progridem rapidamente (Birchwood et al, 1998). As fases precoces da doença, incluindo o tempo de psicose não tratada, estão associadas à perda de contato com a família e amigos (Jeppesen et al, 2008), tentativas de suicídio (Nordentoft et al, 2004; Large et al, 2009; Nordentoft et al, 2011), comorbidade com uso de substâncias e criminalidade (Nielssen et al, 2012; Stevens et al, 2012). É nesse período crítico que as chances de mudanças no curso de longo prazo das doenças psicóticas são maiores do que nos estágios mais tardios. O reconhecimento da possibilidade de alterar a evolução da doença, proporcionou o desenvolvimento e estabelecimento de intervenções precoces especializadas para

pacientes em primeiro episódio psicótico (PEP), que se intensificaram internacionalmente nas últimas duas décadas (Nordentoft et al, 2014).

Para a esquizofrenia, existe uma grande heterogeneidade de resposta ao tratamento, com uma menor proporção (20-50%) de pacientes que remitem ou que tem uma melhora significativa, comparado com a maioria que apresenta múltiplos episódios e um declínio acentuado (Bleuler, 1978; Ciompi, 1980; Huber et al, 1980; Shepherd et al, 1989; Harding et al, 1992; van Os et al, 1996). Assim, os estudos em esquizofrenia são influenciados por problemas relacionados à representatividade da amostra (Menezes et al, 2006). A maior parte das amostras incluem pacientes em diferentes estágios da doença, com uma representação excessiva de pacientes crônicos e refratários ao tratamento (Shepherd et al, 1989; Keshavan, Schooler, 1992; Lieberman et al, 1996; Birchwood et al, 1998; Riecher-Rossler, Rossler, 1998) e uma restrição de pacientes que melhoraram ou remeteram, mas que receberam um diagnóstico inicial de esquizofrenia (Davidson, McGlashan, 1997). Assim, a heterogeneidade da amostra, com predominância de pacientes em estágio mais avançados da doença direcionam as pesquisas para uma pior evolução da esquizofrenia, além de atribuir as características e cursos dos pacientes de pior prognóstico para toda a população com a doença.

Dessa forma, a investigação dos pacientes no início da esquizofrenia, e particularmente durante o PEP pode auxiliar no entendimento da doença e de sua progressão, além de ser mais generalizável do que os estudos em pacientes crônicos.

Existe uma necessidade em se estabelecer serviços de detecção e intervenção precoce para a esquizofrenia principalmente em países em desenvolvimento, onde o tempo de psicose não tratada é longo (Chiliza et al, 2012). O tempo de psicose não tratada parece estar associada a um pior prognóstico em PEP (Schimmelmann et al, 2008), incluindo mais sintomas positivos, negativos (Melle et al, 2004; Oosthuizen et al, 2005; Wunderink et al, 2006) e cognitivos (Barnes et al, 2000; Rund et al, 2004) e níveis mais baixos de funcionamento social (Barnes et al, 2000; Tirupati et al, 2004) e de qualidade de vida (Harris et al, 2005). Comparando-se uma região com e uma sem detecção precoce, foram observados, além de uma redução de tempo de psicose não tratada, efeitos positivos da detecção precoce no prognóstico do paciente, incluindo no estado clínico após três meses e nos sintomas negativos após um ano de acompanhamento (Melle et al, 2004; Larsen et al, 2006).

O reconhecimento global da importância da intervenção nas fases iniciais da psicose é refletido no fato de que a identificação e o manejo precoces das doenças mentais são especificamente mencionados como uma área de prioridade no plano de ação da saúde mental 2013-2020 (World Health Organization, 2013; Nordentoft et al, 2014).

Em 1952, Delay e Deniker demonstraram que a clorpromazina era efetiva para o tratamento da esquizofrenia, descobrindo a primeira medicação efetiva no controle da doença (Rosenbloom, 2002). Atualmente, os antipsicóticos são agrupados em duas classes (típicos e atípicos ou de primeira e segunda geração, respectivamente), sendo que em ambas, a propriedade farmacológica-chave é o bloqueio de receptores de dopamina-2 (D2). Isto reduz a hiperatividade da via dopaminérgica mesolímbica, responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia (Stahl, 2010). Os antipsicóticos atípicos parecem induzir menos efeitos colaterais motores, embora tenham uma maior tendência em induzir ganho de peso, diabetes e colesterol alto (Allison et al, 1999; Geddes et al, 2000; Sernyak et al, 2002; Abidi, Bhaskara, 2003; Lindenmayer et al, 2003; Anand et al, 2010). Apesar de o mecanismo de ação via bloqueio de receptores D2 seja conhecido há mais de 60 anos, nenhuma droga antipsicótica de eficácia comprovada tem sido desenvolvida com base em outras moléculas alvo. Essa estase terapêutica é, em grande parte, consequência da falta de conhecimento sobre a fisiopatologia da esquizofrenia (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Dessa forma, o entendimento da patogênese da doença é um passo crítico para o melhor tratamento e prognóstico para os portadores de esquizofrenia.

2.1.1 Modelo do neurodesenvolvimento da esquizofrenia

O modelo do neurodesenvolvimento despontou há duas décadas como uma hipótese que poderia explicar a etiologia da esquizofrenia. Nele é proposto que a doença é resultado de um processo de neurodesenvolvimento alterado que antecede o acometimento de sintomas clínicos e é causado por uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Essas alterações podem predispor a ativação de circuitos neurais patológicos durante a adolescência ou início da vida adulta, levando à emergência de sintomas positivos, negativos ou ambos (Brown et al, 2004).

2.1.2 Via dopaminérgica

Grande parte dos estudos envolvendo a neurobiologia da síndrome psicótica tem focado em alterações nos sistemas de neurotransmissores. Dentre elas, a hipótese dopaminérgica, particularmente, é a mais estudada e se originou a partir de observações que correlacionaram a potência de drogas antipsicóticas com suas afinidades por receptores de dopamina D2 (Seeman, 1987) e relataram efeitos psicomiméticos de agonistas de dopamina, como a anfetamina (Breier et al, 1997). A sua versão atual postula que um risco genético interage com um risco ambiental durante o desenvolvimento, levando a um aumento dos níveis de dopamina estriatal pré-sináptica, causando delírios e alucinações (Howes , Kapur, 2009).

2.1.3 Via glutamatérgica

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso, com uma função crítica na plasticidade sináptica. Antagonistas de receptores glutamatérgicos, como a fenciclidina e a ketamina, podem causar sintomas psicóticos em indivíduos saudáveis e piorar os dos portadores de esquizofrenia, mostrando seu envolvimento na neurobiologia da doença (Bressan , Pilowsky, 2003). Em adição, estudos *post mortem* identificaram alterações na densidade de receptores glutamatérgicos, no córtex pré-frontal, tálamo e lobo temporal (Gao et al, 2000; Ibrahim et al, 2000; Meador-Woodruff , Healy, 2000).

2.1.4 Via GABAérgica

Diversos estudos de neurociência básica e clínica sugerem uma função do ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, na patogênese da esquizofrenia (Wassef et al, 2003). A enzima glutamato descarboxilase (GAD) é o fator limitante na síntese do GABA e estudos utilizando tecido cerebral *post mortem* de portadores de esquizofrenia demonstraram a diminuição da expressão da proteína GAD1 no córtex pré-frontal e cerebelo (Guidotti et al, 2000), sugerindo uma redução da neurotransmissão GABAérgica na doença.

2.2 Bases genômicas da esquizofrenia

Na população em geral, o risco de desenvolver esquizofrenia ao longo da vida é de 1% e esse risco tende a aumentar para familiares de portadores da doença: 4% para familiares de segundo grau e 9% para familiares de 1º grau (Plomin et al, 2008). Uma metanálise observou que a taxa de concordância para gêmeos monozigóticos varia de 41-65%, enquanto que para dizigóticos é de 0-28% (Cardno , Gottesman, 2000). A herdabilidade está estimada em 0,83, uma das mais altas entre doenças psiquiátricas (Cannon et al, 1998). Estudos de adoção também demonstraram que 7-10% das crianças adotadas, cujos pais biológicos eram portadores de esquizofrenia, apresentavam psicose, enquanto que 0-1% das crianças adotadas controles apresentaram problemas semelhantes (Wender et al, 1974; Tienari et al, 2004).

Apesar de existirem evidências quanto à participação de fatores genéticos na etiologia da esquizofrenia, aproximadamente 60% dos portadores de esquizofrenia não possuem um familiar com a doença (Gottesman , Erlenmeyer-Kimling, 2001).

Esses dados mostram uma correlação direta entre a carga genética e o risco, mas ao mesmo tempo, mostram que ela isoladamente não determina o desenvolvimento da doença, favorecendo um modelo aditivo de interação de fatores genéticos e ambientais. Dos eventos ambientais que foram associados à esquizofrenia, muitos ocorrem durante os períodos pré-natal ou perinatal, como a hipóxia, antes do acometimento dos sintomas psicóticos necessários para o diagnóstico. Assim, existe um período entre os eventos ambientais e o aparecimento da doença, fundamentando a hipótese de que a esquizofrenia seja uma doença de neurodesenvolvimento (Lewis , Levitt, 2002). Dentre outros fatores ambientais que têm sido associados à esquizofrenia destacam-se: uso de *cannabis* e o processo de urbanização (van Os et al, 2010).

Inicialmente, os estudos genéticos em esquizofrenia eram baseados na análise de ligação, que estudam a co-segregação de marcadores genéticos com a doença em famílias, de forma a identificar regiões cromossômicas contendo genes importantes para o transtorno. Embora esses estudos sejam eficientes para localizar genes responsáveis por doenças monogênicas, em que um único gene é responsável pela doença em pelo menos uma parte das famílias afetadas, no caso de doenças complexas, em que múltiplos genes interagem entre si e com fatores ambientais, os estudos de ligação não são os mais

adequados. Isso explica o porquê de, apesar de terem sido encontrados resultados positivos, muitos desses estudos não tenham sido replicados (Claes et al, 2012). No entanto, alguns dos achados desses estudos de ligação foram replicados mais do que poderiam ser explicados se fossem totalmente ao acaso, e dentre eles destaca-se a região cromossômica 22q11.2.

As microdeleções 22q11.2 representam cerca de 1-2% dos casos esporádicos de esquizofrenia (Karayiorgou et al, 1995; Christofolini et al, 2011). Em adição, foi observado que durante a adolescência ou início da vida adulta, aproximadamente um terço dos portadores da síndrome da deleção 22q11.2 desenvolvem esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo, representando um risco de 25-31 vezes mais do que da população geral (Pulver et al, 1994; Murphy et al, 1999). Reciprocamente, a frequência dessa microdeleção em portadores de esquizofrenia pode ser de 12-80 vezes maior que o da população em geral (Karayiorgou, Gogos, 2004).

O aumento no risco para esquizofrenia pode ser resultado da haploinsuficiência de um ou mais genes em 22q11.2. Deleções nessa região foram posteriormente confirmadas ao se investigar variações no número de cópias (CNVs) em esquizofrenia (International Schizophrenia Consortium, 2008; Stefansson et al, 2008; Ota et al, 2013c). Além disso, alguns candidatos funcionais dentro da região deletada têm sido propostos, incluindo os genes *COMT* (Matsuzaka et al., em redação), *PRODH* (Ota et al, 2014a), *UFD1L* (Ota et al, 2010; Ota et al, 2013a) e *ZDHHC8* (Ota et al, 2013b).

Uma outra região cromossômica importante para a esquizofrenia identificada em estudos de famílias foi a região 1q42. No caso, um estudo de uma translocação balanceada (1;11)(q42;q14.3) que co-segregava com a presença de doença psiquiátrica em uma grande família escocesa permitiu a identificação da região (St Clair et al, 1990). Esta translocação gerou uma ruptura no gene *DISC1*, sugerindo uma participação deste gene na etiologia da doença. Uma das hipóteses sobre a relação causal da proteína e a esquizofrenia envolve a interação da *DISC1* com a *NDEL1* que por sua vez interage com a *LIS1* (codificada pelo gene *PAFAH1B1*) e a dineína para regular funções celulares fundamentais tais como transporte axonal, crescimento de neuritos e migração neuronal no desenvolvimento cerebral (Hayashi et al, 2005; Kamiya et al, 2005; Kamiya et al, 2006).

Para doenças complexas como a esquizofrenia, o tipo de análise mais utilizado e adequado é o de associação, contrapondo aos estudos de ligação (Ott et al, 2011). Entretanto, os estudos de associação iniciais investigavam poucos genes, que geralmente apresentavam uma função biológica relevante para a esquizofrenia ou estavam localizados em regiões indicadas pelos estudos de ligação. Contudo, como ainda se conhece pouco sobre a patogênese da doença, uma análise mais exploratória e não apenas confirmatória, poderia ser mais produtiva. Assim, o avanço da tecnologia e a possibilidade de se investigar o genoma completo, sem uma hipótese *a priori*, geraram os *genome-wide association studies* (GWAS), que auxiliaram na identificação de outros genes relevantes para a doença, na formulação de novas hipóteses e também na explicação da alta herdabilidade da doença.

Até recentemente existia uma dicotomia nos estudos genéticos em doenças psiquiátricas. Os estudos de ligação iniciais auxiliaram na identificação das variantes raras, como a deleção 22q11.2, e os estudos posteriores investigando CNVs ou exomas deram continuidade a esses estudos. Paralelamente, outros estudos defendiam a hipótese doença comum – variante comum, focando principalmente nos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e isso foi a base e a força dos estudos GWAS. Entretanto, recentemente foi proposto que o componente genético da esquizofrenia é derivado tanto de variantes de risco raras (e de grande efeito) quanto comuns (de pequeno efeito) e é a combinação dessas frequências alélicas, tamanho de efeito e características funcionais que auxiliarão na detecção de *loci* associados à doença (Visscher et al, 2012).

Além de serem importantes para identificar fatores associados à esquizofrenia, e assim, auxiliar no entendimento da patogênese da esquizofrenia, os GWAS também são importantes para os estudos de farmacogenética. Frank et al (2014), por exemplo, baseado nos *loci* de risco previamente identificados pelo maior GWAS até então (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011), geraram um escore de risco poligênico e investigaram se um maior risco genético, mensurado por esse escore, estaria associado com a resposta ao tratamento (Frank et al, 2014). Interessantemente, foi observado que o subgrupo resistente ao tratamento e que faziam uso de clozapina apresentava um escore maior do que o que não fazia uso de clozapina e, consistente com esse achado, dentro do subgrupo dos que faziam uso desse antipsicótico,

os que não respondiam também apresentavam um escore maior do que os que respondiam à clozapina.

O maior estudo GWAS realizado até o momento investigou 36.989 portadores de esquizofrenia e 113.075 controles e identificou 108 *loci* associados à doença, indicando uma contribuição poligênica verdadeira na esquizofrenia (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Com esse estudo, além de gerar novas hipóteses sobre a etiologia da doença, pôde-se confirmar as hipóteses fisiopatológicas principais da esquizofrenia, pois foram encontradas associações significantes com genes de receptores de dopamina, de glutamato, de sinalização de cálcio, da função e plasticidade sináptica, além de genes do neurodesenvolvimento e do sistema imune. Muitos dos achados também sobrepunham aos achados com variantes raras, como algumas CNVs, em genes relacionados com a função glutamatérgica sináptica e de canais de cálcio, confirmando que estudos em variantes comuns e raras são complementares e não antagônicas.

Dos 108 *loci* identificados, 75% incluíam genes codificadores de proteínas, entretanto, em apenas 10 casos a associação foi devida a um polimorfismo não-sinônimo exônico conhecido (ou seja, que muda a sequência de aminoácidos na proteína), sugerindo que muitos dos achados em GWAS podem exercer seus efeitos alterando a expressão gênica ao invés da estrutura proteica (Nicolae et al, 2010; Maurano et al, 2012; Richards et al, 2012; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Interessantemente, grande parte dos achados foram em genes expressos no cérebro, o que é biologicamente condizente com a doença.

2.2.1 Estudos de expressão gênica em esquizofrenia

Considerando que o DNA é transcrito para RNA, que por sua vez pode ou não ser traduzido em proteína, podemos considerar que a expressão gênica é um fenótipo intermediário entre a sequência gênica e a doença. Assim, estudos que avaliam a quantidade de RNA e/ou proteínas são essenciais para o entendimento do papel de variantes genéticas na suscetibilidade à esquizofrenia (de Jong et al, 2012), além de refletirem as múltiplas interações genéticas e ambientais. Adicionalmente, como relatado anteriormente, a maior parte das variantes genéticas que conferem risco à doença não

ocorrem em regiões codificantes, não alterando a estrutura proteica, mas podendo influenciar na sua expressão.

Uma hipoxpressão da enzima que sintetiza GABA, a glutamato descarboxilase (codificada pelo gene *GAD1*) é uma das alterações moleculares mais consistentemente observadas em tecido cerebral de portadores de esquizofrenia. Pelo menos 20 estudos na literatura conduzidos por grupos diferentes que utilizaram tecidos *post-mortem* relataram uma baixa expressão do seu RNA mensageiro (RNAm) ou proteína em múltiplas regiões cerebrais de portadores desta doença, favorecendo a hipótese de uma disfunção GABAérgica (Mitchell et al, 2014). Outros achados interessantes incluem os genes *BDNF* e *RELN* (Guidotti et al, 2014).

Estudos utilizando *microarrays* em tecidos cerebrais *post-mortem* já relataram diferenças de expressão em genes pertencentes a vias de mielinização, vias GABAérgicas, vias glutamatérgicas, vias de sinapse, mitocôndrias, resposta imune e estresse (Sequeira et al, 2012). Um estudo recente de sequenciamento de RNA em larga escala (RNaseq) em amostras *post-mortem* de hipocampo identificou 144 genes diferencialmente expressos entre amostras de pacientes com esquizofrenia e controles, sendo que as vias de inflamação e resposta imune foram as mais representadas (Hwang et al, 2013), confirmando estudos anteriores em outras regiões cerebrais (Arion et al, 2007; Saetre et al, 2007; Schmitt et al, 2011; Fillman et al, 2013).

Entretanto, a esquizofrenia é uma doença de curso e tratamento longos e, considerando que os controles saudáveis geralmente não recebem nenhum tipo de antipsicótico, a questão seria se as alterações na expressão gênica encontradas em tecidos cerebrais *post-mortem* desses pacientes é consequência do uso prolongado de antipsicóticos ou faz parte da etiopatogenia da doença por si.

Além disso, diversos fatores de confusão, tais como a idade, pH, gênero e qualidade do RNAm, podem ter um efeito significativo na expressão gênica em tecido cerebral *post-mortem*, podendo enviesar esses estudos (Sequeira et al, 2012). Adicionalmente, existe uma redundância nas amostras de tecido cerebral *post-mortem*, com poucos bancos de cérebro sendo utilizados e um tamanho amostral pequeno, o que leva a um baixo poder estatístico nesse tipo de estudo. Todos esses fatores inerentes ao tipo de amostra coletada levaram à busca de perfis de expressão em tecidos periféricos, como o sangue (Kuzman et

al, 2009; Kurian et al, 2011) e biópsias de pele (Gasso et al, 2014). Além disso, esse tipo de abordagem permite fazer um estudo de seguimento longitudinal, que não seria possível com tecidos *post-mortem*, possibilitando observar o efeito da progressão e estado da doença e da medicação (Kuzman et al, 2009; Kumarasinghe et al, 2013).

Embora a expressão gênica em sangue seja moderadamente correlacionada com a expressão gênica em tecido cerebral (Sullivan et al, 2006; Jasinska et al, 2009; Cai et al, 2010a; Rollins et al, 2010), diversos estudos têm sugerido que a primeira pode ser útil para auxiliar no diagnóstico de doenças mentais (Middleton et al, 2005; Tsuang et al, 2005; Takahashi et al, 2010; de Jong et al, 2012; Frau et al, 2012; Maschietto et al, 2012) ou na classificação de subtipos (Bowden et al, 2006) ou na sintomatologia, como alucinações e delírios (Bousman et al, 2010; Kurian et al, 2011).

Cinco estudos que avaliaram o perfil de expressão gênica em sangue periférico de paciente com esquizofrenia por meio de *microarrays*, fazendo uma análise livre de hipóteses, identificaram alterações na expressão de genes que estão envolvidos em função imune, inflamação (de Jong et al, 2012; Gardiner et al, 2013; Kumarasinghe et al, 2013), doenças infecciosas (de Jong et al, 2012; Kumarasinghe et al, 2013), função hematológica, doenças neurológicas (de Jong et al, 2012), transcrição / processamento de RNA, ubiquitina, metabolismo de lipídio / glicose / proteína, transdução de sinal, citoesqueleto (Kuzman et al, 2009), adesão celular, desenvolvimento do sistema nervoso, transporte iônico (Takahashi et al, 2010), entre outras funções. Um estudo utilizando RNAseq também confirmou as alterações em genes relacionados ao sistema imune (Xu et al, 2012).

Contudo, o tratamento com antipsicóticos ainda é um fator que deve ser considerado, uma vez que o uso de medicação por longos períodos pode influenciar nos resultados obtidos, por exemplo, em estudo de pacientes com esquizofrenia crônica. Mamdani et al. (2013) observaram que 210 transcritos apresentaram diferença de expressão quando comparava pacientes que receberam risperidona ou olanzapina, pela técnica de *microarray*. Além do tratamento, a própria cronicidade e evolução da doença podem interferir nos resultados, uma vez que a expressão de alguns genes pode diferir entre os estágios iniciais e tardios da doença. Apenas alguns estudos investigaram a expressão gênica em sangue total de pacientes virgens ou livres de tratamento e em PEP (Numata et al, 2008; Suzuki et al, 2008; Zhang et al, 2008; Kuzman et al, 2009; Gutierrez-Fernandez et al, 2010; Takahashi

et al, 2010; de Jong et al, 2012; Kordi-Tamandani et al, 2012; Melas et al, 2012; Kordi-Tamandani et al, 2013a; Kordi-Tamandani et al, 2013b; Kumarasinghe et al, 2013; Mamdani et al, 2013; Nishioka et al, 2013; Sainz et al, 2013; Crespo-Facorro et al, 2014).

O estudo de expressão gênica em tecido periférico de pacientes em PEP também permite identificar marcadores de traço e de estado. Os marcadores de traço referem-se aos processos biológicos ou comportamentais que exercem um papel, possivelmente causal, na predisposição de uma doença psiquiátrica, enquanto que os marcadores de estado referem-se mais às manifestações clínicas dos pacientes. Tipicamente, embora não necessariamente, um marcador de traço é duradouro, enquanto que o de estado é transiente (Chen et al, 2006). Assim, quando vemos uma expressão gênica diferencial entre PEP x controle que é mantida após o tratamento (após a remissão), poderíamos considerá-la como um marcador de traço, que estaria mais implicada na etiologia e independeria do estado do paciente.

Dentre os estudos de expressão gênica em sangue de pacientes em PEP virgens de tratamento podemos destacar dois estudos do mesmo grupo que utilizaram sequenciamento de nova geração, uma tecnologia mais atual, sensível e mais específica que os *microarrays* (Sainz et al, 2013; Crespo-Facorro et al, 2014). Sainz et al. (2013), comparando 36 portadores de esquizofrenia virgens de tratamento e 40 controles, encontraram 200 genes diferencialmente expressos enriquecidos em sete processos biológicos do *Gene Ontology* relacionados a processamento e maturação de proteínas, resposta imune inata, resposta inflamatória aguda, e resposta a ferimento. Dentre eles, o gene mais significativamente associado foi o *ADAMTS2*, destacando-se também outros como: *CSMD1*, *EHF*, *RFX2*, *GRIK3*, *LPL*, *S100B*, *SNCA*, *SYN2*, *TUBB2A* e *SELENBP1*, que já foram relacionados à esquizofrenia ou aos seus subfenótipos. O sequenciamento do transcriptoma de amostras de sangue de 22 pacientes com esquizofrenia, antes e após o tratamento com antipsicóticos atípicos, identificou 17 genes que tiveram sua expressão alterada após o tratamento com antipsicóticos. Seis deles já haviam sido encontrados no estudo de Sainz et al. (2013) comparando pacientes virgens de tratamento e controles. Todos eles mostraram-se inicialmente superexpressos, porém os seus níveis retornaram ao normal após o tratamento (Crespo-Facorro et al, 2014). Interessantemente, existia um

enriquecimento de genes relacionados à obesidade e diabetes, efeitos colaterais típicos dos antipsicóticos.

Semelhante aos dois estudos supramencionados, a presente tese gerou dois trabalhos (Ota et al, 2014b; Ota et al, 2014c) (Anexos 3 e 4) que compararam a expressão de 10 genes envolvidos na neurotransmissão ou neurodesenvolvimento entre 51 pacientes em PEP virgens de tratamento e 51 controles (Ota et al, 2014c) e entre 44 pacientes em PEP antes e após 2 meses de tratamento com o antipsicótico atípico risperidona (Ota et al, 2014b). No primeiro trabalho, encontramos uma redução da expressão do gene *GCH1* nos pacientes em comparação aos controles. que foi mantida após o tratamento. Já no segundo, identificamos por meio de uma análise pareada, uma redução da expressão do gene *GABRR2* após o tratamento com o antipsicótico, indicando que risperidona pode interferir na expressão gênica.

2.2.2 Controle epigenético da expressão gênica

2.2.2.1 Controle por metilação de DNA

Estudos epidemiológicos têm fornecido evidências de que fatores ambientais pré e pós-natais podem influenciar no risco de desenvolvimento de diversas doenças crônicas e comportamentais, tais como câncer, doença cardiovascular e esquizofrenia. Alterações em marcas epigenéticas poderiam ser um dos mecanismos pelos quais fatores ambientais externos estariam associados a essas doenças. Por exemplo, foi observado em ratos que a exposição pré-natal à malnutrição leva a uma reprogramação da expressão gênica, relacionada a modificações epigenéticas no cérebro, no período pós-natal. Esse processo pode prejudicar o aprendizado, resultando em uma maior suscetibilidade à esquizofrenia (Xu et al, 2014). Atualmente, está claro que para um melhor entendimento das interações do ambiente com o genoma é necessário que os mecanismos epigenéticos sejam desvendados (Jirtle , Skinner, 2007).

O termo *epigenética* refere-se a modificações químicas e físicas do DNA e da cromatina que regulam a atividade funcional do genoma, como a expressão gênica, sem mudar a sequência de nucleotídeos (Turecki et al, 2014). Essas alterações são responsáveis pelo controle transcricional, por meio de repressão de genes desnecessários

em algumas células. Diversas evidências demonstraram que eventos epigenéticos estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, no fenômeno de compensação de dose, na regulação da expressão gênica e na estabilidade genômica (Park , Kuroda, 2001; Li, 2002; Margueron , Reinberg, 2010).

As modificações epigenéticas envolvem diversas alterações tanto no DNA quanto na cromatina sendo que a mais bem estudada em humanos é a metilação do DNA. Nessa modificação, catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), ocorre a adição covalente de um grupo metil ao carbono 5' do anel pirimídico da citosina, resultando em 5'-metilcitosina (5mC). Essas citosinas estão localizadas a 5' de uma base guanina em um dinucleotídeo CpG na região promotora de diversos genes e contêm múltiplos sítios de ligação para fatores de transcrição (Chuang , Jones, 2007). Dessa forma, com a metilação desses sítios CpG, ocorre a inibição da ligação de fatores de transcrição e também a atração de proteínas ligantes de metil (MeCPs), que iniciam a compactação da cromatina e o silenciamento gênico (Klose , Bird, 2006). Em genomas de vertebrados, mais da metade dos genes contem regiões curtas (aproximadamente 1 kb) ricas em CpG denominadas ilhas CpG, e o resto do genoma é depletado em CpG. Em humanos, cerca de 60% dos genes contém uma região rica em CpG em seus promotores e, em geral, quando essa região é metilada, a expressão do gene correspondente é impedida.

Um conjunto de dados consistentes tem associado a metilação de DNA à esquizofrenia (Sharma, 2005). As primeiras evidências de que processos epigenéticos poderiam estar envolvidos com a psicose surgiram na década de 1970, em que foi observado que a metionina, precursora da SAM (S-adenosil-metionina, o doador de metil utilizado pelas DNMTs para metilar a citosina do DNA), quando administrada em altas doses por 3-4 semanas podia exacerbar os sintomas psicóticos dos pacientes com esquizofrenia (Wyatt et al, 1971; Guidotti , Grayson, 2014). Um fator a ser considerado é que tanto a metilação global quanto a que ocorre em locais específicos do genoma, podem ser reguladas pela biodisponibilidade do doador de metil SAM (Tremolizzo et al, 2005), cuja biossíntese está alterada em cérebro de portadores de esquizofrenia (Guidotti et al, 2007).

A maior parte dos estudos focou na quantificação da metilação em promotores de genes candidatos, sendo que os primeiros trabalhos em tecidos cerebrais *post-mortem* focaram nos genes *RELN*, *COMT* e *SOX10* (Abdolmaleky et al, 2005; Grayson et al, 2005; Iwamoto et al,

2005). O primeiro estudo em larga escala do epigenoma, utilizando tecido *post-mortem* obtido do córtex frontal, avaliou por *microarray* a metilação de aproximadamente 12.000 sítios CpG do genoma e encontrou diferenças significantes em diversos genes relacionados à psicose, incluindo genes envolvidos no desenvolvimento neuronal e nas vias glutamatérgicas e GABAérgicas (Mill et al, 2008).

Semelhantemente aos estudos de expressão gênica, não é possível estudar a história da doença apenas nos tecidos cerebrais *post-mortem*. Como as manifestações clínicas da esquizofrenia começam nos estágios prodrômicos, seguidos do PEP na adolescência e subsequente deterioração, existe uma real necessidade de utilização de tecidos periféricos (Guidotti et al, 2014). Além disso, diversos estudos em metiloma de humanos e animais indicaram uma homologia entre cérebro e sangue (Davies et al, 2012; Provencal et al, 2012; Kundakovic et al, 2014).

Alguns estudos revelaram uma tendência à hipometilação global em células de sangue periférico de portadores de esquizofrenia (Shimabukuro et al, 2007; Melas et al, 2012; Nishioka et al, 2013), embora outros trabalhos não tenham identificado diferenças (Bromberg et al, 2008; Dempster et al, 2011). Também foram observadas diferenças na metilação de regiões promotoras do receptor dopaminérgico D2 em sangue periférico de gêmeos monozigóticos discordantes para a esquizofrenia (Petronis et al, 2003). Interessantemente alguns desses achados foram concordantes entre diferentes tecidos (cérebro *post-mortem* e sangue), como para os genes *RELN* (Aberg et al, 2014) e *BDNF* (Auta et al, 2013; Ikegame et al, 2013). Paralelamente, também foi observado um aumento na expressão dos genes das enzimas DNA metiltransferases (*DNMT1*, *DNTM3a* e *DNMT3b*) em tecido cerebral e periférico (Veldic et al, 2004; Veldic et al, 2005; Zhubi et al, 2009).

Investigando a metilação de DNA em sangue periférico, Liu et al. (2013) identificaram 16 sítios CpGs hiper- ou hipometilados, sendo que a via biológica mais desregulada envolvia genes de resposta inflamatória (Liu et al, 2013a). Mais recentemente e utilizando sequenciamento de nova geração, Aberg et al. (2014) identificaram 25 sítios associados com a esquizofrenia ao comparar amostras de 759 pacientes e 738 controles. Desses, o mais significativamente associado localizava-se no gene *FAM63B*, e interessantemente, um sítio localizava-se no gene *RELN* (Aberg et al, 2014). Quanto ao tratamento, foi observado que medicamentos utilizados para doenças psiquiátricas, como o ácido valpróico, podem ser

capazes de promover uma hiperacetilação de histonas, outra modificação epigenética capaz de regular a expressão gênica (Phiel et al, 2001). Além disso, Melas et al. (2012) observaram uma hipometilação global em leucócitos de pacientes com esquizofrenia que era parcialmente recuperada pelo tratamento com haloperidol (Melas et al, 2012).

Um estudo combinou dados de genotipagem, expressão e metilação, encontrando 11320 CpGs diferencialmente metilados entre pacientes com esquizofrenia e controles. Desses, 1095 CpGs estavam associados com 1226 transcritos em *cis*. Comparando-se esses transcritos entre casos e controles, 391 (31,89%) estavam diferencialmente expressos. Por fim, esses dados também foram comparados com dados de genotipagem provenientes de GWAS, e o resultado mais significativo identificou que o SNP rs11191514, localizado no gene *CNNM2*, estava associado com a esquizofrenia e com uma metilação diferencial em um sítio próximo do gene *CALHM1* entre casos e controles que estava correlacionado com a expressão do gene, o qual também estava diferente entre pacientes e controles (van Eijk et al, 2014). Esse estudo sugeriu que a combinação de diferentes dados (genoma, transcriptoma e metiloma) pode aumentar o poder da associação, o que não seria possível ao analisar individualmente cada dado com uma amostra pequena (260 pacientes, 250 controles para genotipagem e metiloma; e 120 pacientes e 120 controles para transcriptoma).

Contudo, muitos dos achados ainda são inconsistentes e atualmente sugere-se que existe um equilíbrio entre metilação e desmetilação de DNA. Essa teoria é ainda mais apoiada pelos achados independentes e recentes mostrando que as marcas 5mC nas regiões promotoras de genes específicos podem ser oxidadas pelas enzimas TET (*Ten-eleven translocation*) para formar as 5-hidroximetilcitosinas no cérebro de mamíferos, que, por sua vez, podem ser consideradas como intermediárias da desmetilação do DNA, estando positivamente correlacionadas com a expressão gênica (Nestor et al, 2012).

2.2.2.2 Controle por microRNAs

Outro mecanismo epigenético de destaque inclui os microRNAs (miRNAs), que são RNAs pequenos (18 a 26 nucleotídeos) capazes de afetar a estabilidade e a tradução do RNAm. Eles são fatores específicos para um complexo de proteínas denominado RISC (*RNA-induce silencing complex*), que por sua vez é capaz de se ligar a RNAm alvos por meio de um pareamento de bases, levando à degradação ou inibição da tradução do RNA alvo (Beveridge, Cairns, 2012). Os miRNAs são gerados por uma série de clivagens do transcrito de um RNA

precursor longo (Bushati , Cohen, 2007). Inicialmente, o pri-miRNA é transcrito pela RNA polimerase II e, em seguida, processado pela DROSHA dentro de um complexo que também inclui o DGCR8, produzindo o pre-miRNA. Esse é exportado para o citoplasma e clivado em miRNA maduro pela DICER1 como parte do complexo RISC.

Considerando que cada miRNA potencialmente interfere na expressão de centenas de genes alvos, e que eles são amplamente expressos no cérebro (Cao et al, 2006), as implicações clínicas de um distúrbio nesse sistema, particularmente durante o neurodesenvolvimento, são significativas e indicam uma provável participação dos miRNAs em doenças mentais (Beveridge , Cairns, 2012). Além disso, é importante salientar que um dos fatores genéticos mais fortemente associados à esquizofrenia é a deleção da região cromossômica 22q11.2, onde se localiza o gene *DGCR8*, que participa na biogênese dos miRNAs (Beveridge , Cairns, 2012). Interessantemente, um estudo recente de transcriptoma de linhagens linfoblastóides de 413 casos e 446 controles identificou 95 transcritos diferencialmente expressos, sendo que dentre os genes estavam os que participam do processamento de miRNA, como a *DICER1* (Sanders et al, 2013).

Além disso, genótipos dos genes *DICER1* e *DGCR8* já foram associados com a esquizofrenia (Zhou et al, 2013), e polimorfismos localizados no gene que codifica o miR-137 foram fortemente associados à doença nos três maiores GWASs realizados (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study GWAS Consortium, 2011; Ripke et al, 2013; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014).

Embora essas evidências apontem para a presença de processos epigenéticos na esquizofrenia, a exata participação desses eventos e os efeitos de fármacos utilizados no tratamento sobre esses processos não estão bem estabelecidos. Além disso, estudos futuros ainda são necessários para identificar se as mudanças na metilação observadas refletem a causa ou a consequência da doença. O estudo desses mecanismos pode contribuir tanto para o entendimento de sua patogênese, quanto para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Em tratamento clínico, os biomarcadores são importantes para monitorar a progressão da doença ao longo do tempo e no tratamento individualizado. Dado que existe uma associação entre maior tempo de psicose não tratada e maior psicopatologia e pior

desempenho funcional (Perkins et al, 2005; Guo et al, 2013), a identificação de biomarcadores para esquizofrenia em sangue periférico podem ser relevantes nas decisões clínicas relacionadas ao tratamento profilático, levando a prevenção do acometimento do PEP ou de sua recaída. A deterioração a longo prazo tipicamente observada no curso da esquizofrenia poderia, então, ser evitada com a intervenção precisa (Guidotti et al, 2014).

**ESTUDO I: Estudo de expressão gênica / metilação em primeiro episódio psicótico
(PEP)**

3 ESTUDO I: ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA / METILAÇÃO EM PRIMEIRO EPISÓDIO PSICÓTICO (PEP)

Artigo publicado na revista *Psychiatry Research* (Anexo 2); Ota *et al.* 2013d

Artigo publicado na revista *Journal of Psychiatric Research* (Anexo 3); Ota *et al.* 2014b

Artigo publicado na revista *Schizophrenia Research* (Anexo 4); Ota *et al.* 2014c

3.1 Métodos

Para este estudo foram avaliados 73 pacientes em PEP (64 deles tiveram seguimento após dois meses de tratamento com risperidona e 9 destes após um ano) e 73 controles. Inicialmente optamos por realizar o seguimento por dois meses, pois é um tempo adequado para avaliar a resposta ao antipsicótico. Devido à aprovação de um auxílio temático à pesquisa (FAPESP 2011/50740-5), decidimos seguir os pacientes por um tempo mais longo (1 ano) de forma a avaliar o efeito a longo prazo dos antipsicóticos. Entretanto, devido a dificuldades na reconvocação, e ao grande abandono ao tratamento, apenas nove pacientes foram reavaliados após um ano de tratamento. Todos eles também apresentavam a reavaliação após dois meses de tratamento.

3.1.1 Avaliação clínica dos pacientes em primeiro episódio psicótico

Os pacientes foram provenientes, principalmente, dos ambulatórios de PEP criados nos Centros de Atenção Integral à Saúde Mental (CAISMs) da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP), com um ambulatório na unidade de Franco da Rocha e outro na Vila Mariana. Adicionalmente, pacientes foram captados por meio do Hospital Central da ISCMSP, do Hospital São Paulo e de outros ambulatórios e clínicas particulares.

A avaliação clínica consistiu em três etapas: 1) rastreamento; 2) inclusão na pesquisa; 3) seguimento. Dessa forma, uma vez identificados, os pacientes em PEP foram submetidos a duas avaliações: uma avaliação basal, no início do estudo, e outra após dois meses do início do tratamento. Esse período foi definido de acordo com o tempo necessário para introdução e avaliação de resposta à medicação. Nesses dois momentos, foram aplicados instrumentos

padronizados para a avaliação clínica (descrição detalhada a seguir) e uma amostra de sangue periférico foi coletada.

Todos os indivíduos ou seus responsáveis legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP (0603/10).

3.1.1.1 Avaliação psiquiátrica: Rastreamento

Na etapa de rastreamento foi aplicado um *checklist* para verificar se o paciente poderia ser incluído na pesquisa. Para a inclusão no estudo, o indivíduo tinha que apresentar sintomas psicóticos, idade entre 15 e 35 anos e ausência de uso prévio de antipsicóticos. Aqueles que apresentavam causa orgânica, quadro de intoxicação aguda por uso de drogas ou não possuíam contato para posterior seguimento, não foram incluídos na pesquisa. Nesse momento, o indivíduo foi convidado a participar da pesquisa e a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Nessa etapa o sangue foi coletado e, em seguida, o medicamento foi administrado de forma a estabilizar o paciente. Optamos por padronizar pelo tratamento com risperidona (1–6 mg), um antipsicótico atípico, devido a sua eficácia comprovada e perfil de efeitos colaterais bem tolerado. Além disso, a risperidona é o antipsicótico de preferência no tratamento de PEP e apresenta menores taxas de sintomas extrapiramidais do que os antipsicóticos típicos (McGorry et al, 2011). O uso de outras medicações psiquiátricas, exceto outros antipsicóticos, foi permitido de acordo com a indicação clínica. As medicações e dose utilizadas foram registradas.

3.1.1.2 Avaliação psiquiátrica: Inclusão na pesquisa (Avaliação 1)

Na etapa de inclusão no estudo (realizada imediatamente após o rastreamento), foi realizada a avaliação 1, em que foi preenchida uma ficha de identificação para o paciente e foram aplicados os módulos A, B, C, D e E da SCID-I (*Structured Clinical Interview for DSM-IV*). Outros quatro instrumentos foram aplicados no grupo de pacientes para avaliação de sintomas e da resposta farmacológica:

1) psicopatologia psicótica – através da escala de sintomas positivos e negativos (PANSS – *Positive and negative syndrome scale*) (Kay et al, 1987), instrumento validado no Brasil por Vessoni (Vessoni, 1993). Ela é dividida em três subescalas: positiva (contendo 7 perguntas que avaliam sintomas positivos, como delírios e alucinações); negativa (contendo

7 perguntas que avaliam sintomas negativos, como embotamento afetivo) e de psicopatologia geral (contendo 16 perguntas);

2) gravidade da doença – através da escala de impressão de gravidade clínica (GAF – *Global assessment of functioning* / CGI – *Clinical global impression*) (Haro et al, 2003), instrumento validado no Brasil por Lima et al (Lima et al, 2007). Essas escalas são avaliações globais da resposta ao tratamento com medicamentos e do funcionamento do paciente;

3) Calgary Depression Scale fo Schizophrenia (CDSS), que avalia sintomatologia depressiva atual;

4) Young mania rating scale, que avalia sintomas de mania em pacientes. Essa escala não foi utilizada para a correlação dos dados, uma vez que para a presente tese excluimos indivíduos com desfecho de transtorno bipolar.

Dados sócio-demográficos foram colhidos para permitir pareamento da amostra e futuro refinamento do fenótipo. Outros dados como migração, complicações obstétricas, história familiar de doenças psiquiátricas e uso de drogas de abuso também foram relatados. Com base nessas avaliações psiquiátricas, indivíduos que apresentaram diagnóstico de psicose induzida por uso de substâncias, transtorno bipolar ou sintomas psicóticos secundários à depressão ou uso prévio de medicação antipsicótica foram excluídos da pesquisa.

3.1.1.3 Avaliação psiquiátrica: seguimento do paciente (Avaliação 2 e 3)

No seguimento, a avaliação foi realizada com os mesmos instrumentos aplicados na etapa de inclusão (avaliação 1), após dois meses de tratamento com risperidona (avaliação 2) ou 1 ano (avaliação 3). Inicialmente houve uma grande perda de pacientes entre a etapa de inclusão e o seguimento, uma vez que muitos pacientes não retornavam para essa segunda avaliação. Com a criação do ambulatório de PEP no CAISM, essa dificuldade foi parcialmente sanada, uma vez que o paciente retornava ao ambulatório periodicamente de acordo com a sua necessidade, favorecendo uma maior adesão.

A resposta ao tratamento foi determinada pela redução em 50% do escore da PANSS na avaliação 2 quando comparada à avaliação 1 (Leucht et al, 2009). Nesse momento, foi realizada a segunda coleta de sangue. Os pacientes também foram submetidos à coleta de

sangue após a avaliação 3, em que foi novamente verificado o estado quanto a resposta ao tratamento. Os dados da avaliação 3 e respectiva coleta de sangue só foram incluídos no estudo II.

3.1.2 Indivíduos controles

Os controles saudáveis foram submetidos a um protocolo semelhante de avaliação psiquiátrica e coleta de sangue. Eles foram pareados por sexo e idade com os pacientes. Um indivíduo foi considerado controle saudável quando houve ausência de diagnóstico psiquiátrico atual ou passado definido de acordo com a SCID e quando não apresentava história de transtorno psicótico na família.

3.1.3 Delineamento geral do estudo

O estudo foi delineado em duas frentes: uma comparação entre pacientes em PEP virgens de antipsicóticos e controles; e entre pacientes em PEP antes e após o tratamento (8 semanas ou 1 ano), particularmente a riperidona, um antipsicótico atípico. Esse desenho (Figura 1) foi a base do projeto regular da FAPESP 2010/08968-6, com o qual foi possível coletar essa amostra inicial. Inicialmente o estudo incluiu a investigação da expressão de genes relacionados à neurotransmissão por meio da técnica de *Superarray – RT2 Profiler™ PCR Array System* e uma posterior análise de metilação de DNA dos genes diferencialmente expressos em amostras de sangue periférico. Durante este auxílio, foram selecionados 51 pacientes em PEP, dos quais 44 foram submetidos a uma reavaliação após dois meses de tratamento com risperidona, e 50 controles saudáveis. Com base nesse estudo foram publicados três artigos científicos (Ota et al, 2013d; Ota et al, 2014b; Ota et al, 2014c) sendo dois deles em revistas Qualis A1 da CAPES (Área de concentração Ciências Biológicas I).

Devido à inclusão das amostras de PEP no projeto temático FAPESP-MCT/CNPq-PRONEX (FAPESP 2011/50740-5), foi possível adicionar à presente tese a avaliação da expressão de mais 21 genes relacionados ao neurodesenvolvimento, metabolismo de neurotransmissores, maquinaria de miRNA, mielinização, neuroplasticidade, interleucinas e sistema endonabinoide. Um dos genes selecionados (*COMT*) também foi investigado com a técnica anterior. Além disso, esse auxílio previa a utilização do *TaqMan® Low Density Array* como método de avaliação da expressão gênica e não previa a análise de metilação

de DNA. Por meio dele, foi possível ampliar a amostra anterior para 73 indivíduos PEP virgens de tratamento (64 dos quais tiveram seguimento após dois meses de tratamento e 9 após um ano) e 73 controles.

Cada participante foi submetido à coleta de sangue para a obtenção de um banco de RNA e de DNA, além da avaliação psiquiátrica, conforme demonstrado na Figura 1. Dessa forma, o RNA extraído foi utilizado para a análise da expressão gênica de RNAm e o DNA foi utilizado para as análises de metilação de genes diferencialmente expressos provenientes da análise pela técnica *Superarray – RT2 Profiler™ PCR Array System*, para identificar se a diferença de expressão era devida a diferenças de metilação.

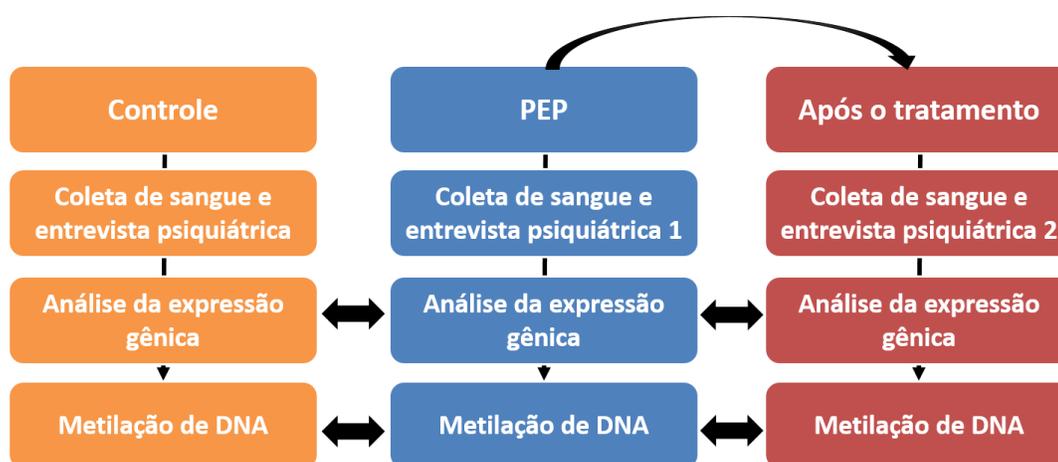


Figura 1. Desenho do estudo I, indicando as etapas em que foram realizadas as coletas de sangue e as avaliações psiquiátricas (antes e após o tratamento), seguidas pela análise da expressão gênica e da metilação de DNA.

3.1.4 Coleta de material e extração de ácidos nucleicos

Ao todo, 15 mL de sangue periférico foram coletados dos pacientes e dos controles: 5 mL distribuídos em dois tubos PAXgene (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Suíça) para extração de RNA e análise de expressão gênica e 10 mL em dois tubos contendo EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) para extração de DNA e análise de metilação.

As extrações de DNA e RNA foram realizadas por meio dos kits *Gentra Puregene* (Qiagen, Germantown, EUA) e *PAXGene blood RNA* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras extraídas de DNA e RNA foram quantificadas por meio do aparelho *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop, Wilmington, EUA). As razões entre os comprimentos de onda 260/230 e 260/280 foram verificadas para estimar a qualidade do material extraído. Adicionalmente, a integridade do RNA extraído foi estimada por meio de gel de agarose 1%, em que também foi verificada uma possível contaminação com DNA genômico. As amostras de DNA e RNA foram armazenadas a -20°C e -80°C, respectivamente.

3.1.5 Análise de expressão gênica

A expressão gênica foi medida por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real quantitativo. Entretanto, devido à aquisição de novos equipamentos e à verba de projetos diferentes, a análise foi realizada por meio de duas técnicas diferentes: *Superarray – RT2 Profiler™ PCR Array System* (Qiagen) e TLDA (*TaqMan® Low Density Array*) (*Life Technologies*), descritas a seguir.

3.1.5.1 RT2 Profiler™ PCR Array System

Inicialmente, o RNA extraído foi convertido a cDNA utilizando-se o *kit RT2 First Strand* (Qiagen). Para tanto, 600 ng de RNA foram adicionados a 2 µL de *Buffer GE* em um volume final de 10 µL. A mistura foi incubada a 42°C por 5 minutos e em seguida a 4°C por pelo menos 1 minuto. A ela, foi adicionado um coquetel que continha 4 µL de *5x Buffer BC3*, 1 µL de *Control P2*, 2 µL de *RE3 Reverse Transcriptase* e 3 µL de *Rnase-free water*. A mistura de 20 µL foi incubada a 42°C por 15 minutos, seguido de 95°C por 5 minutos. Após essa incubação, o cDNA foi diluído em água, completando um volume de 111 µL. Um total de 300-600 ng (50-100 µL) do cDNA foi misturado ao *2x RT2 SYBR Green Mastermix* (Qiagen) e água, e 25 µL dessa mistura foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços de PCR *array* (CAPH10883 ou PAHS-060, descrição a seguir), que continha iniciadores (*primers*) liofilizados para determinados genes. Em seguida essas placas foram submetidas à amplificação no aparelho *7500 Fast PCR Real-Time System* (*Life Technologies*). Dessa forma, a detecção da expressão gênica foi realizada por meio do corante *SYBR® Green*, que intercala moléculas de DNA dupla fita e emite fluorescência proporcional à quantidade de DNA amplificado durante a PCR.

O princípio dessa técnica envolve primeiramente a escolha de uma placa de PCR *array*, que contém os iniciadores liofilizados específicos de cada gene. A companhia Qiagen disponibiliza a opção de placas catalogadas, que permitem a escolha da via, mas não a inclusão ou exclusão de genes, ou de placas customizadas, em que o pesquisador pode selecionar os genes que deseja investigar, entretanto o custo é mais elevado.

Inicialmente, optamos por uma placa de PCR *array* catalogada que contém iniciadores para 84 genes de receptores e reguladores de neurotransmissores (PAHS-060), cuja relação pode ser visualizada na Figura 2 e no site: http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-060A.html. Nesta placa também estão contidos iniciadores para cinco genes endógenos (*B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH* e *ACTB*), necessários para normalização dos dados pelo método de Ct (*threshold cycle*) comparativo, além de controles que avaliam a presença de DNA genômico contaminante (HGDC – *Human Genomic DNA Control*), a qualidade do RNA utilizado (RTC – *Reverse Transcription Control*) e a eficiência da reação (PPC – *Positive PCR Control*).

Placa PAHS - 060

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABAT	ACHE	ANXA9	BRS3	TSPO	CCKAR	CCKBR	CHAT	CHRM1	CHRM2	CHRM3	CHRNA1
B	CHRNA2	CHRNA3	CHRNA4	CHRNA5	CHRNA6	CHRNA7	CHRNB1	CHRNB2	CHRNB4	CHRND	CHRNE	CHRNA1
C	COMT	DRD1	DRD2	DRD3	GABRA1	GABRA2	GABRA3	GABRB1	GABRB2	GABRD	GABRE	GABRG1
D	GABRG2	GABRP	GABRQ	GABRR1	GABRR2	GAD1	GALR1	GALR2	GALR3	GCH1	GCHFR	GLRA1
E	GLRA2	GLRA3	QRFPR	NPFFR1	MCHR1	PROKR1	PROKR2	NPFFR2	GPR83	GRIA1	GRIN1	GRPR
F	HCRTR2	HTR1B	HTR2A	HTR3A	HTR3B	MAOA	NMBR	NMUR1	NMUR2	NPY1R	NPY2R	PHOX2A
G	PPYR1	PRLHR	SLC5A7	SORCS1	SORCS2	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	TACR1	TACR2	TPH1
H	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Figura 2. Esquema da placa PAHS-060. Em cada placa é aplicada a amostra de um indivíduo. A placa contém 84 iniciadores para genes de receptores e reguladores de neurotransmissores (em azul), cinco para genes endógenos (em vermelho), além de controles que avaliam a presença de DNA genômico contaminante (*HGDC* – *Human Genomic DNA Control*, em verde), a qualidade do RNA utilizado (*RTC* – *Reverse*

Transcription Control, em amarelo) e a eficiência da reação (*PPC – Positive PCR Control*, em roxo).

Dada a função tecido específica cerebral destes genes, esperávamos que parte deles não apresentasse expressão em níveis detectáveis no sangue periférico. Dessa forma, em um estudo piloto, realizamos um rastreamento em dez pacientes PEP antes e após o tratamento, e em nove controles de forma a identificar os genes cuja expressão seria detectável em sangue periférico por meio dessa técnica ((Ota et al, 2013d), Anexo 2).

Após esse rastreamento, optamos por excluir 48 dos 84 genes cuja expressão não foi detectável em sangue ou por não estarem diretamente envolvidos em vias relacionadas à psicose ou ao efeito de antipsicóticos. Desta forma, foi possível customizar uma nova placa de PCR array (CAPH10883), que incluiu os 36 genes que apresentaram amplificação em tecido periférico e mais alguns genes consistentemente envolvidos no neurodesenvolvimento (*BDNF* e *NRG1*) ou na via dopaminérgica (*TACR3* e *TH*), totalizando 40 genes alvos (Figura 3), além dos mesmos cinco genes endógenos e de controles de reação. Assim, reduzimos pela metade o número de genes investigados e, ao invés de aplicar uma amostra por placa PAHS-060 (Figura 2), passamos a aplicar duas amostras por placa CAPH10883 (Figura 3).

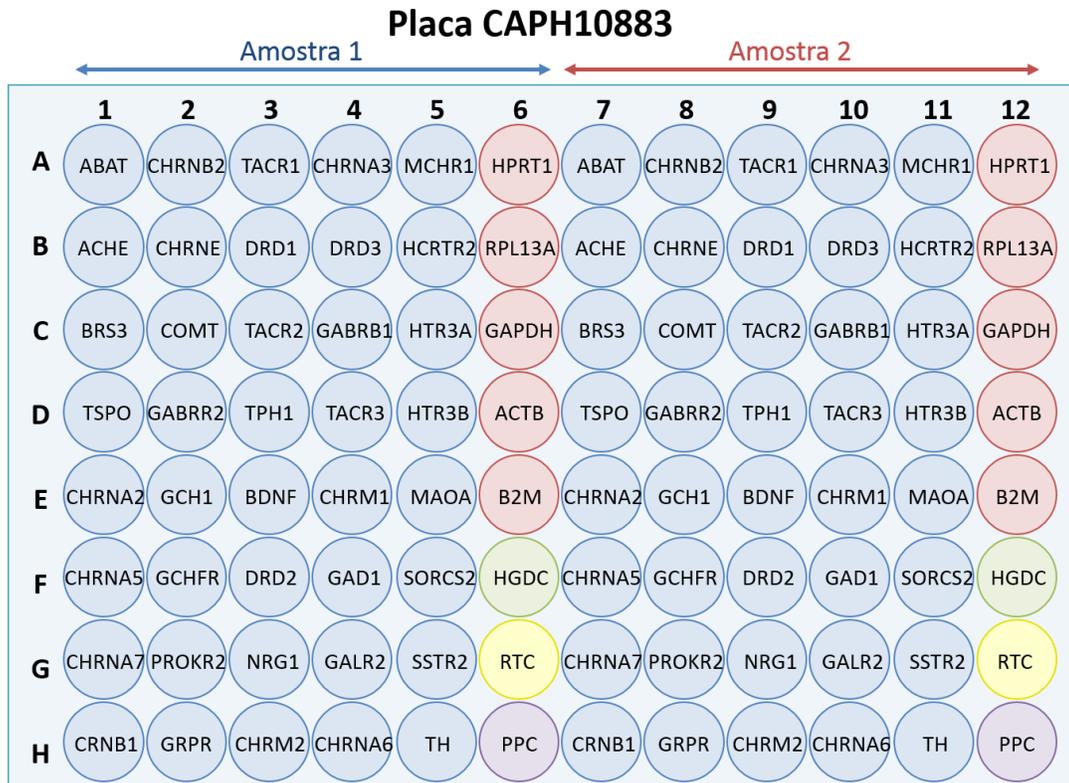


Figura 3. Esquema da placa CAPH10883. Em cada placa são aplicadas duas amostras. Ela contém 40 iniciadores para genes relacionados à neurotransmissão ou neurodesenvolvimento (em azul), cinco para genes endógenos (em vermelho), além de controles que avaliam a presença de DNA genômico contaminante (*HGDC* – *Human Genomic DNA Control*, em verde), a qualidade do RNA utilizado (*RTC* – *Reverse Transcription Control*, em amarelo) e a eficiência da reação (*PPC* – *Positive PCR Control*, em roxo).

Após a corrida de cada placa, foi gerada uma curva de amplificação para cada gene (Figura 4).

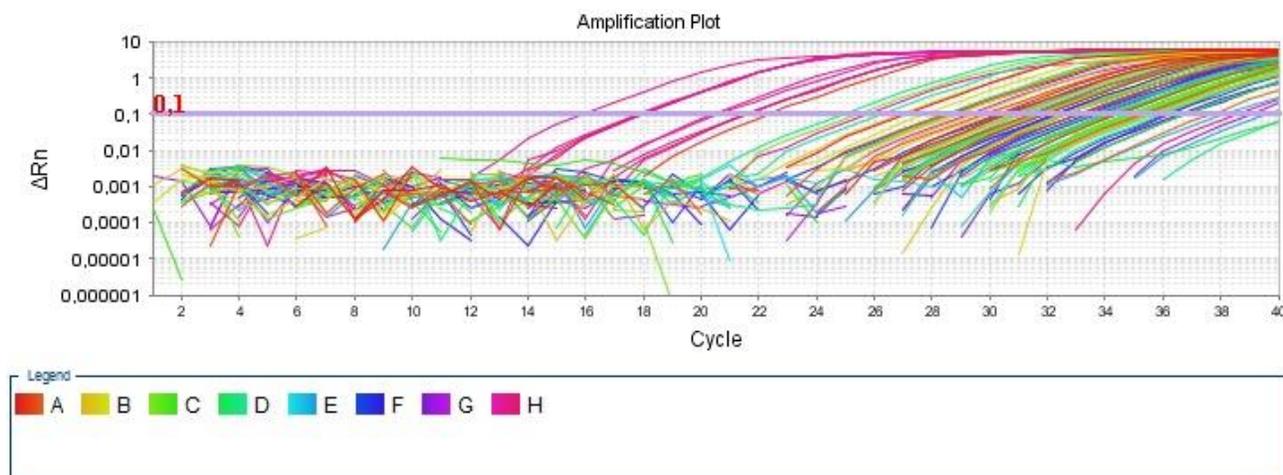


Figura 4. Resultado do PCR *array* (PAHS-060) de uma amostra, em que podem ser observados o *threshold* estabelecido em 0,1 e as curvas de amplificação dos 84 genes de receptores e reguladores de neurotransmissores, dos cinco genes endógenos e dos outros controles presentes na placa.

Para a análise, o valor de *threshold* foi estabelecido em 0,1 (Figura 4), acima do sinal *background*, como recomendado pelo fabricante. Esse mesmo *threshold* foi estabelecido para todos os genes e controles das placas PAHS-060 e CAPH10883 e também entre as diferentes placas. Todos os valores de Ct dos controles da reação (PPC, RTC e HGDC) ficaram próximos ao esperado: a) Reprodutibilidade do PCR *array*: $Ct_{PPC} = 20 \pm 2$; b) Eficiência da transcriptase reversa: Média (Ct_{RTC}) - Média (Ct_{PPC}) < 5; c) Contaminação com DNA genômico: $Ct_{HGDC} > 35$.

Para cada amostra em cada gene, os valores de ΔCt foram calculados ($Ct_{gene\ alvo} - MG\ Ct_{endógeno}$; MG: Média Geométrica dos Ct dos cinco endógenos). Todos os genes que apresentaram $Ct > 35$ foram excluídos. Em seguida, os valores de ΔCt foram inseridos no programa *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) v. 18.0 (IBM Corporation, Armonk, EUA) para a aplicação dos testes estatísticos.

3.1.5.2 TaqMan® Low Density Array (TLDA)

Devido à aquisição recente do aparelho ViiA™ 7 Real-Time PCR System (*Life Technologies*) com bloco TLDA (*TaqMan® Low Density Array*), foi possível incorporar ao projeto uma técnica que apresenta maior sensibilidade e especificidade e menor custo por

reação do que as placas *RT2 Profiler™ PCR Array*. Embora essa técnica seja a mesma já utilizada (PCR em Tempo Real), o sistema de detecção é diferente. Enquanto a *RT2 Profiler™ PCR Array* utiliza a detecção por intercalantes de DNA (no caso *SybrGreen®*), o TLDA utiliza a detecção pelo sistema *Taqman®* (com sondas de hidrólise marcadas).

O ensaio *TaqMan®* consiste em sondas conjugadas na extremidade 5' com um fluorocromo (*reporter*) e na extremidade 3' com uma molécula *quencher*, que absorve a fluorescência do *reporter* pela proximidade física entre os dois. Quando a enzima *Taq* polimerase adiciona nucleotídeos a fita-molde, ela encontra a sonda hibridada e, por sua propriedade de exonuclease 5'→3', cliva os nucleotídeos da sonda liberando o *reporter* que, distante do *quencher*, emite fluorescência. A fluorescência emitida é proporcional à quantidade de cDNA amplificado durante a PCR.

Na técnica d TLDA são utilizados cartões customizados pela *Life Tehnologies (Custom TaqMan® Array Cards)* que se assemelham às placas de 384 poços e permitem a investigação de 12 a 384 transcritos por ensaios de expressão *TaqMan®* para 1 a 8 amostras.

Para a realização do experimento, o RNA extraído foi convertido a cDNA utilizando-se o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies)*. Para tanto, 400 ng de RNA foram diluídos em água totalizando 10 µL em que foi adicionada uma mistura contendo 2 µL de *10X RT Buffer*, 0,8 µL de *25X dNTP mix*, 2 µL de *10X RT Random Primers*, 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 1 µL de *RNase Inhibitor* e 3,2 µL de água. A mistura de 20 µL foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e mantida a 4°C. O cDNA foi armazenado em *freezer -20°C* até o uso.

Um total de 55 µL de cDNA diluído em água, contendo de 20-100 ng do cDNA, foram misturados com 55 µL de *TaqMan® Universal Master Mix (Life Technologies)*. Dessa mistura, foram aplicados 100 µL em uma das portas do cartão TLDA 24 (Figura 5). Cada cartão contém 8 portas, representando amostras diferentes (Figura 5). Assim, o processo foi repetido para sete amostras mais um controle negativo por cartão que foram aplicadas em cada porta do TLDA 24. Esse cartão permite a análise de 24 genes, sendo 1 deles o controle 18S, em duplicatas e para oito amostras, aplicadas em cada porta (24 x 2 x 8 = 384 poços). Os genes avaliados se encontram no Quadro 1.

Replicates																									Port
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	B
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	C
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	D
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	F
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	G
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	H
5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	J
6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	K
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	L
7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	N
8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	O
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	P

Figura 5. Layout TLDA 24. Custom TaqMan® Array Cards utilizados com a tecnologia TLDA mostrando a possibilidade de interrogar 23 genes e 1 controle (CTL, o 18S) em duplicata e para 8 amostras utilizando um único cartão.

Os ensaios dos genes incluídos no cartão TLDA 24 encontram-se descritos no Quadro 1 e foram selecionados com base nos seguintes critérios:

1. Genes com expressão em sangue periférico: Para esta seleção foi utilizado o site *GeneCards* (www.genecards.org) que compila dados provenientes de expressão gênica por meio de *microarray* (através do *database* BioGPS), de RNAseq (sequenciamento de transcritos por meio da plataforma Illumina) e SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*);

2. Genes com participação na neurotransmissão, na maquinaria de miRNA, na mielinização, na neuroplasticidade e no metabolismo de neurotransmissores, para futuramente correlacionar com outras variáveis investigadas, como Neuroimagem, Neuropsicologia e análises de biomarcadores periféricos e proteínas.

Quadro 1. Genes que foram analisados utilizando os cartões TLDA 24 da Figura 5.

Neurodesenvolvimento	Nome	Ensaio
LIS1 ou PAFAH1B1	Platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 (45kda)	Hs00181182_m1
NDEL1	Nude nuclear distribution E homolog (A. Nidulans)-like 1	Hs00229366_m1
DISC1	Disrupted in schizophrenia 1	Hs00257791_s1
UFD1L	Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	Hs00799945_s1
Metabolismo de NT / Antipsicótico	Nome	Ensaio
DGCR2	Digeorge syndrome critical region gene 2	Hs00192970_m1
GAD1	Glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kda)	Hs00247564_m1
COMT	Catechol-O-methyltransferase	Hs02511558_s1
MAOA	Monoamine oxidase A	Hs00165140_m1
SLC6A3 ou DAT	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3	Hs00997364_m1
Maquinaria de miRNA	Nome	Ensaio
DROSHA	Drosha, ribonuclease type III	Hs00203008_m1
DGCR8	Digeorge syndrome critical region gene 8	Hs00256062_m1
DICER1	Dicer 1, ribonuclease type III	Hs00229023_m1
Mielinização	Nome	Ensaio
PLP1	Proteolipid protein 1	Hs00166914_m1
MBP	Myelin basic protein	Hs00922788_m1
Neuroplasticidade / Neurotrofinas	Nome	Ensaio
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	Hs03805848_m1
NRG1	Neuregulin 1	Hs00247620_m1
TNF	Tumor necrosis fator	Hs01113624_g1
Interleucinas	Nome	Ensaio
IL6	Interleukin 6	Hs00985639_m1
IL2	Interleukin 2	Hs00174114_m1
Endocanabinóide	Nome	Ensaio
CNR1	Cannabinoid receptor 1 (brain)	Hs01038522_s1
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Hs00178289_m1
Genes endógenos	Nome	Ensaio
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
ACTB	Actin, beta	Hs01060665_g1
18S	18S	Hs99999901_s1

O cartão foi então centrifugado a 1200 rpm por duas vezes de 1 minuto em uma centrífuga específica, selado e colocado no aparelho ViiA™ 7 Real-Time PCR System.

A quantificação da expressão foi obtida a partir do cálculo do ΔCrt (*relative threshold*), no qual a média dos Crts das replicatas é subtraído da média da expressão dos genes endógenos. O valor de Crt difere do Ct (*baseline threshold*), pois é calculado para cada curva, e não mais para todas as curvas do gene (Figura 6), corrigindo variações que podem ocorrer em reações com volume muito baixo, como nos cartões TLDA. Para todas as

comparações optamos por utilizar a média geométrica dos genes *GAPDH* e *ACTB* para normalizar os dados e calcular os valores de ΔCrt .

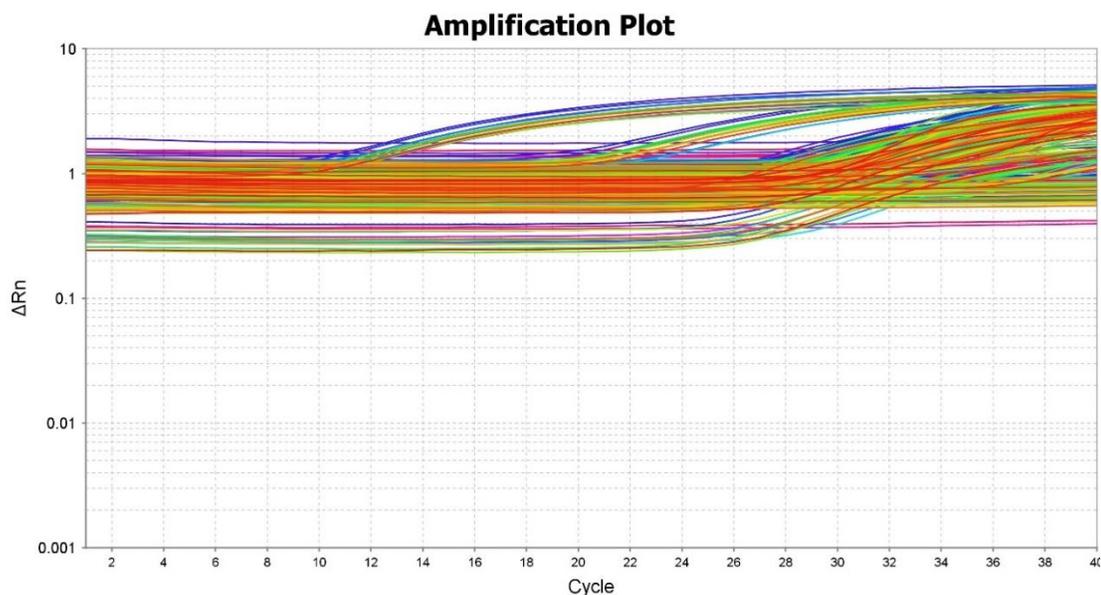


Figura 6. Resultado do Custom TaqMan® Array de um cartão, analisando 24 genes, em duplicatas para 8 amostras, as 384 curvas de amplificação são modificadas ao se escolher o método de Crt (*relative threshold*).

Entretanto, semelhantemente às placas de *RT2 Profiler™ PCR Array*, alguns genes selecionados tiveram uma baixa ou nenhuma amplificação detectável em sangue periférico, levando-nos a excluí-los da amostra. Esses genes foram: *IL2*, *IL6*, *BDNF*, *GAD1*, *MAOA*, *NRG1*, *PLP1* e *SLC6A3*. Além disso, algumas amostras não apresentavam uma consistência entre as duplicatas, levando à exclusão da amostra da análise. Logo, optamos por aumentar para três replicatas (permitindo a exclusão de uma delas com um desvio muito alto) e assim, modificamos o desenho do cartão para o TLDA 16 (Figura 7), em que avaliamos 16 genes, em triplicata para 8 amostras (16 x 3 x 8 = 384 poços).

Replicates																						Port			
1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	A
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	B
2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	C
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	D
3	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	E
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	F
4	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	G
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	H
5	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	I
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	J
6	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	K
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	L
7	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	M
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	N
8	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	O
	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	P

Figura 7. Layout TLDA 16. Custom TaqMan® Array Cards utilizados com a tecnologia TLDA mostrando a possibilidade de interrogar 13 genes alvos e 3 endógenos em triplicata e para 8 amostras utilizando um único cartão.

3.1.6 Análise de metilação de DNA

Para o estudo de metilação dos genes que apresentaram diferença na expressão, a técnica escolhida foi o sequenciamento de DNA modificado por bissulfito de sódio.

Primeiramente, as amostras de DNA foram tratadas pelo *EpiTect Bisulfite Kit* (Qiagen), que possibilita a conversão de citosinas não metiladas em uracila pelo bissulfito de sódio, enquanto que as citosinas metiladas são resistentes a essa mudança e permanecem em estado de citosinas (Figura 8).

Em seguida, os produtos convertidos por bissulfito de sódio foram analisados utilizando o método de sequenciamento. Para tanto, os iniciadores foram desenhados para as ilhas CpG em regiões promotoras dos genes utilizando os programas *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer>) e *Methyl Primer Express* (Life Technologies). Uma ilha CpG foi definida como a presença de pelo menos 50% de conteúdo GC. As sequências selecionadas localizavam-se nas 600 pb antes do primeiro éxon, com base nas anotações genômicas disponíveis no *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Para o gene *GCH1*, os iniciadores utilizados foram: 5'-TTTTTGGTTTGAAGAGGGG-3' (*forward*) e 5'-ACCACAACTAAAAACCC-3' (*reverse*). A representação da região amplificada após a conversão com o *EpiTect Bisulfite Kit* está na Figura 8.



Figura 8. Região do gene *GCH1* amplificada após a conversão com o *EpiTect Bisulfite Kit*, que modifica as citosinas (C) não-metiladas para uracilas e mantém as citosinas metiladas como C. Após as etapas da PCR, as uracilas são substituídas por timinas (T). Em negrito está representada a região dos iniciadores, em vermelho estão representados os sítios CpG interrogados, e em azul está representado o número do sítio CpG. Em azul também estão representados os sítios de reconhecimento de fatores de transcrição. CCAAT: CCAAT box; CRE: *cAMP response element*; Sp1: *binding site of transcription factor Sp1*; TATA: TATA box; Adaptado de Bodzioch et al, 2011 (Bodzioch et al, 2011). Y = Citosina ou Timina; A = adenina; G = guanina.

A PCR foi realizada com 2,5 µL de *10X Buffer Platinum*, 1,5 µL de dNTP (10mM), 0,76 µL de MgCl₂ (100 mM), 2 µL de cada iniciador (10 mM), 0,3 µL de *Taq Platinum (Life Technologies)*, 2 µL de DNA, e completando para 25 µL com água. O produto final de 348 pb foi avaliado em gel de agarose 1,5% para verificar a amplificação e, posteriormente,

purificado com o *Qiaquick Gel Extraction kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, cada produto purificado foi inserido no vetor *pGEM[®]-T Easy Vector* (Promega, Madison, EUA), que possui como marca de seleção a resistência a ampicilina (*Amp^r*) e como controle de ligação o gene da β -galactosidase (*lacZ*) (Figura 9). Para tanto, foram misturados 5 μ L de *2X Rapid Ligation Buffer*, 1 μ L de *pGEM-T Easy Vector*, 1 μ L de *T4 DNA ligase*, 20 ng do produto de PCR e completamos com água para 10 μ L, seguido de incubação a 4°C por 16 horas.

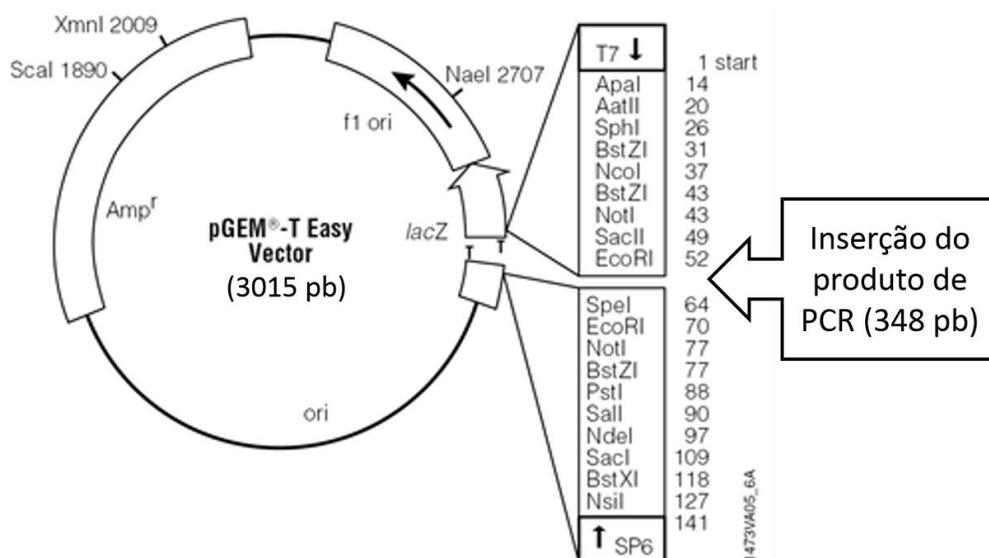


Figura 9. Vetor *pGEM[®]-T Easy* de 3015 pb, que contém marca de seleção a resistência a ampicilina (*Amp^r*) e como controle de ligação o gene da β -galactosidase (*lacZ*)

A inserção do vetor contendo o inserto em uma bactéria foi realizada por meio da transformação por choque térmico para desestabilizar a membrana das bactérias DA10B competentes. Para tanto, misturamos o produto da ligação com 75 μ L de meio TBF1 e, em seguida, adicionamos em 100 μ L de bactérias DA10B competentes. Incubamos em gelo por 30 minutos e, em seguida, à temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionamos ao meio 1 mL de meio SOC e incubamos a 37°C com agitador por 1 hora. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante descartado. As bactérias foram plaqueadas em meio LB com ágar, ampicilina, X-gal e IPTG e armazenadas em estufa a 37°C por 18 horas. Em seguida, dez colônias brancas, contendo as bactérias que não

expressam *lacZ*, cujo gene foi interrompido pela inserção do fragmento de PCR, foram selecionadas e inseridas em meio LB líquido contendo ampicilina. Após 16 horas, foi realizada a extração de DNA dos plasmídeos das colônias transformadas por Miniprep caseira.

Para tanto, transferimos 1,5 mL de meio com bactéria para um tubo e centrifugamos a 12000 rpm por 2 minutos. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o sobrenadante em 100 µL de solução I contendo 1 µL de RNase. A mistura foi incubada por 10 minutos e, em seguida foram adicionados 200 µL de solução II (lise). Misturamos e após 5 minutos adicionamos 200 µL de solução III (neutralização). Misturamos, incubamos em gelo por 15 minutos e centrifugamos a 12000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi preservado e pipetado em tubos novos. Adicionamos 300 µL de isopropanol gelado e centrifugamos a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% gelado foram adicionados. Centrifugamos a 12000 rpm por 10 minutos e descartamos o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 20 µL de água e armazenado em freezer -20°C até o sequenciamento.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *BigDye™ Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Life Technologies)* de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações. Brevemente, foi preparada uma mistura contendo 1 µL de *Big Dye v.3.1. (2,5x)* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 3 µL do iniciador T7 (1 µM), 3 µL de Tampão *Big Dye (5x)*, 1,5 µL de água e 1,5 µL dos produtos da Miniprep, totalizando 10 µL de reação. As amostras foram submetidas à seguinte ciclagem: 96°C por 5 minutos, 35 ciclos de 96°C por 20 segundos, 46°C por 10 segundos (rampa 17%) e 60°C por 4 minutos. Em seguida, para cada reação foram adicionados 40 µL de isopropanol 65%. Após 15 minutos de incubação, a placa foi centrifugada a 2250 g por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 150 µL de etanol 60% foram adicionados em cada poço. A placa foi centrifugada a 2250 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

Após a placa ficar seca, foram adicionados 12 µL de formamida (*Life Technologies*) e foi iniciada a desnaturação a 95°C por 3 minutos. A placa foi resfriada por 3 minutos em gelo e analisadas em sequenciador *ABI prism 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies)* do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol) da UNIFESP.

Por fim, para a análise dos dados foram utilizados os *softwares* DNAMan (Lynnon Biosoft, San Ramon, EUA) e *BiQ Analyzer* (Bock et al, 2005), para o cálculo da porcentagem de metilação em cada sítio CpG presente nos fragmentos.

3.1.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos em relação aos diferentes parâmetros foram submetidos a testes estatísticos adequados. Para comparação entre casos e controles quanto à expressão gênica e metilação do DNA foram realizados testes paramétricos (teste t-Student) ou não-paramétricos (teste Mann-Whitney) de acordo com a distribuição normal da amostra. Para avaliar a resposta ao tratamento, foram utilizados testes pareados paramétricos (teste t pareado) ou não-paramétricos (teste Wilcoxon). A análise dos dados foi realizada com o auxílio dos *softwares* Excel e SPSS v.18.0 (IBM).

Para os genes diferencialmente expressos, fizemos algumas análises adicionais: a) correlacionamos os valores de ΔCt e as variáveis clínicas como PANSS, CGI, GAF e CDSS por meio de correlação de Pearson; b) verificamos diferenças entre os grupos controle e após o tratamento por meio de teste t-Student; c) verificamos se os valores de ΔCt antes do tratamento estavam associados com resposta por meio de regressão logística; d) verificamos se existia interação entre o tempo (antes e após o tratamento) e a resposta por meio de *General Linear Model* (GLM) com medidas repetidas; e e) avaliamos diferenças entre os grupos controle, respondedores e não respondedores (valores de ΔCt após o tratamento) por meio de uma análise de variância (ANOVA de uma via) utilizando o *post-hoc* de Bonferroni.

Os dados foram submetidos à correção de Bonferroni para múltiplas comparações. O índice de significância adotado para todos os testes foi de 0,05.

3.2 Resultados

Para o estudo I analisamos 73 pacientes em PEP, 64 após uma reavaliação de $9,82 \pm 3,34$ semanas de tratamento, nove após $13,33 \pm 3,61$ meses; e 73 controles cujos dados descritivos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados descritivos dos pacientes em primeiro episódio psicótico e controles avaliados.

Variável	PEP antes do tratamento	PEP T2M	PEP T1A	Controles	p-value
Gênero (masculino : feminino)	45:28	41:23	5:4	42:31	0,613 ^a
Idade; média de anos (DP)	26,08 (7,42)	25,77 (7,33)	29,50 (6,85)	25,66 (7,31)	0,728 ^a
PANSS positiva; média (DP)	25,77 (5,42)	14,06 (5,33)	8,60 (1,14)		<0,001 ^b
PANSS negativa; média (DP)	23,16 (7,69)	19,92 (6,39)	19,00 (4,69)		0,014 ^b
PANSS psicopatologia geral; média (DP)	47,18 (11,86)	32,35 (7,35)	24,40 (4,41)		<0,001 ^b
PANSS total; média (DP)	96,11 (20,70)	6,96 (17,03)	52,00 (7,38)		<0,001 ^b
GAF; média (DP)	31,86 (10,58)	55,82 (14,82)	72,20 (7,53)		<0,001 ^b
CGI; média (DP)	4,89 (0;70)	3,33 (1,10)	2,60 (1,14)		<0,001 ^b
CDSS; média (DP)	5,18 (5,24)	2,34 (4,13)	0,80 (1,30)		0,004 ^b

^a: comparando PEP e controles; ^b: comparando PEP antes e após o tratamento; DP: Desvio Padrão; PEP: Pacientes em primeiro episódio psicótico; T2M: após 2 meses de tratamento; T1A: após 1 ano de tratamento; PANSS: *Positive and Negative Syndrome Scale*; CGI: *Clinical Global Impression Scale*; GAF: *Global Assessment of Functioning Scale*; CDSS: *Calgary Depression Scale for Schizophrenia*

Não foram encontradas diferenças entre gênero e idade entre pacientes e controles. Para todas as variáveis clínicas (PANSS, GAF, CGI e CDSS) foi observada uma melhora entre o paciente avaliado antes do tratamento e após a administração de risperidona. Essa melhora foi principalmente significativa nos sintomas positivos (PANSS positiva) e menos nos negativos (PANSS negativa), refletindo o fato de que os antipsicóticos atuam melhor nos sintomas positivos da esquizofrenia.

3.2.1 Análise de expressão

Devido à independência das técnicas de análise de expressão gênica e aos diferentes valores de expressão gênica (ΔCt ou ΔCrt), os resultados foram separados de acordo com a técnica adotada.

3.2.2 RT2 Profiler™ PCR Array System

Embora um estudo piloto com placas catalogadas tivesse sido realizado para um rastreamento de genes que apresentavam expressão detectável em sangue pela técnica de PCR em tempo real, apenas 11 dos 40 genes alvos da placa customizada apresentaram expressão de moderada a alta nesse tecido. Além disso, um deles (*TPH1*) foi excluído pela presença de múltiplos picos de *melting*, sugerindo a amplificação de outras regiões além do alvo, o que poderia interferir na análise. Dessa forma, apenas 10 genes alvos foram considerados para a análise de expressão.

Assim, os valores de ΔCt foram inseridos no banco de dados do SPSS e analisados por meio de teste *t-student* (comparando PEP x controle) e teste *t* pareado (comparando o paciente antes x após o tratamento). Os resultados dessas análises e os valores de *Fold change* estão representados nas Tabelas 2 e 3.

3.2.2.1 Análise de expressão: PEP x controle

Na análise da expressão gênica, dois genes (*TACR2* e *GCH1*) apresentaram diferenças significantes na comparação da expressão gênica entre PEP e controles. Entretanto, após a correção de Bonferroni para múltiplas comparações, em que o nível de significância é corrigido pelo número de testes independentes realizados ($p < 0,005$), apenas o gene *GCH1* permaneceu significantemente diferente entre grupos, estando hipoexpresso no grupo PEP quando comparado ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Genes analisados na placa customizada CAPH10883 e os resultados do teste t-student (comparando PEP vs. controle), bem como valores de *Fold change* (grupo controle como referência).

Gene	Média Δ Ct do PEP (DP)	Média Δ Ct do controle (DP)	Fold change	p-value
ABAT	6,57 (0,62)	6,74 (0,63)	1,096	0,151
TSPO	2,51 (0,62)	2,68 (0,77)	1,085	0,239
CHRNA1	8,38 (0,50)	8,34 (0,42)	0,943	0,682
CHRNE	9,49 (0,67)	9,42 (0,58)	0,918	0,539
COMT	5,06 (0,46)	5,02 (0,37)	0,946	0,687
GABRR2	9,19 (0,79)	9,43 (0,69)	1,137	0,118
GCH1	5,38 (0,42)	5,10 (0,45)	0,798	0,002**
GCHFR	6,58 (0,50)	6,49 (0,44)	0,909	0,330
TACR2	9,33 (0,68)	9,03 (0,60)	0,847	0,024*
NRG1	7,37 (0,98)	7,53 (1,12)	1,078	0,460

PEP: Primeiro Episódio Psicótico; DP: desvio padrão; *: $p < 0,05$; **genes que mantiveram diferenças significantes após a correção de múltiplas comparações ($p < 0,005$)

3.2.2.2 Análise de expressão: PEP antes x após o tratamento

Em relação ao tratamento, embora três genes estivessem diferencialmente expressos (*GCHFR*, *COMT* e *GABRR2*) apenas um gene apresentou diferenças de expressão após a correção de Bonferroni, sendo o *GABRR2* hipoexpresso após o tratamento (Tabela 3).

Tabela 3. Genes analisados na placa customizada CAPH10883 e os resultados do teste *t* pareado (comparando o paciente antes vs. após o tratamento), bem como valores de *Fold change* (grupo PEP antes do tratamento como referência).

Gene	Média Δ Ct do PEP antes do tratamento (DP)	Média Δ Ct do PEP após o tratamento (DP)	Fold change	p-value
ABAT	6,55 (0,62)	6,61 (0,61)	0,969	0,596
TSPO	2,48 (0,63)	2,49 (0,59)	1,019	0,925
CHRNA1	8,37 (0,50)	8,26 (0,31)	1,088	0,181
CHRNE	9,48 (0,69)	9,54 (0,67)	0,963	0,572
COMT	5,08 (0,47)	4,93 (0,47)	1,093	0,045*
GABRR2	9,26 (0,82)	9,75 (0,69)	0,679	0,001**
GCH1	5,37 (0,43)	5,31 (0,34)	1,054	0,424
GCHFR	6,57 (0,51)	6,34 (0,43)	1,180	0,015*
TACR2	9,34 (0,66)	9,29 (0,72)	1,028	0,597
NRG1	7,41 (0,9)	7,45 (0,96)	0,946	0,708

PEP: Primeiro Episódio Psicótico; DP: desvio padrão; *: $p < 0,05$; **genes que mantiveram a significância à correção de múltiplas comparações ($p < 0,005$)

3.2.2.3 Análises adicionais

Os genes diferencialmente expressos em ambas as análises (*GCH1* e *GABRR2*), foram submetidos a algumas análises adicionais: a) correlacionar os valores de ΔCt e as variáveis clínicas como PANSS, CGI, GAF e CDSS; b) verificar diferenças entre os grupos controle e após o tratamento; c) verificar se os valores de ΔCt antes do tratamento estavam associados com resposta por meio de regressão logística; d) verificar a existência de interação entre o tempo (antes e após o tratamento) e a resposta por meio de GLM com medidas repetidas; e e) avaliar diferenças entre os grupos controle, respondedores e não respondedores (valores de ΔCt após o tratamento) por meio de uma ANOVA utilizando o *post-hoc* de Bonferroni. A resposta ao tratamento foi definida como redução em 50% do escore da PANSS, como relatado na seção de Métodos.

Quando correlacionamos os valores de ΔCt de *GCH1* e *GABRR2* e as características clínicas da PANSS, CDSS, CGI e GAF, antes do tratamento e após o tratamento, não observamos nenhuma correlação significativa após a correção para múltiplas comparações de Bonferroni ($p < 0,003$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de ΔCt e as variáveis clínicas antes do tratamento.

Gene		PANSSp	PANSSn	PANSSpg	PANSSt	CDSS	CGI	GAF
ΔCt	<i>GCH1</i>	p=0,064	p=0,251	p=0,025*	p=0,027*	p=0,799	p=0,059	p=0,149
antes		r=0,279	r=0,175	r=0,334	r=0,330	r=-0,041	r=0,301	r=-0,232
ΔCt	<i>GABRR2</i>	p=0,861	p=0,072	p=0,575	p=0,348	p=0,787	p=0,488	p=0,415
antes		r=-0,027	r=0,271	r=0,086	r=0,143	r=-0,044	r=0,113	r=0,133

PANSS: *Positive and Negative Syndrome Scale*; PANSSp: valores totais da PANSS positiva; PANSSn: valores totais da PANSS negativa; PANSSpg: valores totais da PANSS de psicopatologia geral; PANSSt: valores totais da PANSS; CDSS: *Calgary Depression Scale for Schizophrenia*; CGI: *Clinical Global Impression Scale*; GAF: *Global Assessment of Functioning Scale*. * $p < 0,05$

Tabela 5. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de Δ Ct e variáveis clínicas após o tratamento.

Gene		PANSSp	PANSSn	PANSSpg	PANSSt	CDSS	CGI	GAF
Δ Ct	<i>GCH1</i>	p=0,586	p=0,990	p=0,621	p=0,942	p=0,213	p=0,871	p=0,180
após		r=0,094	r=-0,002	r=-0,085	r=-0,013	r=-0,230	r=0,030	r=-0,247
Δ Ct	<i>GABRR2</i>	p=0,104	p=0,029*	p=0,040*	p=0,024*	p=0,766	p=0,402	p=0,217
após		r=-0,276	r=-0,364	r=-0,343	r=-0,376	r=0,056	r=-0,156	r=0,228

PANSS: *Positive and Negative Syndrome Scale*; PANSSp: valores totais da PANSS positiva; PANSSn: valores totais da PANSS negativa; PANSSpg: valores totais da PANSS de psicopatologia geral; PANSSt: valores totais da PANSS; CDSS: *Calgary Depression Scale for Schizophrenia*; CGI: *Clinical Global Impression Scale*; GAF: *Global Assessment of Functioning Scale*. *p<0,05

A expressão do gene *GCH1* não foi significativamente alterada após a administração de antipsicóticos (*Fold change* = 1,054; p = 0,424). Adicionalmente, ao realizarmos um teste t-Student, inserindo o grupo como variável independente (controle ou PEP após o tratamento) e os valores de Δ Ct de *GCH1* como dependente, observamos uma diferença comparando os grupos após o tratamento e controle (p=0,016), sendo que o nível de expressão de *GCH1* no grupo após o tratamento é intermediário entre o grupo controle e o grupo antes do tratamento (Figura 10). Quanto ao tratamento, não observamos uma associação entre resposta ao tratamento e os valores de Δ Ct de *GCH1* (Figura 10) utilizando a regressão logística (p=0,535), o GLM de medidas repetidas (p=0,920) e a ANOVA com *post-hoc* de Bonferroni (p=0,200).

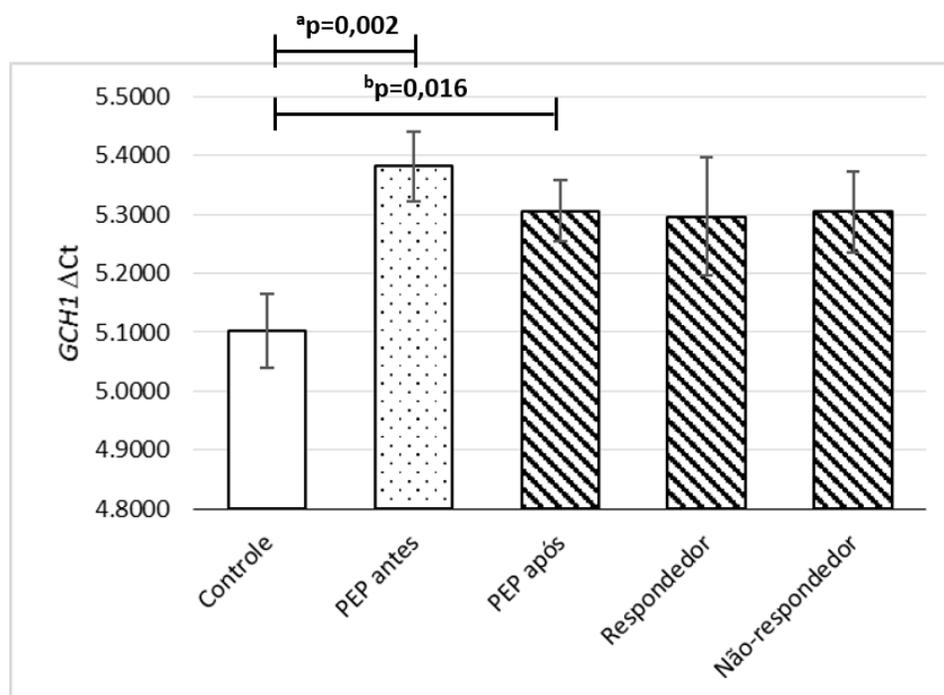


Figura 10. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de *GCH1*. Valores de Δ Ct são inversamente proporcionais à expressão gênica. ^a:valor de p para o teste t; ^b: valor de p para o teste ANOVA, seguido de *post-hoc* Bonferroni; PEP: primeiro episódio psicótico.

A expressão do gene *GABRR2* também diferiu quando comparamos o grupo controle e o após o tratamento ($p=0,023$). Ao separarmos os grupos quanto à resposta, não observamos uma associação entre os valores de Δ Ct antes do tratamento e o grupo por regressão logística ($p=0,604$). Também não observamos uma interação entre o tempo e a resposta por GLM de medidas repetidas ($p=0,305$). Entretanto, foi observada uma diferença na expressão de *GABRR2* ao comparamos o grupo respondedor e controle, bem como grupo não-respondedor e controle, utilizando a ANOVA com *post-hoc* Bonferroni (Figura 11).

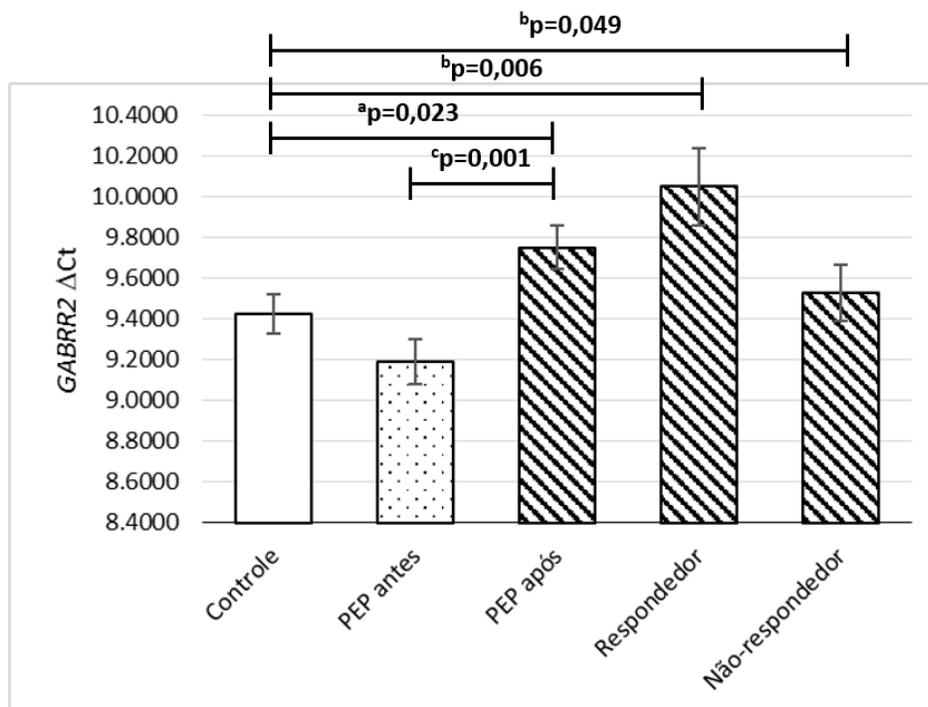


Figura 11. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de *GABRR2*. Valores de ΔC_t são inversamente proporcionais à expressão gênica. ^a: valor de p para o teste t; ^b: valor de p para o teste ANOVA, seguido do *post-hoc* Bonferroni; ^c: valor de p para o teste t pareado; PEP: primeiro episódio psicótico.

3.2.3 TaqMan® Low Density Array

Como relatado anteriormente, 8 dos 21 genes alvos iniciais foram excluídos por apresentarem baixa expressão em sangue periférico por meio da técnica de TLDA. Assim, 13 genes foram considerados para a análise de expressão por TLDA.

Os valores de ΔC_{rt} foram inseridos no banco de dados do SPSS e analisados por meio de teste *t-student* (comparando PEP x controle) e teste *t* pareado (comparando o paciente antes x após o tratamento). Os *outliers* foram removidos e os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em log. Os resultados dessas análises e os valores de *Fold change* estão representados nas Tabelas 6, 7 e 8.

3.2.3.1 Análise de expressão: PEP x controle

Na análise da expressão gênica, quatro genes (*DISC1*, *DROSHA*, *MBP* e *NDEL1*) apresentaram diferenças significantes na comparação entre PEP e controles. Após a correção de Bonferroni para múltiplas comparações ($p < 0,0038$), os genes *MBP* e *NDEL1* permanecem significantes, estando ambos superexpressos no grupo PEP quando comparado ao controle (Tabela 6).

Tabela 6. Genes analisados na placa TLDA e os resultados do teste t-Student (comparando PEP vs. controle), bem como valores de *Fold change* (grupo controle como referência).

Gene	N	Média Δ Crt do PEP (DP)	N	Média Δ Crt do controle (DP)	Fold change	p-value
<i>AKT1</i>	72	4,39 (0,30)	71	4,38 (0,25)	0,993	0,881
<i>CNR1</i>	33	11,39 (0,85)	31	11,09 (1,29)	0,812	0,263
<i>COMT</i>	67	5,69 (0,31)	73	5,60 (0,32)	0,940	0,081
<i>DGCR2</i>	70	4,46 (0,31)	72	4,46 (0,30)	1	0,946
<i>DGCR8</i>	63	7,20 (0,47)	71	7,08 (0,42)	0,920	0,130
<i>DICER1</i>	71	5,51 (0,36)	72	5,61 (0,32)	1,072	0,086
<i>DISC1</i>	45	8,57 (0,67)	52	8,28 (0,50)	0,818	0,017*
<i>DROSHA</i>	64	6,76 (0,50)	66	6,58 (0,43)	0,883	0,032*
<i>MBP</i>	47	8,36 (0,71)	48	8,81 (0,67)	1,366	0,002**
<i>NDEL1</i>	69	3,81 (0,37)	73	4,01 (0,32)	1,149	0,001**
<i>PAFAH1B1</i>	70	4,79 (0,27)	72	4,77 (0,22)	0,986	0,725
<i>TNF</i>	62	7,09 (0,43)	68	7,05 (0,38)	0,973	0,632
<i>UFD1L</i>	71	7,44 (0,42)	70	7,42 (0,40)	0,986	0,781

N: tamanho da amostra; PEP: Primeiro Episódio Psicótico; DP: desvio padrão; *: $p < 0,05$; **genes que mantiveram a significância após a correção para múltiplas comparações ($p < 0,005$)

3.2.3.2 Análise de expressão: PEP antes x após o tratamento

Em relação ao tratamento, três genes mostraram-se diferencialmente expressos (*DGCR2*, *DROSHA* e *NDEL1*), entretanto após a correção de Bonferroni, nenhum manteve as diferenças estatisticamente significantes (Tabela 7).

Tabela 7. Genes analisados na placa TLDA e os resultados do teste *t* pareado (comparando o paciente antes vs. após o tratamento), bem como valores de *Fold change* (grupo PEP antes do tratamento como referência).

Gene	N	Média Δ Crt do PEP antes do tratamento (DP)	Média Δ Crt do PEP após o tratamento (DP)	Fold change	p-value
<i>AKT1</i>	62	4,38 (0,31)	4,35 (0,25)	1,021	0,513
<i>CNR1</i>	18	11,31 (0,76)	11,28 (0,84)	1,021	0,896
<i>COMT</i>	58	5,68 (0,30)	5,60 (0,28)	1,057	0,112
<i>DGCR2</i>	61	4,44 (0,31)	4,58 (0,32)	0,908	0,008*
<i>DGCR8</i>	45	7,19 (0,44)	7,09 (0,39)	1,072	0,240
<i>DICER1</i>	61	5,50 (0,36)	5,52 (0,35)	0,986	0,626
<i>DISC1</i>	28	8,57 (0,75)	8,55 (0,79)	1,014	0,911
<i>DROSHA</i>	53	6,76 (0,51)	6,61 (0,38)	1,110	0,035*
<i>MBP</i>	26	8,35 (0,70)	8,49 (0,57)	0,908	0,250
<i>NDEL1</i>	59	3,80 (0,36)	3,91 (0,35)	0,927	0,027*
<i>PAFAH1B1</i>	60	4,78 (0,27)	4,79 (0,23)	0,993	0,752
<i>TNF</i>	49	7,11 (0,41)	7,03 (0,38)	1,057	0,278
<i>UFD1L</i>	61	7,43 (0,41)	7,42 (0,39)	1,007	0,954

N: Número amostral; PEP: Primeiro Episódio Psicótico; DP: desvio padrão; *: $p < 0,05$; **genes que mantiveram a significância após a correção para múltiplas comparações ($p < 0,005$)

Também comparamos a expressão destes genes de forma pareada entre os pacientes antes e após dois meses e um ano de tratamento utilizando um GLM com medidas repetidas e considerando três fatores (tempos). Entretanto, também não encontramos significância estatística (Tabela 8).

Tabela 8. Genes analisados na placa TLDA e os resultados do GLM de medidas repetidas (para três tempos).

Gene	N	Média Δ Crt do PEP antes (DP)	Média Δ Crt do PEP T2M (DP)	Média Δ Crt do PEP T1A(DP)	p-value
<i>AKT1</i>	9	4,34 (0,12)	4,34 (0,23)	4,44 (0,28)	0,595
<i>CNR1</i>	2	12,11 (0,21)	10,23 (1,31)	11,63 (1,25)	---
<i>COMT</i>	9	5,74 (0,36)	5,59 (0,32)	5,59 (0,40)	0,371
<i>DGCR2</i>	9	4,57 (0,32)	4,51 (0,27)	4,62 (0,72)	0,932
<i>DGCR8</i>	6	7,36 (0,54)	7,21 (0,33)	6,82 (0,62)	0,172
<i>DICER1</i>	9	5,36 (0,13)	5,57 (0,23)	5,11 (0,60)	0,080
<i>DISC1</i>	6	8,57 (0,82)	8,01 (0,92)	8,04 (1,00)	0,553
<i>DROSHA</i>	7	6,72 (0,45)	6,79 (0,23)	6,34 (0,63)	0,235
<i>MBP</i>	3	8,56 (0,62)	8,31 (0,28)	8,45 (0,65)	0,573
<i>NDEL1</i>	9	3,65 (0,33)	3,84 (0,33)	3,78 (0,44)	0,451
<i>PAFAH1B1</i>	8	4,68 (0,23)	4,67 (0,12)	4,65 (0,18)	0,952
<i>TNF</i>	9	7,18 (0,41)	7,22 (0,27)	7,17 (0,56)	0,942
<i>UFD1L</i>	9	7,37 (0,46)	7,19 (0,25)	7,17 (0,79)	0,565

N: Número amostral; PEP: Primeiro Episódio Psicótico; DP: desvio padrão; T2M: após 2 meses de tratamento; T1A: após 1 ano de tratamento. Para o gene *CNR1* não foi possível calcular o valor de p, pois apenas duas amostras apresentaram amplificação.

3.2.3.3 Análises adicionais

Para os genes diferencialmente expressos (*MBP* e *NDEL1*), foram realizadas algumas análises adicionais: a) verificar a existência de uma correlação entre a expressão desses dois genes; b) correlacionar os valores de Δ Ct e as variáveis clínicas como PANSS, CGI, GAF e CDSS; c) verificar diferenças entre os grupos controle e após o tratamento; d) verificar se os valores de Δ Ct antes do tratamento estão associados com resposta por meio de regressão logística; e) verificar se existe interação entre o tempo (antes e após o tratamento) e a resposta por meio de GLM com medidas repetidas; e f) avaliar diferenças entre os grupos controle, respondedores e não respondedores (valores de Δ Crt após o tratamento) por meio de uma ANOVA utilizando o *post-hoc* de Bonferroni.

Para correlacionar os genes *MBP* e *NDEL1* utilizamos a correlação de Pearson. Os resultados estão descritos na Tabela 9. Observamos que existe uma forte correlação positiva entre esses dois genes, justificando os resultados semelhantes ($p=1,9 \times 10^{-5}$; $r=0,428$). Após dois meses de tratamento, observamos que essa correlação tornou-se ainda

mais forte ($p=1,9 \times 10^{-5}$; $r=0,642$), contudo após 1 ano, ela não se manteve ($p=0,187$; $r=0,484$).

Tabela 9. Correlação de Pearson entre os Δ Crt dos genes *MBP* e *NDEL1* (para três tempos).

	<i>MBP</i> antes	<i>NDEL1</i> antes	<i>MBP</i> T2M	<i>NDEL1</i> T2M	<i>MBP</i> T1A	<i>NDEL1</i> T1A
<i>MBP</i> antes	---	---	---	---	---	---
<i>NDEL1</i> antes	$p=1,9 \times 10^{-5**}$ $r=0,428$	---	---	---	---	---
<i>MBP</i> T2M	$p=0,008^*$ $r=0,512$	$p=0,386$ $r=0,149$	---	---	---	---
<i>NDEL1</i> T2M	$p=0,008^*$ $r=0,411$	$p=4,2 \times 10^{-4**}$ $r=0,445$	$p=1,9 \times 10^{-5**}$ $r=0,642$	---	---	---
<i>MBP</i> T1A	$p=0,096$ $r=0,675$	$p=0,747$ $r=0,126$	$p=0,484$ $r=0,516$	$p=0,541$ $r=0,236$	---	---
<i>NDEL1</i> T1A	$p=0,475$ $r=-0,326$	$p=0,912$ $r=0,043$	$p=0,098$ $r=0,902$	$p=0,232$ $r=0,443$	$p=0,187$ $r=0,484$	---

T2M: após 2 meses de tratamento; T1A: após 1 ano de tratamento; r: coeficiente de correlação.

Quando correlacionamos os valores de Δ Ct de *MBP* e *NDEL1* e as variáveis clínicas PANSS, CDSS, CGI e GAF antes do tratamento e após o tratamento, não observamos nenhuma correlação significativa após a correção para múltiplas comparações de Bonferroni ($p < 0,003$) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de Δ Ct e variáveis clínicas antes do tratamento.

Gene	PANSSp	PANSSn	PANSSpg	PANSSst	CDSS	CGI	GAF
Δ Crt <i>MBP</i> antes	$p=0,713$ $r=0,067$	$p=0,098$ $r=0,293$	$p=0,404$ $r=0,150$	$p=0,239$ $r=0,211$	$p=0,403$ $r=-0,161$	$p=0,736$ $r=0,065$	$p=0,445$ $r=-0,145$
Δ Crt <i>NDEL1</i> antes	$p=0,588$ $r=-0,076$	$p=0,184$ $r=-0,185$	$p=0,950$ $r=-0,009$	$p=0,496$ $r=-0,096$	$p=0,171$ $r=0,201$	$p=0,481$ $r=-0,105$	$p=0,116$ $r=0,232$

PANSS: *Positive and Negative Syndrome Scale*; PANSSp: valores totais da PANSS positiva; PANSSn: valores totais da PANSS negativa; PANSSpg: valores totais da PANSS de psicopatologia geral; PANSSst: valores totais da PANSS; CDSS: *Calgary Depression Scale for Schizophrenia*; CGI: *Clinical Global Impression Scale*; GAF: *Global Assessment of Functioning Scale*.

Tabela 11. Resultados da correlação de Pearson entre os valores de ΔCt e variáveis clínicas após o tratamento.

Gene	PANSSp	PANSSn	PANSSpg	PANSSt	CDSS	CGI	GAF
ΔCt <i>MBP</i> após	p=0,133 r=0,315	p=0,047* r=0,410	p=0,083 r=0,361	p=0,045* r=0,412	p=0,280 r=-0,235	p=0,586 r=0,126	p=0,801 r=-0,059
ΔCt <i>NDEL1</i> após	p=0,510 r=-0,103	p=0,530 r=0,099	p=0,867 r=-0,026	p=0,956 r=-0,009	p=0,914 r=0,017	p=0,973 r=0,006	p=0,403 r=0,136

PANSS: *Positive and Negative Syndrome Scale*; PANSSp: valores totais da PANSS positiva; PANSSn: valores totais da PANSS negativa; PANSSpg: valores totais da PANSS de psicopatologia geral; PANSSt: valores totais da PANSS; CDSS: *Calgary Depression Scale for Schizophrenia*; CGI: *Clinical Global Impression Scale*; GAF: *Global Assessment of Functioning Scale*; *: $p < 0,05$.

A expressão do gene *MBP* (*Fold change* = 0,908; $p = 0,250$) não pareceu sofrer alteração após a administração de antipsicóticos (T8S: $p=0,250$; T1A: $p=0,712$). Comparando os grupos PEP após o tratamento e controle, encontramos diferenças apenas após 1 ano, em que foi encontrado um aumento da expressão de *MBP* após um ano (T8S: $p=0,144$; T1A: $p=0,030$; Figura 12), quando comparado com controle.

Por outro lado, apesar de não permanecer significativa após a correção de Bonferroni, é possível observar uma redução nos níveis de *NDEL1* (*Fold change* = 0,927; $p = 0,027$). Concordando com isso, não observamos diferenças entre o grupo controle e o grupo PEP após o tratamento (T8S: $p=0,068$; T1A: $p=0,058$; Figura 13).

Quanto ao tratamento, não observamos uma associação entre resposta ao tratamento e os valores de ΔCt (Figuras 12 e 13), pela regressão logística (*MBP*: $p=0,680$; *NDEL1*: $p=0,650$), por GLM de medidas repetidas (*MBP*: $p=0,985$; *NDEL1*: $p=0,887$) e pelo teste ANOVA com *post-hoc* de Bonferroni (*MBP*: $p=0,985$; *NDEL1*: $p=0,887$). As médias para cada grupo estão representadas nas Figuras 12 e 13.

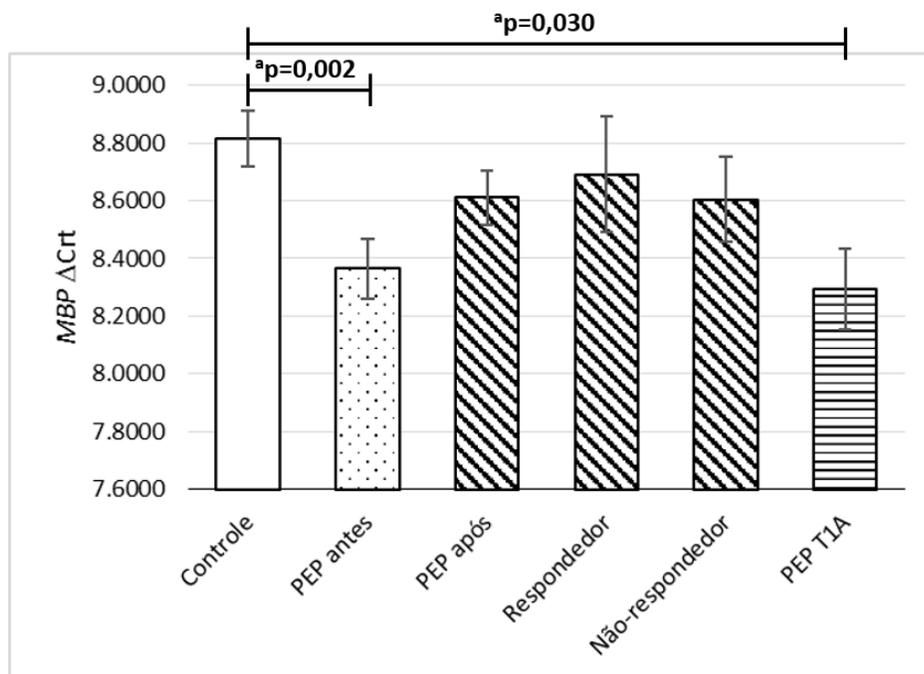


Figura 12. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de *MBP*. Valores de Δ Crt são inversamente proporcionais à expressão gênica. ^a: valor de p para o teste t; PEP: primeiro episódio psicótico; T1A: após 1 ano de tratamento.

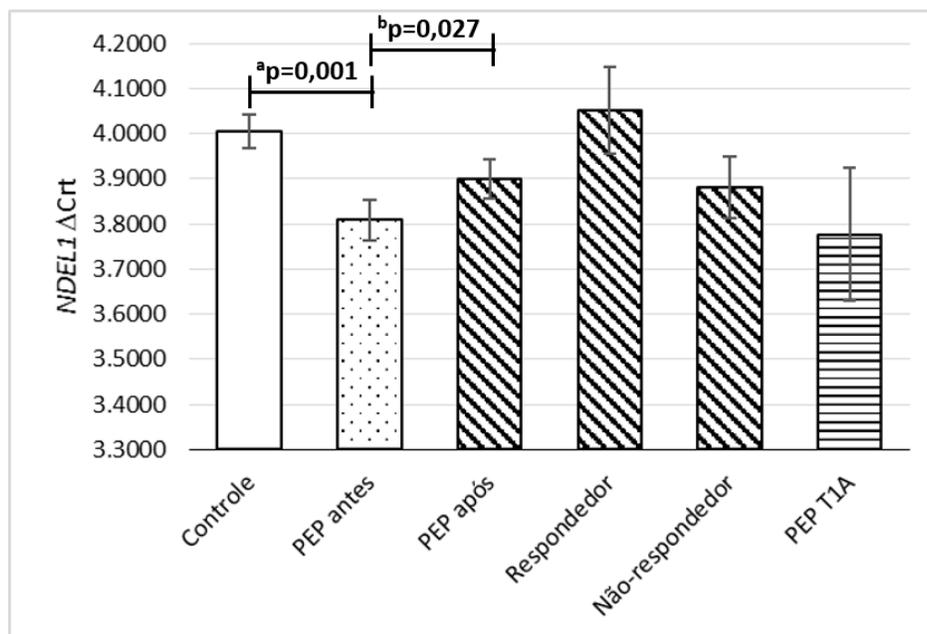


Figura 13. Gráfico dos resultados das comparações entre grupos quanto à expressão de *NDEL1*. Valores de Δ Crt são inversamente proporcionais à expressão gênica. ^a: valor de p para o teste t; ^b: valor de p para o teste t pareado; PEP: primeiro episódio psicótico; T1A: após 1 ano de tratamento.

3.2.4 Análise epigenética - metilação de DNA

Para o estudo epigenético, realizamos apenas a análise do gene *GCH1* para pacientes virgens de tratamento e controles. O gene *GABRR2* não foi analisado quanto à metilação, pois não apresentava ilhas CpG na região promotora que antecedia o primeiro éxon. A análise de metilação de DNA para os genes avaliados pelo método TLDA não estava prevista para o auxílio, dessa forma, os genes *MBP* e *NDEL1* não foram avaliados quanto a essa modificação epigenética. Obtivemos dados de 49 pacientes em PEP virgens de tratamento e 49 controles para 37 sítios CpG do gene *GCH1*. Para cada sítio CpG de cada amostra, foi calculada a média de metilação observada entre os 8-10 clones sequenciados; e estas médias foram comparadas entre grupos. Amostras com menos de 8 clones sequenciados foram excluídas.

O fragmento sequenciado localiza-se na região promotora do gene *GCH1* e apresenta múltiplos sítios de ligação para fatores de transcrição (Bodzioch et al, 2011). Assim, para comparar os valores de metilação entre os grupos (PEP ou controle), utilizamos o teste Mann-Whitney, considerando com variáveis dependentes: a média da metilação dos 37 sítios CpG, a média entre os sítios CpG19 e CpG37 (região mais rica em sequências de ligação de fatores de transcrição; Figura 8) e cada sítio individualmente.

Quatro sítios CpG (CpG13, CpG15, CpG16, CpG21), a média de todos os CpG e a média entre CpG19-CpG37 mostraram-se hipermetilados em PEP quando comparados aos controles (Tabela 12). Entretanto, após a correção para múltiplas comparações nenhum dado permaneceu significativo.

Tabela 12. Média de metilação de cada sítio CpG analisado para o gene *GCH1* para cada grupo. Os valores de p foram calculados pelo teste Mann-Whitney.

Sítio CpG	Média de metilação no controle (DP)	Média de metilação no PEP (DP)	p-value
CpG1	0,023 (0,056)	0,032 (0,057)	0,325
CpG2	0,029 (0,058)	0,023 (0,047)	0,728
CpG3	0,029 (0,055)	0,032 (0,052)	0,737
CpG4	0,013 (0,034)	0,024 (0,053)	0,343
CpG5	0,019 (0,045)	0,033 (0,053)	0,102
CpG6	0,025 (0,044)	0,040 (0,069)	0,303
CpG7	0,029 (0,052)	0,019 (0,050)	0,144
CpG8	0,037 (0,064)	0,028 (0,051)	0,558
CpG9	0,017 (0,040)	0,024 (0,055)	0,726
CpG10	0,019 (0,050)	0,034 (0,058)	0,097
CpG11	0,012 (0,033)	0,019 (0,045)	0,520
CpG12	0,030 (0,052)	0,040 (0,059)	0,374
CpG13	0,014 (0,041)	0,031 (0,052)	0,041*
CpG14	0,012 (0,033)	0,027 (0,050)	0,106
CpG15	0,009 (0,030)	0,027 (0,045)	0,020*
CpG16	0,012 (0,034)	0,035 (0,053)	0,017*
CpG17	0,030 (0,059)	0,031 (0,056)	0,695
CpG18	0,023 (0,048)	0,037 (0,070)	0,385
CpG19	0,033 (0,053)	0,040 (0,065)	0,743
CpG20	0,019 (0,041)	0,034 (0,060)	0,284
CpG21	0,021 (0,042)	0,051 (0,063)	0,008*
CpG22	0,010 (0,037)	0,021 (0,047)	0,141
CpG23	0,018 (0,044)	0,043 (0,071)	0,066
CpG24	0,025 (0,048)	0,034 (0,054)	0,255
CpG25	0,027 (0,055)	0,023 (0,043)	0,907
CpG26	0,023 (0,043)	0,029 (0,051)	0,579
CpG27	0,037 (0,081)	0,038 (0,051)	0,225
CpG28	0,019 (0,040)	0,027 (0,050)	0,443
CpG29	0,031 (0,047)	0,031 (0,063)	0,490
CpG30	0,028 (0,056)	0,033 (0,056)	0,518
CpG31	0,026 (0,064)	0,029 (0,050)	0,420
CpG32	0,019 (0,045)	0,030 (0,059)	0,351
CpG33	0,016 (0,043)	0,034 (0,062)	0,105
CpG34	0,033 (0,052)	0,027 (0,046)	0,630
CpG35	0,039 (0,065)	0,048 (0,066)	0,419
CpG36	0,025 (0,044)	0,042 (0,068)	0,251
CpG37	0,013 (0,035)	0,030 (0,058)	0,107

Média de todos CpGs	0,023 (0,011)	0,032 (0,015)	0,002*
Média dos CpG19 –CpG37	0,024 (0,013)	0,034 (0,017)	0,005*

N: Número amostral; DP: desvio padrão; PEP: primeiro episódio psicótico; MW: teste Mann-Whitney; *p<0,05

3.3 Discussão

O uso de pacientes virgens de tratamento na busca de marcadores para a patogênese da esquizofrenia reduz o viés do efeito do antipsicótico na expressão gênica e permite investigar a influência desses medicamentos na doença. De Jong et al. (2012), investigando a expressão de milhares de genes em sangue periférico de portadores de esquizofrenia por meio de *arrays*, identificaram 12 módulos de co-expressão gênica associados com a doença. Entretanto, muitos deles pareciam refletir o efeito de antipsicóticos e apenas dois módulos foram replicados em uma amostra de 29 pacientes sem tratamento e 40 controles. Um deles apresentava um enriquecimento em genes expressos no cérebro, incluindo o gene *COMT*. Assim, o fato de 10 dos 12 módulos não estarem associados na amostra de replicação indica que a medicação antipsicótica parece ter grandes efeitos na expressão gênica em sangue, e assim, esse fator deve ser considerado nesse tipo de estudo (de Jong et al, 2012), ressaltando o valor do presente estudo.

Os achados do estudo até o momento são originais e as funções biológicas dos genes concordam com a patogênese da doença e com o mecanismo de ação dos antipsicóticos. O gene *GCH1* apresentou-se subexpresso e os genes *MBP* e *NDEL1* superexpressos em PEP quando comparado ao grupo controle. Já a comparação entre pacientes antes e após o tratamento identificou uma subexpressão do gene *GABRR2* após a administração de antipsicóticos. Essa diferença parece se acentuar quando comparamos os pacientes que responderam ao tratamento aos controles.

A discussão de cada gene encontra-se abaixo.

3.3.1 *GCH1* (GTP cyclohydrolase 1)

Quanto ao gene *GCH1*, encontramos uma redução de expressão significativa, em pacientes PEP virgens de tratamento quando comparados aos controles. Embora não significante após a correção para múltiplas comparações, observamos uma correlação negativa entre a expressão gênica e as escalas PANSS de psicopatologia geral e a PANSS total. Isso indica que quanto menor a expressão, mais sintomas (pior sintomatologia), corroborando os resultados da comparação entre casos e controles, em que foi encontrada uma menor expressão de *GCH1* nos pacientes em PEP. Quanto à análise de epigenética, foram encontrados quatro sítios hipermetilados, além de um aumento da média da metilação

dos 37 sítios e da média entre os CpG19-CpG37 em PEP. Isso concorda com os dados de expressão, uma vez que geralmente uma hipermetilação no promotor do gene está associada a uma redução de expressão do gene. Contudo, após a correção de Bonferroni, esses resultados não foram significantes.

Além disso, observamos que se compararmos os dados de controles e pacientes após o tratamento, eles tendem à significância, indicando que a expressão de *GCH1* poderia servir como um marcador de traço e não apenas de estado. Isso também sugere que a administração de antipsicóticos atenua a diferença de expressão desse gene, mostrando a importância da avaliação de pacientes virgens de tratamento.

O gene *GCH1* contém seis éxons e codifica uma enzima que controla uma etapa limitante para a biossíntese de tetrahydrobiopterina (BH4). O BH4 é um cofator essencial para a fenilalanina hidroxilase, a tirosina hidroxilase, a triptofano hidroxilase e o óxido nítrico sintase, que por sua vez estão envolvidos na produção de dopamina, serotonina e óxido nítrico (Figura 14), além de participar na liberação de glutamato. Sabe-se que esses quatro neurotransmissores estão envolvidos na patogênese da esquizofrenia (Figura 15), o que ressalta a importância dos nossos achados com o gene *GCH1*.

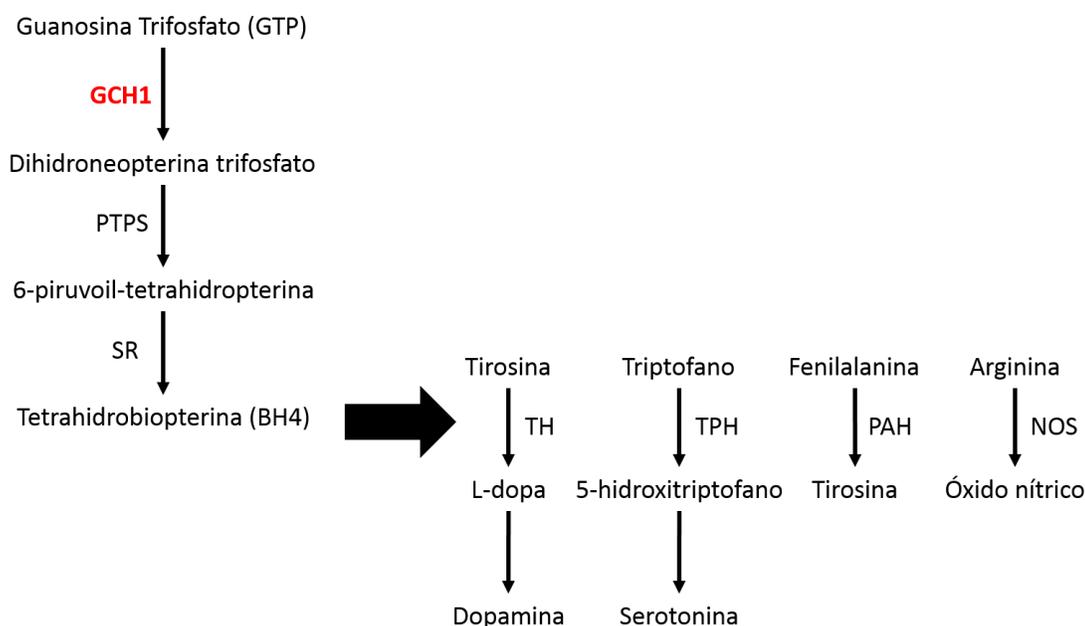


Figura 14. Envolvimento do GCH1 na biossíntese da dopamina, serotonina e óxido nítrico. GCH1, GTP ciclodrolase 1; PTPS, 6-piruvil-tetrahydropterina sintase; SR, sepiapterina redutase; TH, tirosina hidroxilase; TPH, triptofano hidroxilase; PAH, fenilalanina hidroxilase; NOS, óxido nítrico sintase. Adaptado de Sadahiro et al, 2011 (Sadahiro et al, 2011).

Estudos *in vivo* mostraram que camundongos deficientes em *Gch1* apresentavam menores níveis de BH4, dopamina, serotonina e norepinefrina no cérebro (Hyland et al, 2003) e de óxido nítrico no plasma (Lam et al, 2007).

Mutações no gene *GCH1* podem levar à Distonia Responsiva à Levodopa (DRD), também conhecida como síndrome de Segawa, e também a outros sintomas como uma deficiência intelectual grave, convulsões, tônus muscular e movimentos anormais (Kim et al, 2008). Pacientes com DRD também apresentam diversos sintomas psicológicos, como depressão e transtorno obsessivo-compulsivo (Doehring et al, 2008; Gordon, 2008), sugerindo uma participação do gene *GCH1* nas funções mentais e no comportamento. Entretanto, apesar de parecer ter um papel biológico fundamental em vias envolvidas na esquizofrenia, apenas um estudo (Kealey et al, 2005) investigou esse gene em distúrbios psicóticos. Kealey et al (2005), por meio de um estudo de ligação e de associação gene-candidato, relataram a presença de um *locus* de suscetibilidade para distúrbio bipolar na região 14q22-24 e sugeriram o gene *GCH1*, como candidato.

Além disso, outro fator que sugere a participação do *GCH1* na patogênese da esquizofrenia é a observação de que esse gene, em ratos, parece ser controlado pelo fator de transcrição ATF4 (Kapatos et al, 2000), que por sua vez se liga ao DISC1 (*Disrupted in schizophrenia 1*) (Morris et al, 2003), uma proteína amplamente investigada em esquizofrenia e que participa no neurodesenvolvimento (Carter, 2007).

Já o envolvimento do BH4 nos distúrbios psiquiátricos é mais investigado do que o envolvimento de *GCH1*. Déficits nos níveis plasmáticos de biopterina (uma medida de BH4) já foram observados em pacientes com esquizofrenia, doença esquizoafetiva e distúrbio bipolar (Richardson et al, 2007). Além disso, Choi & Tarazi (2010) sugeriram que o BH4 pode representar o elo que conecta as disfunções dopaminérgicas, serotoninérgicas e glutamatérgicas envolvidas na fisiopatologia da esquizofrenia (Figura 15) (Choi, Tarazi, 2010).

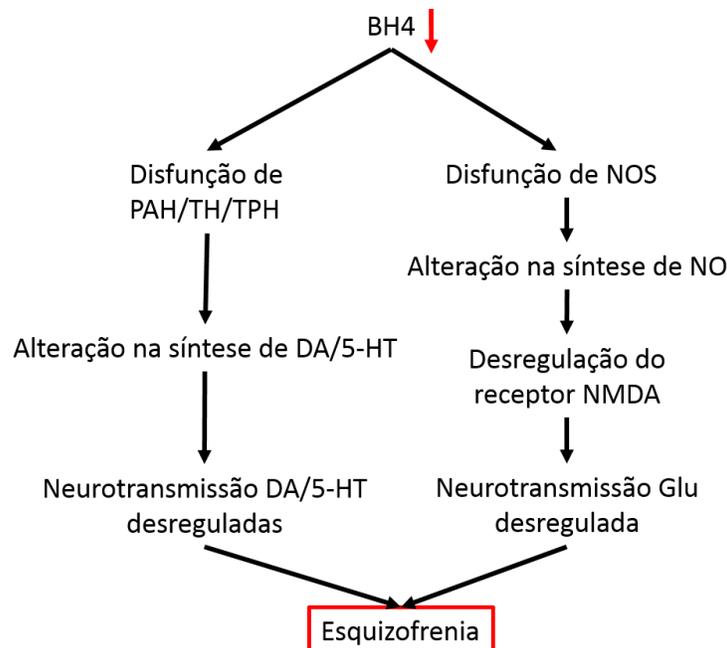


Figura 15. Hipótese da deficiência de BH4 na esquizofrenia; TH, tirosina hidroxilase; TPH, triptofano hidroxilase; PAH, fenilalanina hidroxilase; NOS, óxido nítrico sintase; NO, óxido nítrico; DA, dopamina; 5-HT, serotonina; NMDA, N-methyl-D-aspartate; Glu, glutamato. Adaptado de Choi & Tarazi, 2010 (Choi, Tarazi, 2010).

Apesar da relevância dos nossos resultados, serão necessários outros estudos para que possamos afirmar que esses achados em sangue refletem uma hipofunção das vias dopaminérgicas, serotoninérgicas e glutamatérgicas em cérebro, uma vez que a ativação também depende da região cerebral. Além disso, devemos considerar a complexidade da neurotransmissão cerebral, além das correlações entre sangue-cérebro. Considerando apenas os estudos de expressão em sangue, diversos trabalhos relataram uma superexpressão de genes dopaminérgicos e serotoninérgicos (Wang et al, 2010a; Buttarelli et al, 2011; Liu et al, 2013b); e assim, permitem o levantamento de uma hipótese alternativa em que a hipoexpressão de *GCH1* poderia ser um reflexo de uma hiperfunção dopaminérgica por meio de um *feedback* negativo.

Além da via BH4, outro mecanismo que pode estar envolvido na relação entre o gene *GCH1* e a esquizofrenia é a interação entre as enzimas GCH1 e VLCAD (*very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*) em mitocôndrias (Du et al, 2012a). Alterações em VLCAD estão associadas com a produção de estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (Kabuyama et al, 2010). Du et al. (2012) sugeriram que, uma vez que essas duas enzimas

estão associadas, GCH1 também pode regular o metabolismo de ácidos graxos e exercer um efeito protetor para reduzir o estresse oxidativo originado na mitocôndria, que por sua vez também parece estar alterado na esquizofrenia (Bitanhirwe , Woo, 2011).

Dessa forma, o presente estudo identificou um gene muito pouco descrito como envolvido na patogênese de distúrbios psicóticos, embora tenha uma função importante e totalmente condizente com a patogênese dessas doenças. Assim, é possível que uma redução na expressão de *GCH1* possa induzir déficits na síntese de BH4, levando à psicose, como indicado na Figura 15, e/ou também gerar mais estresse oxidativo via interação com VLCAD levando à maior suscetibilidade à doença.

3.3.2 *GABRR2* (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 2)

Quanto ao gene *GABRR2*, encontramos uma redução de expressão significativa, em pacientes após o tratamento quando comparados a pacientes antes do tratamento. Interessantemente, quando comparamos respondedores, não-respondedores e controles, observamos que os primeiros apresentam uma menor expressão de *GABRR2* quando comparados aos controles. Essa diferença também ocorre entre os não-respondedores e controles, embora de forma menos acentuada. Além disso, parece existir uma correlação negativa entre os valores de ΔCt de *GABRR2* e os escores da PANSS negativa, de psicopatologia geral e total após o tratamento com risperidona, embora esses dados não tenham se mantido significantes após a correção por Bonferroni. Isso parece indicar que os pacientes com menores níveis de *GABRR2* em sangue apresentam sintomas menos graves e uma melhor resposta ao tratamento.

Diversos estudos de neurociência básica e clínica sugerem uma função do GABA na patogênese da esquizofrenia (Du et al, 2008). Dentre os receptores de GABA, estão os GABA-A, que são receptores do tipo canal iônico formados por complexos pentaméricos formados pelas subunidades α , β , γ , δ , ε , π e/ou ρ (Enoch, 2008). O gene *GABRR2*, localizado em 6q14, codifica a subunidade $\rho 2$ do receptor GABA-A e é expresso no cérebro, em regiões como o cortex prefrontal, hipocampo e cerebelo (Boue-Grabot et al, 1998; Alakuijala et al, 2005). Polimorfismos nesse gene foram associados com dependência de álcool (Zhao et al, 2006) e autismo (Magri et al, 2006).

Poucos estudos têm sugerido o envolvimento de *GABRR2* na psicose. Uma metanálise observou uma associação do polimorfismo rs12201676, localizado entre os genes *GABRR1* e *GABRR2* com a esquizofrenia e transtorno bipolar (Wang et al, 2010b). Adicionalmente, um outro polimorfismo localizado em *GABRR2* (rs1570932) foi associado com um componente do fenótipo bipolar (sintomas psicóticos) (Breuer et al, 2011). Um estudo de expressão observou um aumento nos níveis de RNAm e proteína de *GABRR2* no cerebelo lateral de pacientes com transtorno bipolar quando comparados aos controles; e de apenas RNAm na região cerebral *Brodmann area 9* (BA9) (Fatemi et al, 2013). Além disso, esse mesmo estudo observou um aumento nos níveis protéicos de *GABRR2* em depressão maior, indicando que essas alterações em *GABRR2* possam ser exclusivas de transtornos do humor, uma vez que eles não detectaram diferenças em pacientes com esquizofrenia.

Assim, embora esses estudos indiquem uma participação desse gene em doenças mentais, nenhum trabalho além dos dois do nosso grupo investigou este gene quanto ao efeito de antipsicóticos (Ota et al, 2013; Ota et al, 2014).

Embora a risperidona não apresente afinidade por receptores GABAérgicos, alguns estudos sugerem uma influência dos antipsicóticos sobre essa via (Gunne et al, 1984; Kikumoto et al, 1993; Grimm, See, 1998). Um estudo, avaliando os efeitos do tratamento com risperidona, observou uma redução nos níveis plasmáticos de GABA em portadores de esquizofrenia comparados com controles e uma diminuição não significativa ao longo do tratamento (em diferentes tempos) (Cai et al, 2010b). Esses resultados sugerem que a risperidona pode reduzir os níveis de GABA, corroborando os nossos dados em que observamos uma redução da expressão de um receptor GABAérgico em sangue periférico.

É possível que a conexão entre a administração da risperidona e a redução de expressão de *GABRR2* também se dê por via do receptor de dopamina D2, que por sua vez, alteraria outros fatores subjacentes, como a beta-arrestina 1 e a CREB, como mostra a Figura 16. Entretanto, como a expressão de *DRD2* é baixa em sangue periférico, não foi possível avaliá-la no presente estudo, embora ela pareça estar alterada em outros estudos (Kurian et al, 2011).

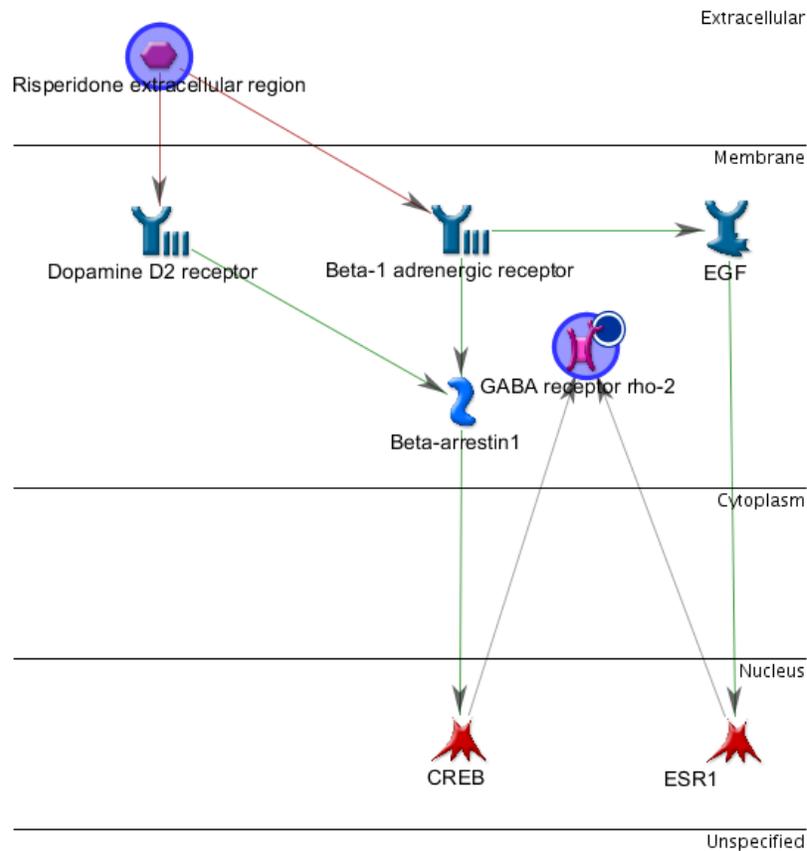


Figura 16. Análise de redes pelo *software* Metacore.

Quando comparamos os valores de ΔC_t de *GABRR2* após o tratamento entre PEP e controles, observamos que essa diferença se deve principalmente aos que respondem ao tratamento. Parece que os respondedores são os que apresentam níveis mais reduzidos de *GABRR2*.

Embora não pareça haver uma correlação entre a dose da risperidona e os níveis de *GABRR2* ($p=0,509$), é possível que apenas a administração deste antipsicótico por si leve a uma redução na expressão de *GABRR2*, alterando seus valores quando comparado tanto aos controles quanto à situação pré-tratamento. A menor expressão de *GABRR2* indicaria uma boa resposta ao medicamento, podendo ser utilizado como um marcador de estado do paciente e de resposta ao tratamento.

3.3.3 Gene MBP (*myelin basic protein*)

O gene *MBP* mostrou-se superexpresso em PEP virgens de tratamento quando comparados aos controles. Após dois meses de tratamento, os níveis de *MBP* reduziram, não sendo mais diferente entre casos e controles, embora a análise pareada não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 7). Após um ano de tratamento, as médias de expressão de *MBP* pareceram retornar aos níveis pré-tratamento, sendo diferentes quando comparadas aos controles. Embora o tamanho amostral de pacientes após um ano de tratamento seja muito reduzido, esses achados poderiam indicar uma leve melhora após o início do tratamento. Porém, com a evolução da doença, os níveis de *MBP* retornam aos altos níveis dos pacientes em psicose antes do tratamento.

No sistema nervoso central (SNC) da maioria dos vertebrados, os oligodendrócitos revestem os axônios neuronais com extensões da sua membrana plasmática para formar a bainha de mielina, a qual melhora a comunicação neuronal ao aumentar a velocidade de propagação de impulso. Diversas proteínas são encontradas na mielina, sendo a MBP (Muller et al, 2013) a segunda proteína mais abundante na mielina do SNC, após a proteína PLP (não expressa em nossa amostra), compreendendo 30% da proteína total (Boggs, 2006). Sugere-se que defeitos no isolamento de mielina podem levar à redução da propagação de impulsos nervosos, comprometendo funções neuronais e gliais (Martins-de-Souza, 2011).

A MBP é essencial para a formação da mielina do SNC, sendo referida como a “molécula executiva da mielina” (Boggs, 2006), uma vez que camundongos *Shiverer* e ratos *long evans shaker*, que apresentam mutações e deleções no gene, apresentam uma hipomielinização no SNC e morrem precocemente (Readhead, Hood, 1990; Kwiecien et al, 1998). Ela encontra-se ligada à superfície citosólica da membrana do oligodendrócito. Devido à sua carga positiva, a MBP associa-se com os fosfolipídios oligodendrogliais (com carga negativa), auxiliando na compactação das membranas da mielina (Muller et al, 2013). A MBP é transportada do citoplasma para as regiões distais do oligodendrócito por meio de microtúbulos na forma de RNAm, a tradução é reprimida durante esse transporte e iniciada em local e tempo específicos (Muller et al, 2013). Além disso, ela parece exercer outras funções como estruturais, ao interagir com proteínas do citoesqueleto e influenciar na sua agregação e polimerização (Dyer et al, 1994; Hill, Harauz, 2005; Hill et al, 2005), e nas vias

de sinalização (Smith et al, 2011), como a do cálcio, podendo assim estar envolvida no processo de morte celular (Iwata et al, 2013).

A variedade de proteínas MBP no SNC é grande, uma vez que existem diversas variantes de *splicing* sendo expressas além de muitas modificações pós-traducionais na proteína. As MBPs mais encontradas no SNC são codificadas pelo gene *MBP* clássico. Entretanto outros transcritos relacionados à MBP também estão presentes na medula óssea, sangue e sistema imune, sendo derivados de um gene *MBP* longo (também conhecido como *Golli-MBP*) que contém três éxons adicionais a montante (*upstream*) dos éxons do gene *MBP* clássico (Marty et al, 2002). Assim, o *splicing* alternativo desse gene gera dois grupos de transcritos MBP, sendo que os RNAm *Golli-MBP* contém 3 exons únicos que não estão contidos no *MBP* clássico.

O gene *MBP* humano localiza-se na região cromossômica 18q23 e sua sequência é altamente conservada em vertebrados (Harauz et al, 2004). Em estudos animais, ratos tratados com metanfetamina, uma substância que induz sintomas semelhantes aos sintomas positivos da esquizofrenia por um aumento na liberação de dopamina, apresentam um aumento na expressão de *Mbp* no córtex cerebral (Ouchi et al, 2005). Por outro lado, em outro modelo animal foi observado uma redução da expressão desse gene em cérebros de camundongos expostos ao vírus influenza na fase pré-natal, um modelo que apresenta alterações comportamentais associadas à esquizofrenia e autismo (Fatemi et al, 2005).

Estudos de expressão de RNAm e proteínas em tecidos cerebrais *post-mortem* de diferentes regiões cerebrais sugerem que a MBP está reduzida em pacientes com esquizofrenia (Tkachev et al, 2003; Martins-de-Souza et al, 2009a; Martins-de-Souza et al, 2009b; Parlapani et al, 2009; Martins-de-Souza, 2010; Matthews et al, 2012). Além disso, a MBP é um marcador conhecido para doenças neurodegenerativas, tais como esclerose múltipla (Lieberman, 1999), mostrando a importância do seu papel em doenças mentais.

Em tecido periférico, reduções nos níveis de MBP no soro de portadores de esquizofrenia já foi relatado anteriormente (Xiong et al, 2014), embora outros estudos não tenham encontrado diferenças significantes (Steiner et al, 2006).

Em um estudo combinando dados genômicos, dados de expressão gênica e dados funcionais buscando identificar genes candidatos para a esquizofrenia, o gene *MBP* apresentou destaque (Ayalew et al, 2012). Nesse estudo, Ayalew et al. (2012) usaram dados

publicados de GWAS, integrando com dados de expressão gênica em tecidos humanos (provenientes de cérebro *post-mortem*, células neuronais derivadas de células tronco pluripotentes induzidas e sangue), dados de expressão em modelos animais, além de outros dados genéticos (como CNVs).

Entretanto, como referido nos próprios trabalhos (Martins-de-Souza et al, 2009b), o problema de se estudar tecidos *post-mortem* em esquizofrenia é lidar com o fato de que os pacientes que têm um longo tempo de doença apresentam maior comprometimento e longos períodos de tratamento com antipsicóticos. Por exemplo, Sugai et al. (2004), utilizando *arrays* de cDNA em amostras de macacos cinomolgos, observaram que o tratamento por 3 meses com haloperidol influenciava a expressão de genes relacionados à glia, de resposta ao estresse e de receptores e enzimas de neurotransmissores (Sugai et al, 2004). Além disso, Narayan et al. (2007), por meio de análise de hibridação *in situ* em camundongos, observaram que a expressão de *MBP* diminuiu em diferentes regiões cerebrais com a administração de haloperidol (Narayan et al, 2007). Assim, os dados que observaram uma redução de expressão de *MBP* poderiam estar associados mais ao tratamento do que à doença em si. Desta forma, como ressaltado neste estudo, uma das vantagens em se estudar tecido periférico é a possibilidade de coletar amostras de forma prospectiva e antes da administração de antipsicóticos.

Contudo, estudos de expressão gênica em sangue apresentaram resultados controversos, o que pode ser devido à expressão diferencial entre as isoformas (Tkachev et al, 2003; Matthews et al, 2012). Gutierrez-Fernandez et al. (2010), por exemplo, investigaram a expressão de *MBP* por PCR em tempo real em sangue de: 34 pacientes em PEP virgens de antipsicótico com diagnóstico de esquizofrenia, dos quais 20 foram avaliados após um ano de tratamento; 19 pacientes em PEP virgens de antipsicótico com diagnóstico de transtorno bipolar, dos quais 12 foram reavaliados após um ano de tratamento, e 45 controles saudáveis, e não identificaram diferenças significantes na expressão deste gene ao comparar os grupos (Gutierrez-Fernandez et al, 2010).

Dois estudos de *microarray* em amostras de sangue observaram diferenças opostas na expressão de *MBP*. Um deles investigou 8 portadores de esquizofrenia, 12 irmãos não-afetados destes portadores e 12 controles, e observou uma redução da expressão em *MBP* comparando portadores da doença com controles, e também comparando os irmãos não-

afetados e controles (Glatt et al, 2011). Mais semelhante ao nosso estudo, Kumarasinghe et al. (2013) investigaram 10 pacientes com esquizofrenia virgens de tratamento e observaram um aumento na expressão de *MBP* nos casos quando comparados a 11 indivíduos saudáveis, sendo que após 6-8 semanas de tratamento com risperidona ou haloperidol ela retornou aos níveis observados nos controles (Kumarasinghe et al, 2013). Nosso estudo corrobora parcialmente esses achados, uma vez que também encontramos um aumento na expressão de *MBP* em PEP quando comparado aos controles. Entretanto, embora tenhamos encontrado diferenças na expressão deste gene após 1 ano de tratamento, não encontramos diferenças quando analisamos os pacientes em um período mais curto, após 2 meses de tratamento.

Além disso, encontramos uma redução na expressão de *DISC1*, um gene associado à esquizofrenia em múltiplos estudos. Ele foi o terceiro gene mais significativo em nossas análises, embora não tenha mantido sua significância estatística após a correção para múltiplas comparações. Recentemente, Hattori et al. (2014) observaram que a expressão de *DISC1* regula a diferenciação dos oligodendrócitos. A superexpressão de *DISC1* em células precursoras de oligodendrócitos de ratos levou a uma redução nos níveis de RNAm e proteína de *MBP* e *CNP*. Paralelamente, a hipoexpressão de *DISC1*, ou a superexpressão de *DISC1* truncada (que exerce uma função dominante negativa, competindo com a forma original) gerava um aumento de *CNP* e *MBP* (Hattori et al, 2014). Isso é condizente com os nossos achados, em que encontramos relações opostas entre a *MBP* (*fold change*= 1,366) e *DISC1* (*fold change*= 0,818).

3.3.4 Gene *NDEL1* (*nudE neurodevelopment protein 1-like 1*)

Encontramos uma correlação positiva entre a *NDEL1* e a *MBP*, indicando que o aumento na expressão encontrada em PEP pode refletir um possível processo comum, ou funções convergentes, como a relação desses genes com o neurodesenvolvimento. A expressão da *NDEL1* também mostrou-se aumentada em pacientes em PEP, diminuindo após o tratamento com risperidona e retornando aos níveis observados em controles.

NDEL1 é uma proteína de 345 aminoácidos com uma sequência altamente conservada, sendo que homólogos foram identificados em espécies não mamíferas, tais

como fungos e peixes (Chansard et al, 2011). Dentre as funções da NDEL1 estão as suas participações na organização do citoesqueleto, transporte intracelular, tráfico de membrana, reações enzimáticas e sinalização celular (Liang et al, 2004; Nguyen et al, 2004; Shu et al, 2004; Guerreiro et al, 2005; Hayashi et al, 2005; Guo et al, 2006; Kamiya et al, 2006; Liang et al, 2007; Mori et al, 2007; Shen et al, 2008; Shim et al, 2008; Toth et al, 2008; Yamada et al, 2008; Ma et al, 2009; Mori et al, 2009; Zhang et al, 2009). O gene *NDEL1* localiza-se no cromossomo 17p13.1 e a expressão dele no cérebro humano é relativamente alta e estável ao longo do tempo (medido de 50 – 30000 dias, dados do *Human Brain Transcriptome project* (Kang et al, 2011)) (Bradshaw et al, 2013). As pesquisas sobre a NDEL1 foram intensificadas com a descoberta da sua interação com outras proteínas importantes para algumas doenças, tais como a LIS1 (Reiner, 2000; Reiner et al, 2002), uma proteína mutada na lisencefalia (uma doença que afeta o desenvolvimento cortical), e a DISC1, que, como citado anteriormente, tem sido fortemente associada a doenças mentais, principalmente esquizofrenia e transtorno bipolar. A LIS1 é codificada pelo gene *PAFAH1B1*, que não apresentou diferenças de expressão em nossa amostra, e a DISC1 pelo gene *DISC1*, que embora não diferente estatisticamente após a correção de Bonferroni, mostrou-se hipoexpressa em PEP quando comparado aos controles.

Ao participar no remodelamento do citoesqueleto, a NDEL1 controla processos celulares chaves em células mitóticas (como a maturação do centrossomo, orientação das fibras do fuso e neurogênese) e em neurônios pós-mitóticos (como migração neuronal, crescimento de neuritos e manutenção neuronal). Esse papel da NDEL1 na proliferação e sobrevivência celular é sugerida pelo fato de que a perda completa de *Ndel1* em camundongos *knockout* é letal e também porque existe uma falha de crescimento dos blastocistos que não expressam esse gene (Sasaki et al, 2005). Essas funções no transporte celular, mitose e migração neuronal também são parte do controle da atividade da dineína pelo complexo Lis1-Ndel1-Nde1. Essa regulação é muito tênue, sendo que modificações pós-traducionais podem gerar grandes efeitos. Por exemplo, a fosforilação da NDEL1 é requerida para a função e migração neuronal (Niethammer et al, 2000; Toyooka et al, 2003; Taya et al, 2007) assim como para o ciclo celular (Toyooka et al, 2005; Mori et al, 2007), e a palmitoilação de NDEL1 interfere na atividade da dineína, controlando a migração neuronal (Shmueli et al, 2010).

Ao longo da maturação cerebral, a expressão de Ndel1 parece aumentar progressivamente (Niethammer et al, 2000), indicando um papel importante da proteína em neurônios em diferenciação. Além disso, estudos que induziram a redução dos níveis desta proteína, observaram defeitos na migração cortical (Shu et al, 2004; Sasaki et al, 2005; Toyo-Oka et al, 2005; Youn et al, 2009), semelhante aos neurônios com expressão reduzida de Lis1, levando a um afinamento do córtex (Toyo-Oka et al, 2005). Devido ao seu envolvimento com a organização do citoesqueleto, a NDEL1 também é importante para o crescimento de neuritos e dentre as proteínas que interagem com NDEL1 para esse processo está a DISC1. A *DISC1* foi primeiramente caracterizada como um gene rompido pela translocação balanceada entre os cromossomos 1 e 11, t(1;11)(q42;q14), que cossegregava com os sintomas de esquizofrenia e transtorno bipolar em uma família escocesa (Millar et al, 2000). Essa translocação gera uma proteína DISC1 truncada sem uma porção da região C-terminal, levando à perda do domínio crítico de ligação com a NDEL1. A interação da DISC1 e NDEL1 é crítica para o crescimento de neuritos, sendo que a expressão delas está aumentada durante esse processo na diferenciação e a interferência na ligação entre elas suprime o crescimento (Ozeki et al, 2003; Kamiya et al, 2006).

Além da participação no remodelamento do citoesqueleto, a NDEL1 também parece estar envolvida na sinalização intracelular da cascata AMP cíclico (AMPC) / proteína kinase A (PKA) (Millar et al, 2004; Murdoch et al, 2007; Collins et al, 2008) e da proteína kinase B (AKT) / glicogênio sintase kinase (GSK) (Kim et al, 2009), sendo que a interação entre NDEL1 e DISC1 parece ter envolvimento nestes processos.

A NDEL1 é a mesma proteína que a endo-oligopeptidase A, inicialmente isolada do cérebro de coelhos devido a sua habilidade de inativar peptídeos bioativos como a bradicinina e neurotensina (Camargo et al, 1983). O sítio ativo da NDEL1 contém um resíduo de cisteína na posição 273, próximo ao sítio de ligação da DISC1 em 266/267. Interessantemente, a atividade enzimática da NDEL1 parece estar relacionada com o crescimento de neuritos, uma vez que a superexpressão da NDEL1 mutada sem atividade catalítica não é capaz de recuperar o fenótipo em células deficientes em NDEL1, ao contrário da não-mutada, embora ela ainda seja capaz de se ligar a DISC1, LIS1 e dineína. Isso indica a importância da atividade enzimática da NDEL1, que pode ser tão significativa para o crescimento de neuritos quanto a sua mera interação com outras proteínas (Hayashi

et al, 2010). Entretanto, a atividade enzimática da NDEL1 é inibida pela DISC1 (Hayashi et al, 2005) e tanto a interação DISC1-NDEL1 quanto a atividade de endooligopeptidase da NDEL1 são necessárias para o crescimento de neuritos. Hayashi et al. (2010) sugeriram que esta aparente discrepância poderia ser explicada por um processo de duas etapas, em que primeiro ocorreria uma interação entre DISC1 e NDEL1, que seria necessária para o transporte da NDEL1 para a sua localização subcelular; e em seguida ocorreria uma dissociação desse complexo, permitindo que a atividade enzimática da NDEL1 clive os substratos relevantes e contribua para a neuritogênese. Como mostrado anteriormente, identificamos uma redução da expressão de *DISC1*, embora não significativa após a correção de Bonferroni, ao contrário da expressão de *NDEL1* que se mostrou elevada em PEP.

A atividade enzimática da NDEL1 parece clivar diversos neuropeptídeos e dentre eles a neurotensina, que parece estar diminuída em portadores de esquizofrenia e aumentada em tratamento com antipsicóticos (Binder et al, 2001). Isso corrobora os nossos achados, uma vez que poderíamos sugerir que o aumento da expressão de *NDEL1* em PEP poderia gerar uma redução de neurotensina, e o tratamento com risperidona poderia reduzir a expressão desse gene, gerando um aumento desse substrato.

Quanto aos estudos genéticos, interações entre os genes *DISC1* e *NDEL1* já foram observadas, corroborando os achados a níveis proteicos, tendo sido associadas a fenótipos da esquizofrenia (Burdick et al, 2008; Nicodemus et al, 2010). Lipska et al. (2006) demonstraram que a expressão de *NDEL1* estava reduzida no hipocampo de portadores de esquizofrenia (Lipska et al, 2006). Mais recentemente, um estudo mostrou uma atividade reduzida desta enzima em plasma de portadores de esquizofrenia crônica quando comparados a indivíduos saudáveis, sendo que os pacientes refratários ao tratamento apresentavam uma maior diminuição do que os não-refratários (Gadelha et al, 2013). Contudo, é importante destacar que Lipska et al. (2006) avaliaram tecidos cerebrais *post-mortem* e Gadelha et al. (2013) investigaram a atividade enzimática da NDEL1 e não a expressão gênica. Ambos os resultados também podem ser causados pelo tratamento ou tempo de doença longos, uma vez que avaliaram pacientes com esquizofrenia crônica. Os nossos achados indicam uma redução na expressão de *NDEL1* após o tratamento, sugerindo que a risperidona possa interferir nos níveis dessa proteína no sangue. A

avaliação da atividade enzimática de NDEL1 nos pacientes em PEP poderá auxiliar no melhor entendimento dessa proteína na psicose.

ESTUDO II: Análise funcional do gene *MBD5*: Caracterização da importância biológica de um gene no neurodesenvolvimento

4 ESTUDO II: ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *MBD5*: CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DE UM GENE NO NEURODESENVOLVIMENTO

4.1 Apresentação

Embora o foco da presente tese tenha sido a investigação da expressão gênica em PEP e esquizofrenia, o estudo das interações entre genes, principalmente relacionados ao neurodesenvolvimento, também era de nosso interesse, assim como o efeito funcional de um gene com expressão alterada na doença. Assim, de forma a complementar o estudo I, realizamos uma análise em linhagens de células progenitoras de neurônios de forma a compreender melhor o papel de determinados genes no neurodesenvolvimento.

Para que futuramente seja possível realizar análises funcionais de genes diferencialmente expressos, como os observados nos estudos Ia e Ib em nosso laboratório no Brasil, a aluna realizou um período de doutorado sanduiche, onde aprendeu e realizou técnicas para análise funcional do gene *MBD5* em células progenitoras neuronais no laboratório *McGill Group for Suicide Studies* da McGill University, Canadá, sob supervisão do Prof. Dr. Gustavo Turecki. Esta etapa do estudo foi realizada com Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE): processo 2013/11781-3, e contou com a colaboração da Dr^a. Carolina Giguek, da Prof.^a Dr^a Elizabeth Chen, e do Prof. Dr. Carl Ernst.

4.2 Introdução

Diversos genes implicados na esquizofrenia também foram associados a outras doenças do neurodesenvolvimento como autismo e deficiência intelectual, principalmente em estudos que investigaram variantes raras, tais como algumas CNVs (Kavanagh et al, 2014). Isso sugere que mudanças sutis na dosagem gênica poderiam influenciar no neurodesenvolvimento (Malhotra , Sebat, 2012).

Alguns estudos indicam que mutações em genes que interferem no crescimento do cérebro podem participar da etiologia dessas três doenças, uma vez que rearranjos nas regiões 1q21.1 e 16p11.2 parecem estar relacionados ao tamanho do cérebro, à esquizofrenia, autismo e deficiência intelectual (McCarthy et al, 2009; Malhotra , Sebat, 2012; Ahn et al, 2014).

O gene *MBD5* (*methyl-CpG binding domain protein 5*) vinha sendo estudado no grupo do Prof. Gustavo Turecki por três motivos: 1) ele parece estar associado à metilação de DNA, objeto de estudo no laboratório; 2) ele havia sido implicado em deficiência intelectual, epilepsia e doenças do espectro autista em um estudo anterior do grupo (Talkowski et al, 2011); e 3) poucos estudos na literatura investigaram a função desse gene.

Ao buscarmos pelo termo *MBD5* no Pubmed, estavam disponíveis, no momento da busca (Dezembro de 2014), apenas 39 artigos, sendo que 19 deles associaram o gene a doenças do neurodesenvolvimento. Dentre estes estudos, 17 identificaram deleções ou mutações em *MBD5* e dois observaram duplicações. Assim, o objetivo principal deste estudo foi identificar os efeitos da redução da expressão de *MBD5* em células progenitoras de neurônios.

A proteína *MBD5* é um membro da família *MBD* (domínio de ligação a metil-CpG) caracterizado por uma região de 70 aminoácidos que parecem mediar a associação a resíduos metilados. A família *MBD* é composta por *MBD1-6* bem como a *MeCP2*, cujas mutações causam a síndrome de Rett (Amir et al, 1999), sendo que todos os membros dessa família compartilham os 70 aminoácidos do domínio *MBD*. Essa região associa-se com o DNA de acordo com o grau de metilação de CpG e as diferenças entre os membros da família residem no grau em que se associam com o DNA a sítios não-CpGs (Baubec et al, 2013). A proteína *MBD5* também contém um domínio *PWWP* (pro-trp-trp-pro), importante para a divisão, crescimento e diferenciação celulares (Stec et al, 2000; Wu et al, 2011).

Camundongos *knockout* para o gene *Mbd5* apresentaram retardo no crescimento pós-natal (Du et al, 2012b). Embora eles apresentassem o tamanho normal ao nascimento, após o parto, deixaram de crescer e de se desenvolver e morreram após 0-22 dias. Camundongos heterozigotos não apresentaram um fenótipo marcante, diferentemente dos humanos, em que a haploinsuficiência do gene provoca doenças do neurodesenvolvimento (Williams et al, 2010; Talkowski et al, 2011).

A haploinsuficiência de *MBD5* foi primeiramente descoberto em uma triagem de CNVs em crianças com deficiência intelectual (Wagenstaller et al, 2007), o fenótipo foi refinado em muitos mais indivíduos com doenças do neurodesenvolvimento. Independentemente, mas de forma complementar, a síndrome da microdeleção 2q23.1, mesma região em que se localiza o gene *MBD5*, foi reconhecida e é caracterizada por deficiência intelectual e

fenótipos semelhantes aos autistas (Jaillard et al, 2009; van Bon et al, 2010). Com o aumento do tamanho amostral e poder estatístico, assim como o aprimoramento das técnicas, foi possível identificar que a haploinsuficiência de *MBD5* era a causa dos fenótipos observados nos portadores da microdeleção 2q23.1, uma vez que deleções e mutações pontuais estavam superrepresentadas nesta amostra (Williams et al, 2010; Talkowski et al, 2011), embora exista uma grande heterogeneidade fenotípica.

Assim, modelamos a haploinsuficiência de *MBD5* em células-tronco neurais de forma a investigar o seu efeito sobre a expressão de outros genes. Como antes demonstrado para o silenciamento dos genes *EHMT1* e *TCF4* (Chen et al, 2014), hipotetizamos que a alteração destes genes em doenças do neurodesenvolvimento poderia estar relacionada a um desbalanço entre fatores que estimulam a proliferação ou diferenciação.

4.3 Método

Esse trabalho foi revisado e aprovado pelo comitê de ética do Douglas Hospital Research Institute da McGill University, Montreal, Canadá.

4.3.1 Cultura celular

Células de cérebro fetal (FBCs) provenientes de células da linhagem ReN derivadas de mesencéfalo ventral de cérebro fetal humano e imortalizadas com v-myc (Millipore SCC008) foram cultivadas em placas de 6 poços tratadas com poli-L-ornitina e laminina (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) e mantidas em meio contendo 70% de DMEM, 2% de B27, 1% de Penicilina/estreptomicina (Life Technologies), 30% de Ham's F12 (Mediatech, Herndon, EUA), 20 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, EUA), 20 ng/mL de EGF (Sigma) e 5 µg/mL de heparina (Sigma).

4.3.2 Geração de linhagens celulares *knockdown*, RNAseq e PCR em tempo real

As etapas de geração das linhagens até os resultados do RNAseq foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Gustavo Turecki em colaboração com outros pesquisadores. A aluna teve uma maior participação nas validações do sequenciamento por PCR em tempo

real e no estudo funcional do ciclo celular. Maiores detalhes encontram-se no Apêndice 18 (Gigek et al., 2015, submetido).

Brevemente, quatro linhagens FBCs (*knockdown* para *MBD5* – *MBD5* KD) foram infectadas por vírus com vetores contendo diferentes shRNA (*short hairpin RNA*) que silenciavam o gene *MBD5*. Os identificadores estão no banco do The RNAi Consortium (TRC). Quatro linhagens FBCs, geradas de forma semelhante às *MBD5* KD e contendo shRNAs que silenciavam genes não presentes no genoma humano (*LacZ*, *GFP*, *RFP* e *Luc*) foram utilizadas como controle.

O RNA foi extraído das células com o *RNeasy kit* (Qiagen) e as bibliotecas de RNA e o sequenciamento foram realizados na Universidade McGill, Montreal, Canadá, e no *Genome Quebec Innovation Center*, Montreal, utilizando o aparelho no HiSeq (Illumina, As Diego, EUA).

O silenciamento do gene *MBD5* foi confirmado duas vezes de forma independente por PCR em tempo real para verificar reduções nos níveis de RNAm, e por *Western Blotting* para verificar reduções a nível proteico.

Para o PCR em tempo real, foram utilizadas replicatas independentes do sequenciamento, em que as células foram expandidas e o RNA extraído novamente. A síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 40 μ L contendo 1 μ g de RNA total, 0,5 μ g de iniciadores randômicos, 0,5 mM de dNTPs, 0,01M de DTT e 400 U de M-MLV-RT (Life Technologies). Para a quantificação, utilizamos *SYBR green* e os iniciadores foram desenhados por meio do *software Primer BLAST*. Os genes alvos escolhidos foram o *MBD5* (para confirmação do *knockdown*), *EEF1A2* e *VGF* (para validar genes com diferença de expressão encontrados pelo RNAseq). Uma mistura foi preparada contendo 5 μ L de 2X *SYBR green MasterMix* (Life Technologies), 0,5 μ L de cada iniciador (a 10mM), 2 μ L de H₂O e 2 μ L de cDNA e aplicada em cada poço de uma placa de 384 poços. Quatro genes endógenos foram testados (*GAPDH*, *ACTB*, *IPO8* e *POLR2A*), tendo sido escolhido o *IPO8* por ter-se mostrado o mais estável de acordo com o *software NormFinder*. As placas foram submetidas à amplificação no aparelho ABI 7900 (Life Technologies). O método de quantificação relativa com curva padrão foi utilizado para avaliar a expressão gênica.

Para o *Western Blotting*, utilizamos a transferência semi-seca e os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-MBD5 policlonal de coelho (ab103144; Abcam) e anti-ACTB monoclonal de camundongo (MBS120059, MyBioSource).

4.3.3 Proliferação celular e análise do ciclo celular

Para avaliar a proliferação celular, cultivamos as células a 200 mil/mL em um poço da placa de 6 poços para cada medida, com todas as análises feitas em triplicata. As células foram contadas após 20 horas e 44 horas em que adicionamos azul de tripan para exclusão de células mortas utilizando uma câmara de Neubauer e um microscópio Nikon T100. Para a análise de ciclo celular por FACS (*fluorescent activated cell sorting*), três culturas paralelas, contendo $\sim 15 \times 10^6$ células cada, foram lavadas com PBS e tratadas com 10 mL de Acutase (Millipore) por 30 minutos a 37°C. As células foram sedimentadas e lavadas com 3 mL de PBS gelado, ressuspendidas em 0,5 mL de PBS gelado, fixadas com 5 mL de etanol 70% gelado e incubadas por 30 minutos em gelo. As células foram então lavadas com 5 mL de PBS, sedimentadas, ressuspendidas em 4 mL de PBS e tratadas com 200 μ L de RNase A (20 mg/mL, Life Technologies) por 30 minutos a 37°C. Para a marcação com iodeto de propídeo (IP), as células foram sedimentadas e ressuspendidas em 0,5 mL de PBS e 40 μ L de IP (1 mg/mL) e incubadas no escuro. Antes da análise com o citômetro de fluxo FACSCanto (Beckton Dickinson) do *Institute for Research in Immunology and Cancer* da Universidade de Montreal, cada tubo foi separado em dois para replicatas. A porcentagem de células de cada estágio do ciclo celular foi determinada com o *software* ModFit LT v.4.0 (*Verity Software House*) após subtrair os debris e agregados, usando os parâmetros padrões.

4.3.4 Resultados

Primeiramente as quatro linhagens *MBD5* KD foram testadas por PCR em tempo real para identificar se o silenciamento foi efetivo quando comparados às quatro linhagens controle. Duas das quatro linhagens *MBD5* KD apresentaram uma redução significativa da expressão de *MBD5* em 64% e 99% (Figura 17A). Os resultados observados na expressão

gênica foram replicados considerando os níveis proteicos de *MBD5*, por meio de *Western blotting* (Figura 17B).

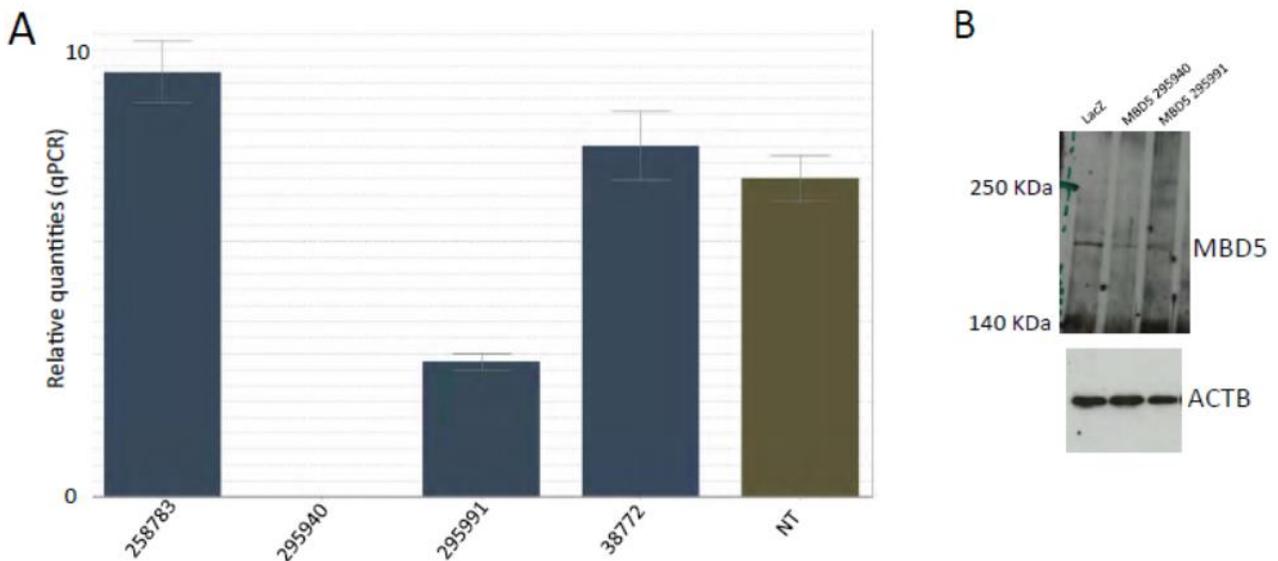


Figura 17. Análise do silenciamento de *MBD5* KD. A) Resultado do PCR em tempo real; B) Resultado do *Western Blotting*. Os números presentes abaixo de cada coluna representam a numeração identificadora do *The RNAi Consortium* (TRC). NT: Controles *Non-target* (média dos quatro controles: *lacZ*, *luc*, *RFP* e *GFP*)

Assim, essas duas linhagens *MBD5* KD (números TRC: 295940 e 295991) e os quatro controles foram utilizados para o RNAseq. Os resultados do sequenciamento indicaram que, dentre os genes que apresentaram redução de expressão com o silenciamento de *MBD5* muitos estavam implicados em divisão e proliferação celular (Figura 18A), enquanto que os genes superexpressos estavam associados à diferenciação neuronal (Figura 18B).

Estudo II: Análise funcional do gene MBD5: Caracterização da importância biológica de um gene no neurodesenvolvimento

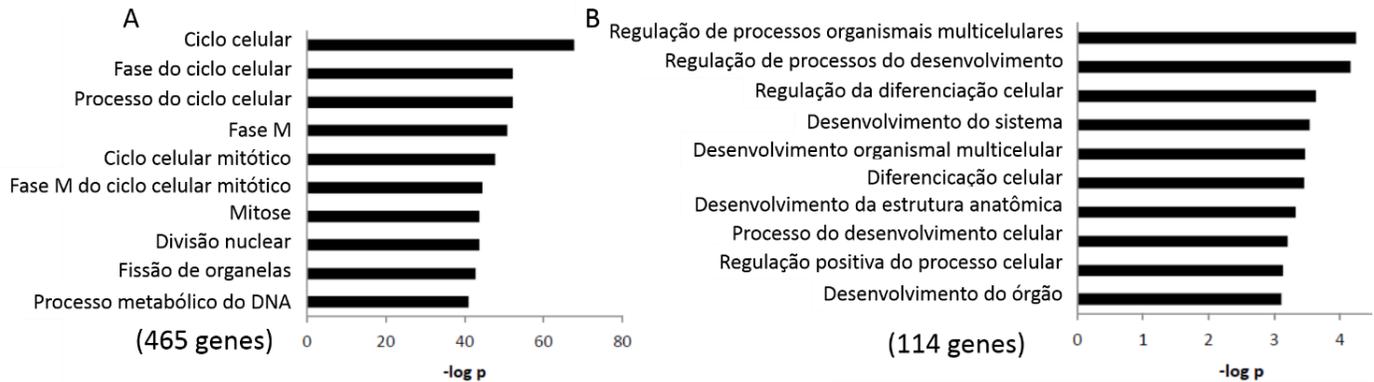


Figura 18. Resultados do RNAseq para células *MBD5* KD comparadas com controles utilizando o software DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). A) vias superrepresentadas para genes hipoeexpressos; B) vias superrepresentadas para genes hiperexpressos.

Alguns desses resultados foram validados por PCR em tempo real (Figura 19) (genes *VGF* e *EEF1A2*), além do próprio gene *MBD5*, indicando que mesmo em uma análise independente, os resultados mantiveram-se significantes ($p < 0,05$).

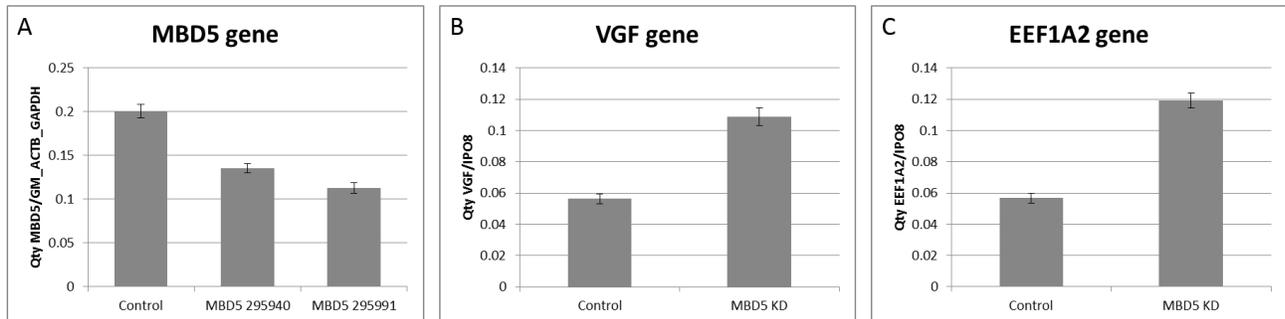


Figura 19. Replicação por PCR em tempo real. A) análise da expressão do gene *MBD5* em linhagens *MBD5* KD e controles, mostrando uma hipoeexpressão do gene em *MBD5* KD; B) análise do gene *VGF*, mostrando uma superexpressão do gene em *MBD5* KD; C) análise do gene *EEF1A2*, mostrando uma superexpressão do gene em *MBD5* KD.

Esses dados mostram que genes importantes para o neurodesenvolvimento e diferenciação estão prematuramente hiperexpressos em células *MBD5* KD. Isto leva à hipótese de que a TEA e outras doenças do neurodesenvolvimento sejam o resultado de as células tronco neuronais estarem em um estado mais característico de células diferenciadas, do que células em divisão.

Testamos também se o silenciamento do gene *MBD5* de fato provocava uma alteração no ciclo celular (por FACS), e assim, na proliferação (por azul de tripan). Entretanto, não observamos diferenças testando por duas análises (azul de tripan e FACS – Figura 20).

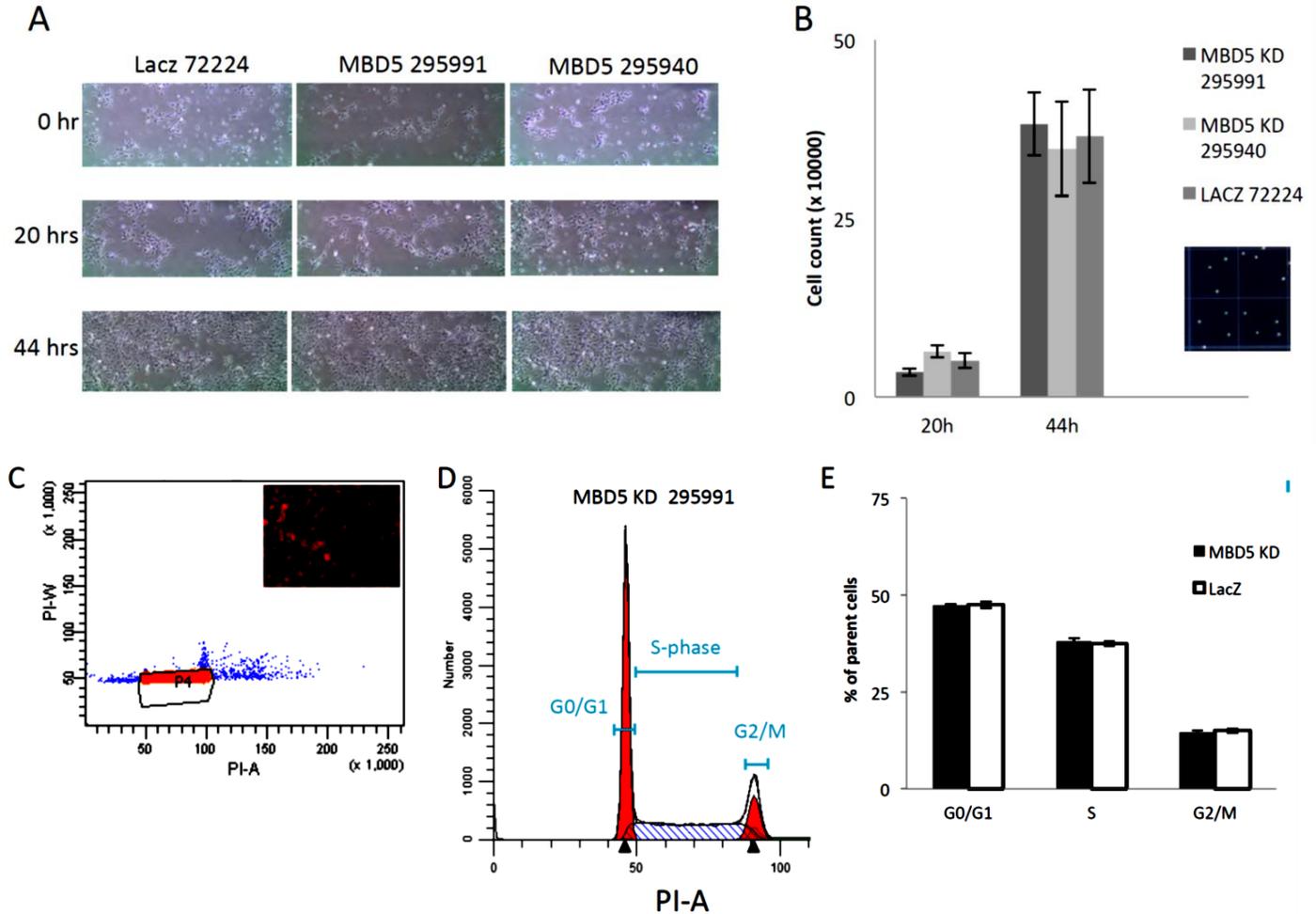


Figura 20. Resultados do teste de proliferação. A) células após 20h e 44h da tripsinização; B) contagem de células após marcação com azul de tripan; C) Representação das células analisadas para o FACS e marcação com IP visualizado no microscópio; D) perfil do FACS após a marcação com IP, mostrando células em fase G0/G1, S ou G2/M; E) comparação entre células *MBD5* KD e controle (LacZ) em diferentes fases do ciclo celular medidas por FACS.

4.4 Discussão

No estudo II foi observada que a redução da dosagem de *MBD5* levou as células tronco neuronais a adotar características mais típicas de um estado de diferenciação do que de proliferação, e isso pode ser um perfil molecular dos TEA e de outras doenças do

neurodesenvolvimento. Esses resultados também foram validados por outras técnicas e em outros genes envolvidos nessas doenças, e estão detalhados no Apêndice 18 (Gigek et al., submetido).

Outros estudos do mesmo grupo demonstraram que a regulação do balanço entre proliferação e diferenciação das células tronco neuronais parece participar na etiologia das doenças do neurodesenvolvimento (Chen et al, 2014).

As vias do WNT, da família *Hedgehog* e do TNF- β tem sido implicadas em TEA (Hormozdiari et al, 2015), e tem um papel bem conhecido na proliferação e diferenciação celular (Salinas , Zou, 2008; Budnik , Salinas, 2011; Casanova , Casanova, 2014). Além disso, 88% dos genes de alto risco para autismo, de acordo com os bancos de dados *SFARI* e *AutismKB*, parecem regular a indução neuronal ou diferenciação de neuroblastos precoce (Casanova , Casanova, 2014). Outras funções celulares têm sido implicadas em TEA, tais como a modificação da cromatina e a tradução da proteína, embora estas não são vias, mas sim propriedades mecânicas de proteínas, e assim podem também atuar regulando a proliferação e diferenciação das células tronco neuronais. Dentre as propriedades mais associadas com TEA estão: a formação e manutenção de sinapses e conectividade, como os genes *NLGN4*, *NRXN1*, *SHANK1* e *SYNGAP1*. Assim, podemos propor que os déficits na regulação do momento adequado para diferenciação neural podem levar a conexões inapropriadas entre os neurônios, ligando as hipóteses atuais desses transtornos. Em outras palavras, a perda de dosagem (ou em alguns casos, os ganhos) não gera alterações cerebrais maciças, mas sim altera a capacidade de uma célula tronco neuronal se diferenciar em um tempo apropriado. Essas células possivelmente equilibram vários estímulos externos e intrínsecos de sinalização antes de se comprometerem com o processo de diferenciação. Dessa forma, pequenas alterações neste programa podem levar à problemas de conectividade sutis no cérebro, que podem ser expressos mais tarde na vida como um TEA.

Interessantemente, em uma revisão recente, Casanova & Casanova (2014) mostraram evidências genéticas indicando um papel importante da diferenciação e maturação neuronal na etiologia dos TEAs, sugerindo a necessidade de se investigar estágios precoces da história de um neurônio de forma a entender melhor a origem do fenótipo observado.

Estudo II: Análise funcional do gene MBD5: Caracterização da importância biológica de um gene no neurodesenvolvimento

Assim, somado aos outros estudos do grupo (Chen et al., 2014; Gigeck et al., submetido) e estudando células progenitoras de neurônios, foi possível definir um ponto de convergência molecular comum (diferenciação neuronal) que pode estar por trás dos transtornos do espectro autista ou outras doenças do neurodesenvolvimento, algo que pode ser particularmente útil nos casos idiopáticos - ou utilizado para avaliar terapias farmacêuticas.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

Estudo I: Estudo de expressão gênica / metilação em primeiro episódio psicótico (PEP)

1) O gene *GCH1* apresentou uma redução e os genes *MBP* e *NDEL1* um aumento significativo dos níveis de expressão, em pacientes PEP virgens de tratamento quando comparados aos controles saudáveis. O gene *GCH1* também apresentou uma hipermetilação na região promotora em PEP (não significativa após a correção para múltiplas comparações), corroborando a redução de sua expressão em PEP.

2) O gene *GABRR2* apresentou uma redução significativa na expressão, em pacientes PEP após dois meses de tratamento em relação a antes da administração de antipsicóticos. Comparando pacientes antes e após dois meses de tratamento, a expressão de *NDEL1* pareceretornar a níveis controles. Esses dados podem indicar que *NDEL1* pode ser um marcador biológico de estado psicótico, uma vez que a sua expressão é influenciada pela administração de antipsicóticos.

3) Nenhum gene apresentou uma associação significativa (após a correção de Bonferroni) com os sintomas de psicopatologia. Comparando os pacientes após o tratamento e controles, ainda é possível observar uma redução significativa da expressão de *GCH1*, sugerindo que ela poderia servir como um marcador de traço e não apenas de estado. Isso também sugere que a administração de antipsicóticos atenua a diferença de expressão desse gene, mostrando a importância da avaliação de pacientes virgens de tratamento. O gene *MBP* também apresenta diferenças significantes entre controles e pacientes após 1 ano de tratamento, também mostrando que poderia ser um marcador de traço. Já o gene *NDEL1* não apresentou diferenças significantes entre controles e PEP após o tratamento, indicando que ele tem a sua expressão alterada com a administração de antipsicóticos, mas ainda pode ser um gene importante para a etiologia da doença. O gene *GABRR2* também mostrou uma alteração na expressão após o tratamento quando comparado aos controles, indicando uma alteração específica à administração de risperidona. Quando comparamos respondedores, não-respondedores e controles, observamos que os primeiros apresentam uma menor expressão de *GABRR2* quando

comparados aos controles. A menor expressão de *GABRR2* indicaria uma boa resposta ao medicamento, embora diferente dos controles, e assim, poderíamos sugerir que a expressão desse gene se assemelharia mais a um marcador de estado do paciente e de resposta ao tratamento.

Estudo II: Análise funcional do gene *MBD5*: Caracterização da importância biológica de um gene no neurodesenvolvimento

4) O silenciamento do gene *MBD5* levou às células tronco neuronais a adotar características mais típicas de um estado de diferenciação do que de proliferação, e isso pode ser um perfil molecular das doenças do espectro autista e de outras doenças do neurodesenvolvimento.

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 23 de março de 2012
CEP N°: 1946/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): VANESSA KIYOMI ARASHIRO OTA

Disciplina/Departamento: Genética

Pesquisadores associados: Marília de A Cardoso Smith, Maria Isabel Melaragno, Helio Elkis, Jaime Eduardo Cecilio Hallak, Jair de Jesus Mari, Rodrigo A Bressan, Sintia Iole Nogueira Belangero (orientadora)

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Expressão gênica diferencial e regulação epigenética na esquizofrenia :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, sem contato com paciente

OBJETIVO DO ESTUDO: O presente projeto de pesquisa tem como objetivo geral a investigação de marcadores genéticos que auxiliem no entendimento da etiologia da esquizofrenia e no tratamento desta, a fim de proporcionar um melhor sistema de diagnóstico aliado a um tratamento mais direcionado e eficiente da esquizofrenia.

RESUMO: Para o presente projeto serão realizadas a coleta de sangue, para a obtenção de um banco de RNA e de DNA, e a avaliação psiquiátrica em controles e em pacientes antes e após o tratamento, com a extração de RNA será avaliada a expressão de genes de receptores e reguladores de neurotransmissores. Assim, genes que apresentem diferenças de expressão tanto entre casos e controles quanto antes e após o tratamento serão investigados quanto à metilação de DNA. Será realizado um estudo de seguimento de 50 pacientes em primeiro episódio psicótico, sem uso de prévio de medicação antipsicótica, e 50 controles saudáveis, pareados por sexo e idade. Esses pacientes serão submetidos a duas avaliações: uma avaliação basal, no início do estudo, e outra após dois meses do início do tratamento. Esse período foi definido de acordo com o tempo necessário para introdução e avaliação de resposta à medicação. Nesses dois momentos, serão aplicados instrumentos padronizados para avaliação clínica (descrição detalhada a seguir) e será coletado sangue periférico para estudo da expressão gênica e da metilação de genes receptores e reguladores de neurotransmissores e de polimorfismos. Os controles saudáveis serão submetidos a protocolo semelhante de avaliação. Os pacientes serão selecionados a partir dos serviços de psiquiatria que compõem esse consórcio: Proesq – Programa de Esquizofrenia do Departamento de Psiquiatria da UNIFESP; Proesq- Projeto de Esquizofrenia do Instituto de Psiquiatria da FMUSP; Serviço de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMUSP de Ribeirão Preto e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, englobando o Hospital Central, o Centro de Atenção Integrada à Saúde Mental (CAISM) e Complexo Hospitalar Juquery. Os quatro programas possuem inserção em serviços de pronto-socorro que são referência para atendimentos a quadros psiquiátricos em suas respectivas regiões. Todos os indivíduos serão avaliados através da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV – SCID, uma entrevista estruturada para a avaliação diagnóstica de transtornos psiquiátricos. Outros dois instrumentos serão aplicados para avaliar os sintomas apresentados e resposta farmacológica: 1) psicopatologia psicótica – através da escala de sintomas positivos e negativos, instrumento validado no Brasil por Vessoni; 2) gravidade da doença – através da escala de impressão de gravidade clínica. O protocolo de tratamento será padronizado, prevendo o uso de haloperidol. Será permitido o uso de outras medicações psiquiátricas de acordo com a indicação clínica, as medicações e dose serão anotadas. Os indivíduos serão acompanhados por 2 meses, com avaliações após 1, 3, 5 e 8 semanas, sendo que os mesmos instrumentos serão aplicados novamente. A resposta ao tratamento é determinada pela redução em 50% do escore da PANSS na avaliação de dois meses comparada à avaliação inicial. Serão coletados 20 mL de sangue periférico dos pacientes e controles, para extração de DNA e realizada análise de expressão de genes em pacientes com esquizofrenia. As amostras de DNA serão tratadas pelo kit EpiTect Bisulfite Kit, que possibilita a verificação do padrão de metilação de sequências de DNA de interesse. As regiões promotoras dos genes selecionados serão clonadas e sequenciadas antes e após a modificação de bissulfite de sódio para direcionar o desenho de primers que serão posteriormente utilizados nos ensaios de High Resolution Melting (HRM), para ilhas CpGs de maior interesse.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A esquizofrenia é o transtorno mental mais grave e incapacitante entre os distúrbios psiquiátricos. Além disso, a demora em instituir tratamento adequado e a duração do primeiro episódio psicótico estão entre os principais fatores de mau prognóstico. O projeto propõe a investigação de marcadores genéticos e epigenéticos para o tratamento da esquizofrenia por meio do estudo da expressão e do padrão de metilação de genes de receptores e reguladores de neurotransmissores.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo. APRESENTADO O TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DO MATERIAL PELO RESPONSÁVEL PELA GUARDA DESTES MATERIAIS. Re (RESOL CNS 441/2011)

TCLE: Apresentado a cópia do TCLE empregado quando da coleta do material, contendo autorização de armazenamento e possível utilização futura em pesquisa.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 142341,64

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 48 meses



PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 18/03/2013 e 13/03/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo 2: Ota et al. *Psychiatry Research*, 2013d

Psychiatry Research 210 (2013) 1290–1292



Contents lists available at ScienceDirect

Psychiatry Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psychres

Brief report

Neurotransmitter receptor and regulatory gene expression in peripheral blood of Brazilian drug-naïve first-episode psychosis patients before and after antipsychotic treatment



Vanessa Kiyomi Ota^{a,b,1}, Cristiano Noto^{b,1}, Ary Gadelha^b, Marcos Leite Santoro^{a,b}, Patricia Natalia Silva^{a,b}, Maria Isabel Melaragno^a, Marília de Arruda Cardoso Smith^a, Quirino Cordeiro^c, Rodrigo Affonseca Bressan^b, Sintia Iole Belangero^{a,b,*}

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740, Edifício Leitao da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil

^b LINC-Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas, Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Pedro de Toledo, 669, 3º andar fundos, CEP 05039-032, São Paulo, Brazil

^c Departamento de Psiquiatria, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCOSP), São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2013

Received in revised form

29 August 2013

Accepted 16 September 2013

Keywords:

Schizophrenia

GABRR2

CHRNA3

ABSTRACT

Little is known about how genes expressed in blood relate to schizophrenia or antipsychotic use. We analyzed gene expression in 10 first-episode psychosis patients and nine controls using PCR Arrays. GABRR2 and CHRNA3 were found to be differentially expressed after risperidone treatment. These genes may be regulated by antipsychotic use.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The psychotic symptoms of schizophrenia (SCZ) usually arise during late adolescence and early adulthood (Onumere et al., 2011). The first 5 years of the disorder are particularly critical (Birchwood et al., 1998), and several studies have shown that most deficits develop during this time frame (Ho et al., 2003). Investigation of patients during their first episode of psychosis (FEP), particularly before they start taking any antipsychotic medication, is likely to be helpful for disentangling the biological underpinnings of disease onset, progression, and of the effects of antipsychotic therapy.

Several studies have investigated gene expression changes in post-mortem samples from schizophrenic patients (for review, see Sequeira et al., 2012). However, post-mortem gene expression studies in prolonged illnesses are skewed by numerous factors, including illness duration and the effects of long-term medication exposure (Sequeira et al., 2012).

To overcome these problems, gene expression analysis of peripheral blood has been proposed (Middleton et al., 2005; Takahashi et al., 2010; Lee et al., 2012), as blood shares similarities with multiple brain regions at the transcriptional level (Sullivan et al., 2006).

Lymphocytes express several neurotransmitter receptors (Gladkevich et al., 2004), therefore we chose the Human Neurotransmitter Receptors and Regulators RT² Profiler™ PCR Array System (PAHS-060; Qiagen, Germantown, MD), which includes schizophrenia-related genes such as DRD2 and COMT, to perform an expression profiling study comparing: (1) drug-naïve FEP patients and healthy subjects; and (2) drug-naïve FEP patients before and after treatment with antipsychotic drugs. Our study, which analyzes drug-naïve patients at multiple time points, may help to identify markers for the etiology of psychosis and the effects of antipsychotic treatment. Few prior studies have investigated drug-naïve FEP patients in a follow-up design (Zhang et al., 2008; Kuzman et al., 2009; Kumarasinghe et al., 2013).

* Corresponding author at: Disciplina de Genética/UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Ed. Leitao da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900 Sao Paulo, Brazil.
Tel.: +5511 5576 4260, +5511 5576 4264

E-mail addresses: vanessaota@gmail.com (V.K. Ota), csnoto@gmail.com (C. Noto), aryararipe@yahoo.com.br (A. Gadelha), santorogen@gmail.com (M.L. Santoro), patriciaoliveira.unifesp@gmail.com (P.N. Silva), melaragno.morf@epm.br (M.I. Melaragno), macsmith.morf@epm.br (M.A.C. Smith), qcordeiro@yahoo.com (Q. Cordeiro), rodrigoabressan@gmail.com (R.A. Bressan), sinbelangero@gmail.com (S.I. Belangero).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Anexo 3: Ota et al. *Journal of Psychiatric Research*, 2014b

Journal of Psychiatric Research 56 (2014) 130–136



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Psychiatric Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psychires

Evaluation of neurotransmitter receptor gene expression identifies GABA receptor changes: A follow-up study in antipsychotic-naïve patients with first-episode psychosis



Vanessa Kiyomi Ota ^{a, b, 1}, Cristiano Noto ^{b, c, d, 1}, Ary Gadelha ^{b, c}, Marcos Leite Santoro ^{a, b}, Bruno Bertolucci Ortiz ^c, Elvis Henrique Andrade ^c, Brazilio Carvalho Tasso ^d, Leticia Maria Nery Spindola ^{a, b}, Patricia Natalia Silva ^{a, b, c}, Vanessa Costhek Abílio ^{b, c, e}, Marília de Arruda Cardoso Smith ^a, João Ricardo Sato ^{b, f}, Elisa Brietzke ^{b, c}, Quirino Cordeiro ^{c, d}, Rodrigo Affonseca Bressan ^{b, c}, Sintia Iole Belangero ^{a, b, c, *}

^a Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740, Edifício Leitao da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil

^b LINC – Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Pedro de Toledo, 669, 3º andar fundos, CEP 05039-032, São Paulo, Brazil

^c Department of Psychiatry, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^d Department of Psychiatry, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSp), São Paulo, Brazil

^e Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^f Center of Mathematics, Computation and Cognition, Universidade Federal do ABC, Santo André, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2014

Received in revised form

29 April 2014

Accepted 13 May 2014

Keywords:

Gene expression

GABA Rho-2

Risperidone

Schizophrenia

ABSTRACT

A study of the gene expression levels in the blood of individuals with schizophrenia in the beginning of the disease, such as first-episode psychosis (FEP), is useful to detect gene expression changes in this disorder in response to treatment. Although a large number of genetic studies on schizophrenia have been conducted, little is known about the effects of antipsychotic treatment on gene expression. The aim of the present study was to examine differences in the gene expression in the blood of antipsychotic-naïve FEP patients before and after risperidone treatment ($N = 44$) and also to verify the correlation with treatment response. In addition, we determined the correlations between differentially expressed genes and clinical variables. The expression of 40 neurotransmitter and neurodevelopment-associated genes was assessed using the RT² Profiler™ PCR Array. The results indicated that the *GABRR2* gene was downregulated after risperidone treatment, but no genes were associated with response to treatment and clinical variables after Bonferroni correction. *GABRR2* downregulation after treatment can both suggest an effect of risperidone treatment or processes related to disease progression, either not necessarily associated with the improvement of symptoms. Despite this change was observed in blood, this decrease in *GABRR2* mRNA levels might be an effect of changes in GABA concentrations or other systems interplay consequently to D2 blockage induced by risperidone, for example. Thus, it is important

Abbreviations: FEP, first-episode psychosis; PCR, polymerase chain reaction; PANSS, Positive and Negative Syndrome Scale; *GABRR2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 2; GABA, gamma-aminobutyric acid; RNA, ribonucleic acid; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; SCID, Structured Clinical Interview for DSM-IV; HKG, housekeeping genes; *B2M*, beta-2-microglobulin; *HPRT1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *RPL13A*, ribosomal protein L13a; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *ACTB*, actin, beta; Ct, threshold cycle; *SAGE*, serial analysis of gene expression; *GAD67*, glutamic acid decarboxylase 67; *RELN*, reelin; *ABAT*, 4-Aminobutyrate Aminotransferase; *TSPO*, translocator protein (18 kDa); *CHRN1*, cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle); *CHRNAE*, cholinergic receptor, nicotinic, epsilon (muscle); *COMT*, catechol-O-methyltransferase; *GABRR2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 2; *GCH1*, GTP cyclohydrolase 1; *GCHFR*, GTP cyclohydrolase I feedback regulator; *TACR2*, tachykinin receptor 2; *NRG1*, neuregulin 1.

* Corresponding author. Disciplina de Genética/UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Ed. Leitao da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil. Tel.: +(5511) 5576 4260, +(5511) 5576 4264.

E-mail addresses: vanessakaota@gmail.com (V.K. Ota), csnoto@gmail.com (C. Noto), aryararipe@yahoo.com.br (A. Gadelha), santorogen@gmail.com (M.L. Santoro), ortiz_bru@hotmail.com (B.B. Ortiz), ehsa84@gmail.com (E.H. Andrade), bratasso@gmail.com (B.C. Tasso), leticia.n.spindola@gmail.com (L.M.N. Spindola), patriciaoliveira.unifesp@gmail.com (P.N. Silva), vanabilio@gmail.com (V.C. Abílio), macsmith.morf@epm.br (M.A.C. Smith), joao.sato@ufabc.edu.br (J.R. Sato), elisabrietzke@hotmail.com (E. Brietzke), qcordeiro@yahoo.com (Q. Cordeiro), rodrigoabressan@gmail.com (R.A. Bressan), sinbelangero@gmail.com (S.I. Belangero).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.05.012>
0022-3956/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anexo 4: Ota et al. *Schizophrenia Research*, 2014c

Schizophrenia Research 159 (2014) 358–364



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

Changes in gene expression and methylation in the blood of patients with first-episode psychosis



Vanessa Kiyomi Ota^{a,b,1}, Cristiano Noto^{b,c,d,1}, Ary Gadelha^{b,c}, Marcos Leite Santoro^{a,b}, Leticia Maria Spindola^{a,b}, Eduardo Sauerbronn Gouvea^{c,d}, Roberta Sessa Stilhano^e, Bruno Bertolucci Ortiz^c, Patricia Natalia Silva^{a,b,c}, João Ricardo Sato^{b,f}, Sang Won Han^e, Quirino Cordeiro^{c,d}, Rodrigo Affonseca Bressan^{b,c}, Sintia Iole Belangero^{a,b,c,*}

^a Genetics Division of Department of Morphology and Genetics of Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brazil

^b LINC-Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences of UNIFESP, Brazil

^c Department of Psychiatry of UNIFESP, Brazil

^d Department of Psychiatry of Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMS), Brazil

^e Department of Biophysics of UNIFESP, Brazil

^f Center of Mathematics, Computation and Cognition, Universidade Federal do ABC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2014

Received in revised form 2 September 2014

Accepted 5 September 2014

Available online 28 September 2014

Keywords:

gene expression

BH4

biopterin

GTP cyclohydrolase I

schizophrenia

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe mental health disorder with high heritability. The investigation of individuals during their first-episode psychosis (FEP), before the progression of psychotic disorders and especially before treatment with antipsychotic medications, is particularly helpful for understanding this complex disease and for the identification of potential biomarkers. In this study, we compared the expression of genes that are involved in neuro-transmission and neurodevelopment of antipsychotic-naïve FEP in the peripheral blood of patients ($n = 51$) and healthy controls ($n = 51$). In addition, we investigated the differentially expressed genes with respect to a) DNA methylation, b) the correlation between gene expression and clinical variables (PANSS), and c) gene expression changes after risperidone treatment. Expression levels of 11 genes were quantified with SYBR Green. For methylation analysis, bisulfite sequencing was performed. A significant decrease in *GCHI* mRNA levels was observed in FEP patients relative to controls. Also, when we compare the FEP patients after risperidone treatment with controls, this difference remains significant, and no significant differences were observed in *GCHI* mRNA levels when comparing patients before and after risperidone treatment. Additionally, although the differences were non-significant after Bonferroni correction, the expression of *GCHI* seemed to be correlated with PANSS scores, and the *GCHI* promoter region was more methylated in FEP than in controls, thus corroborating the results obtained at the mRNA level. Few studies have been conducted on *GCHI*, and future studies are needed to clarify its potential role in the progression of schizophrenia.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: FEP, first-episode psychosis; PCR, polymerase chain reaction; PANSS, Positive and Negative Syndrome Scale; *GABRR2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 2; GABA, gamma-aminobutyric acid; mRNA, messenger ribonucleic acid; RNA, ribonucleic acid; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; SCID, Structured Clinical Interview for DSM-IV; HKG, housekeeping genes; *B2M*, beta-2-microglobulin; *HPR17*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *RPL13A*, ribosomal protein L13a; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *ACTB*, actin, beta; *Ct*, threshold cycle; *SAGE*, serial analysis of gene expression; *GAD67*, glutamic acid decarboxylase 67; *RELN*, reelin; *ABAT*, 4-aminobutyrate aminotransferase; *TSPO*, translocator protein (18 kDa); *CHRN1*, cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle); *CHRNAE*, cholinergic receptor, nicotinic, epsilon (muscle); *COMT*, catechol-O-methyltransferase; *GABRR2*, gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 2; *GCHI*, GTP cyclohydrolase I; *GCHFR*, GTP cyclohydrolase I feedback regulator; *TACR2*, tachykinin receptor 2; *NRG1*, neuregulin 1.

* Corresponding author at: Disciplina de Genética, UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Ed. Leitão da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4260, +55 11 5576 4264.

E-mail addresses: vansakaota@gmail.com (V.K. Ota), csnoto@gmail.com (C. Noto), aryararipe@yahoo.com.br (A. Gadelha), santorogen@gmail.com (M.L. Santoro),

leticia.n.spindola@gmail.com (L.M. Spindola), esgouvea@yahoo.com (E.S. Gouvea), robertasessa@gmail.com (R.S. Stilhano), ortiz_bru@hotmail.com (B.B. Ortiz),

patriciaoliveira.unifesp@gmail.com (P.N. Silva), joao.sato@ufabc.edu.br (J.R. Sato), universo.han@gmail.com (S.W. Han), qcordeiro@yahoo.com (Q. Cordeiro), rodrigoabressan@gmail.com

(R.A. Bressan), sinbelangero@gmail.com (S.I. Belangero).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2014.09.008>

0920-9964/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M, et al. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;134B: 60-6.
- Aberg KA, McClay JL, Nerella S, Clark S, Kumar G, Chen W, et al. Methylome-wide association study of schizophrenia: identifying blood biomarker signatures of environmental insults. *JAMA Psychiatry* 2014;71: 255-64.
- Abidi S, Bhaskara SM. From chlorpromazine to clozapine--antipsychotic adverse effects and the clinician's dilemma. *Can J Psychiatry* 2003;48: 749-55.
- Ahn K, Gotay N, Andersen TM, Anvari AA, Gochman P, Lee Y, et al. High rate of disease-related copy number variations in childhood onset schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2014;19: 568-72.
- Alakuijala A, Palgi M, Wegelius K, Schmidt M, Enz R, Paulin L, et al. GABA receptor rho subunit expression in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;154: 15-23.
- Allison DB, Mentore JL, Heo M, Chandler LP, Cappelleri JC, Infante MC, et al. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry* 1999;156: 1686-96.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23: 185-8.
- Anand R, Geffen Y, Vasile D, Dan I. An open-label tolerability study of BL-1020 antipsychotic: a novel gamma aminobutyric acid ester of perphenazine. *Clin Neuropharmacol* 2010;33: 297-302.
- Arion D, Unger T, Lewis DA, Levitt P, Mirnics K. Molecular evidence for increased expression of genes related to immune and chaperone function in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007;62: 711-21.
- Auta J, Smith RC, Dong E, Tueting P, Sershen H, Boules S, et al. DNA-methylation gene network dysregulation in peripheral blood lymphocytes of schizophrenia patients. *Schizophr Res* 2013;150: 312-8.
- Ayalew M, Le-Niculescu H, Levey DF, Jain N, Changala B, Patel SD, et al. Convergent functional genomics of schizophrenia: from comprehensive understanding to genetic risk prediction. *Mol Psychiatry* 2012;17: 887-905.

- Barnes TR, Hutton SB, Chapman MJ, Mutsatsa S, Puri BK, Joyce EM. West London first-episode study of schizophrenia. Clinical correlates of duration of untreated psychosis. *Br J Psychiatry* 2000;177: 207-11.
- Baubec T, Ivanek R, Lienert F, Schubeler D. Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell* 2013;153: 480-92.
- Beveridge NJ, Cairns MJ. MicroRNA dysregulation in schizophrenia. *Neurobiol Dis* 2012;46: 263-71.
- Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB. The role of neurotensin in the pathophysiology of schizophrenia and the mechanism of action of antipsychotic drugs. *Biol Psychiatry* 2001;50: 856-72.
- Birchwood M, Todd P, Jackson C. Early intervention in psychosis. The critical period hypothesis. *Br J Psychiatry Suppl* 1998;172: 53-9.
- Bitanirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35: 878-93.
- Bleuler ME. The long-term course of schizophrenic psychoses. In: R. L. C. L. C. Wynne, S. Matthyse. *The Nature of Schizophrenia – New Approaches to Research and Treatment*. ed. New York: Wiley; 1978.
- Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 2005;21: 4067-8.
- Bodzioch M, Lapicka-Bodzioch K, Rudzinska M, Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M, Szczudlik A. Severe dystonic encephalopathy without hyperphenylalaninemia associated with an 18-bp deletion within the proximal GCH1 promoter. *Mov Disord* 2011;26: 337-40.
- Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* 2006;63: 1945-61.
- Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem* 1998;70: 899-907.
- Bousman CA, Chana G, Glatt SJ, Chandler SD, May T, Lohr J, et al. Positive symptoms of psychosis correlate with expression of ubiquitin proteasome genes in peripheral blood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;153B: 1336-41.
- Bowden NA, Weidenhofer J, Scott RJ, Schall U, Todd J, Michie PT, et al. Preliminary investigation of gene expression profiles in peripheral blood lymphocytes in schizophrenia. *Schizophr Res* 2006;82: 175-83.

- Bradshaw NJ, Hennah W, Soares DC. NDE1 and NDEL1: twin neurodevelopmental proteins with similar 'nature' but different 'nurture'. *Biomol Concepts* 2013;4: 447-64.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, et al. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 2569-74.
- Bressan RA, Pilowsky LS. [Glutamatergic hypothesis of schizophrenia]. *Rev Bras Psiquiatr* 2003;25: 177-83.
- Breuer R, Hamshere ML, Strohmaier J, Mattheisen M, Degenhardt F, Meier S, et al. Independent evidence for the selective influence of GABA(A) receptors on one component of the bipolar disorder phenotype. *Mol Psychiatry* 2011;16: 587-9.
- Bromberg A, Levine J, Nemetz B, Belmaker RH, Agam G. No association between global leukocyte DNA methylation and homocysteine levels in schizophrenia patients. *Schizophr Res* 2008;101: 50-7.
- Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M, et al. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61: 774-80.
- Budnik V, Salinas PC. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2011;21: 151-9.
- Burdick KE, Kamiya A, Hodgkinson CA, Lencz T, DeRosse P, Ishizuka K, et al. Elucidating the relationship between DISC1, NDEL1 and NDE1 and the risk for schizophrenia: evidence of epistasis and competitive binding. *Hum Mol Genet* 2008;17: 2462-73.
- Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23: 175-205.
- Buttarelli FR, Fanciulli A, Pellicano C, Pontieri FE. The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders. *Curr Neuropharmacol* 2011;9: 278-88.
- Cai C, Langfelder P, Fuller TF, Oldham MC, Luo R, van den Berg LH, et al. Is human blood a good surrogate for brain tissue in transcriptional studies? *BMC Genomics* 2010a;11: 589.
- Cai HL, Zhu RH, Li HD, Zhang XH, Hu L, Yang W, et al. Elevated plasma gamma-aminobutyrate/glutamate ratio and responses to risperidone antipsychotic treatment in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010b;34: 1273-8.
- Camargo AC, Caldo H, Emson PC. Degradation of neurotensin by rabbit brain endo-oligopeptidase A and endo-oligopeptidase B (proline-endopeptidase). *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116: 1151-9.

Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry* 1998;55: 67-74.

Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2006;29: 77-103.

Cardno AG, Gottesman, II. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* 2000;97: 12-7.

Carter CJ. Multiple genes and factors associated with bipolar disorder converge on growth factor and stress activated kinase pathways controlling translation initiation: implications for oligodendrocyte viability. *Neurochem Int* 2007;50: 461-90.

Casanova EL, Casanova MF. Genetics studies indicate that neural induction and early neuronal maturation are disturbed in autism. *Front Cell Neurosci* 2014;8: 397.

Chansard M, Hong JH, Park YU, Park SK, Nguyen MD. Ndel1, Nudel (Noodle): flexible in the cell? *Cytoskeleton (Hoboken)* 2011;68: 540-54.

Chen ES, Gigeck CO, Rosenfeld JA, Diallo AB, Maussion G, Chen GG, et al. Molecular convergence of neurodevelopmental disorders. *Am J Hum Genet* 2014;95: 490-508.

Chen Y, Bidwell LC, Norton D. Trait vs. State Markers for Schizophrenia: Identification and Characterization through Visual Processes. *Curr Psychiatry Rev* 2006;2: 431-38.

Chiliza B, Asmal L, Emsley R. Early intervention in schizophrenia in developing countries: focus on duration of untreated psychosis and remission as a treatment goal. *Int Rev Psychiatry* 2012;24: 483-8.

Choi YK, Tarazi FI. Alterations in dopamine and glutamate neurotransmission in tetrahydrobiopterin deficient spr^{-/-} mice: relevance to schizophrenia. *BMB Rep* 2010;43: 593-8.

Christofolini DM, Bellucco FT, Ota VK, Belangero SI, Cernach MC, Gadelha A, et al. Assessment of 22q11.2 copy number variations in a sample of Brazilian schizophrenia patients. *Schizophr Res* 2011;132: 99-100.

Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 2007;61: 24R-29R.

Ciampi L. Catamnestic long-term study on the course of life and aging of schizophrenics. *Schizophr Bull* 1980;6: 606-18.

Claes S, Tang Y-L, Gillespie CF, Cubells JF. Human genetics of schizophrenia. In: T. Schlaepfer and C.Nemeroff. *Handbook of Clinical Neurology. Neurobiology of Psychiatric Disorders*. ed. Amsterdam: Elsevier; 2012. p.37-52.

- Collins DM, Murdoch H, Dunlop AJ, Charych E, Baillie GS, Wang Q, et al. Ndel1 alters its conformation by sequestering cAMP-specific phosphodiesterase-4D3 (PDE4D3) in a manner that is dynamically regulated through Protein Kinase A (PKA). *Cell Signal* 2008;20: 2356-69.
- Crespo-Facorro B, Prieto C, Sainz J. Schizophrenia Gene Expression Profile Reverted to Normal Levels by Antipsychotics. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014.
- Davidson L, McGlashan TH. The varied outcomes of schizophrenia. *Can J Psychiatry* 1997;42: 34-43.
- Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, et al. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol* 2012;13: R43.
- de Jong S, Boks MP, Fuller TF, Strengman E, Janson E, de Kovel CG, et al. A gene co-expression network in whole blood of schizophrenia patients is independent of antipsychotic-use and enriched for brain-expressed genes. *PLoS One* 2012;7: e39498.
- Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, et al. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2011;20: 4786-96.
- Doehring A, Antoniadou C, Channon KM, Tegeder I, Lotsch J. Clinical genetics of functionally mild non-coding GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) polymorphisms modulating pain and cardiovascular risk. *Mutat Res* 2008;659: 195-201.
- Du J, Duan S, Wang H, Chen W, Zhao X, Zhang A, et al. Comprehensive analysis of polymorphisms throughout GAD1 gene: a family-based association study in schizophrenia. *J Neural Transm* 2008;115: 513-9.
- Du J, Teng RJ, Lawrence M, Guan T, Xu H, Ge Y, et al. The protein partners of GTP cyclohydrolase I in rat organs. *PLoS One* 2012a;7: e33991.
- Du Y, Liu B, Guo F, Xu G, Ding Y, Liu Y, et al. The essential role of Mbd5 in the regulation of somatic growth and glucose homeostasis in mice. *PLoS One* 2012b;7: e47358.
- Dyer CA, Philibotte TM, Wolf MK, Billings-Gagliardi S. Myelin basic protein mediates extracellular signals that regulate microtubule stability in oligodendrocyte membrane sheets. *J Neurosci Res* 1994;39: 97-107.
- Enoch MA. The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90: 95-104.
- Fatemi SH, Pearce DA, Brooks AI, Sidwell RW. Prenatal viral infection in mouse causes differential expression of genes in brains of mouse progeny: a potential animal model for schizophrenia and autism. *Synapse* 2005;57: 91-9.

- Fatemi SH, Folsom TD, Rooney RJ, Thuras PD. mRNA and protein expression for novel GABAA receptors theta and rho2 are altered in schizophrenia and mood disorders; relevance to FMRP-mGluR5 signaling pathway. *Transl Psychiatry* 2013;3: e271.
- Fillman SG, Cloonan N, Catts VS, Miller LC, Wong J, McCrossin T, et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2013;18: 206-14.
- Frank J, Lang M, Witt SH, Strohmaier J, Rujescu D, Cichon S, et al. Identification of increased genetic risk scores for schizophrenia in treatment-resistant patients. *Mol Psychiatry* 2014.
- Frau M, Simile MM, Tomasi ML, Demartis MI, Daino L, Seddaiu MA, et al. An expression signature of phenotypic resistance to hepatocellular carcinoma identified by cross-species gene expression analysis. *Cell Oncol (Dordr)* 2012;35: 163-73.
- Gadelha A, Machado MF, Yonamine CM, Sato JR, Juliano MA, Oliveira V, et al. Plasma Ndel1 enzyme activity is reduced in patients with schizophrenia--a potential biomarker? *J Psychiatr Res* 2013;47: 657-63.
- Gao XM, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, Tamminga CA. Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000;157: 1141-9.
- Gardiner EJ, Cairns MJ, Liu B, Beveridge NJ, Carr V, Kelly B, et al. Gene expression analysis reveals schizophrenia-associated dysregulation of immune pathways in peripheral blood mononuclear cells. *J Psychiatr Res* 2013;47: 425-37.
- Gasso P, Mas S, Molina O, Lafuente A, Bernardo M, Parellada E. Increased susceptibility to apoptosis in cultured fibroblasts from antipsychotic-naive first-episode schizophrenia patients. *J Psychiatr Res* 2014;48: 94-101.
- Geddes J, Freemantle N, Harrison P, Bebbington P. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: systematic overview and meta-regression analysis. *BMJ* 2000;321: 1371-6.
- Gejman PV, Sanders AR, Kendler KS. Genetics of schizophrenia: new findings and challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011;12: 121-44.
- Glatt SJ, Stone WS, Nossova N, Liew CC, Seidman LJ, Tsuang MT. Similarities and differences in peripheral blood gene-expression signatures of individuals with schizophrenia and their first-degree biological relatives. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2011;156B: 869-87.
- Gordon N. Segawa's disease: dopa-responsive dystonia. *Int J Clin Pract* 2008;62: 943-6.

Gore FM, Bloem PJ, Patton GC, Ferguson J, Joseph V, Coffey C, et al. Global burden of disease in young people aged 10-24 years: a systematic analysis. *Lancet* 2011;377: 2093-102.

Gottesman, II, Erlenmeyer-Kimling L. Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophr Res* 2001;51: 93-102.

Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, et al. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 9341-6.

Grimm JW, See RE. Unique activation of extracellular striato-pallidal neurotransmitters in rats following acute risperidone. *Brain Res* 1998;801: 182-9.

Guerreiro JR, Winnischofer SM, Bastos MF, Portaro FC, Sogayar MC, de Camargo AC, et al. Cloning and characterization of the human and rabbit NUDEL-oligopeptidase promoters and their negative regulation. *Biochim Biophys Acta* 2005;1730: 77-84.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57: 1061-9.

Guidotti A, Ruzicka W, Grayson DR, Veldic M, Pinna G, Davis JM, et al. S-adenosyl methionine and DNA methyltransferase-1 mRNA overexpression in psychosis. *Neuroreport* 2007;18: 57-60.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Dong E, Gavin DP, Grayson DR, et al. Toward the identification of peripheral epigenetic biomarkers of schizophrenia. *J Neurogenet* 2014;28: 41-52.

Guidotti A, Grayson DR. DNA methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. *Dialogues Clin Neurosci* 2014;16: 419-29.

Gunne LM, Haggstrom JE, Sjoquist B. Association with persistent neuroleptic-induced dyskinesia of regional changes in brain GABA synthesis. *Nature* 1984;309: 347-9.

Guo J, Yang Z, Song W, Chen Q, Wang F, Zhang Q, et al. Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. *Mol Biol Cell* 2006;17: 680-9.

Guo X, Li J, Wei Q, Fan X, Kennedy DN, Shen Y, et al. Duration of untreated psychosis is associated with temporal and occipitotemporal gray matter volume decrease in treatment naive schizophrenia. *PLoS One* 2013;8: e83679.

Gutierrez-Fernandez A, Gonzalez-Pinto A, Vega P, Barbeito S, Matute C. Expression of oligodendrocyte and myelin genes is not altered in peripheral blood cells of patients with first-episode schizophrenia and bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2010;12: 107-9.

- Harauz G, Ishiyama N, Hill CM, Bates IR, Libich DS, Fares C. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron* 2004;35: 503-42.
- Harding CM, Zubin J, Strauss JS. Chronicity in schizophrenia: revisited. *Br J Psychiatry Suppl* 1992;27-37.
- Haro JM, Kamath SA, Ochoa S, Novick D, Rele K, Fargas A, et al. The Clinical Global Impression-Schizophrenia scale: a simple instrument to measure the diversity of symptoms present in schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 2003;16-23.
- Harris MG, Henry LP, Harrigan SM, Purcell R, Schwartz OS, Farrelly SE, et al. The relationship between duration of untreated psychosis and outcome: an eight-year prospective study. *Schizophr Res* 2005;79: 85-93.
- Hattori T, Shimizu S, Koyama Y, Emoto H, Matsumoto Y, Kumamoto N, et al. DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1) regulates differentiation of oligodendrocytes. *PLoS One* 2014;9: e88506.
- Hayashi MA, Portaro FC, Bastos MF, Guerreiro JR, Oliveira V, Gorrao SS, et al. Inhibition of NUDEL (nuclear distribution element-like)-oligopeptidase activity by disrupted-in-schizophrenia 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 3828-33.
- Hayashi MA, Guerreiro JR, Charych E, Kamiya A, Barbosa RL, Machado MF, et al. Assessing the role of endooligopeptidase activity of Ndel1 (nuclear-distribution gene E homolog like-1) in neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 2010;44: 353-61.
- Hill CM, Harauz G. Charge effects modulate actin assembly by classic myelin basic protein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329: 362-9.
- Hill CM, Libich DS, Harauz G. Assembly of tubulin by classic myelin basic protein isoforms and regulation by post-translational modification. *Biochemistry* 2005;44: 16672-83.
- Hormozdiari F, Penn O, Borenstein E, Eichler EE. The discovery of integrated gene networks for autism and related disorders. *Genome Res* 2015;25: 142-54.
- Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009;35: 549-62.
- Huber G, Gross G, Schuttler R, Linz M. Longitudinal studies of schizophrenic patients. *Schizophr Bull* 1980;6: 592-605.
- Hwang Y, Kim J, Shin JY, Kim JI, Seo JS, Webster MJ, et al. Gene expression profiling by mRNA sequencing reveals increased expression of immune/inflammation-related genes in the hippocampus of individuals with schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2013;3: e321.

- Hyland K, Gunasekara RS, Munk-Martin TL, Arnold LA, Engle T. The hph-1 mouse: a model for dominantly inherited GTP-cyclohydrolase deficiency. *Ann Neurol* 2003;54 Suppl 6: S46-8.
- Ibrahim HM, Hogg AJ, Jr., Healy DJ, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000;157: 1811-23.
- Ibrahim HM, Tamminga CA. Schizophrenia: treatment targets beyond monoamine systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;51: 189-209.
- Ikegame T, Bundo M, Murata Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *J Hum Genet* 2013;58: 434-8.
- International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 2008;455: 237-41.
- Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T, et al. DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Neurosci* 2005;25: 5376-81.
- Iwata K, Cafe-Mendes CC, Schmitt A, Steiner J, Manabe T, Matsuzaki H, et al. The human oligodendrocyte proteome. *Proteomics* 2013;13: 3548-53.
- Jaillard S, Dubourg C, Gerard-Blanluet M, Delahaye A, Pasquier L, Dupont C, et al. 2q23.1 microdeletion identified by array comparative genomic hybridisation: an emerging phenotype with Angelman-like features? *J Med Genet* 2009;46: 847-55.
- Jasinska AJ, Service S, Choi OW, DeYoung J, Grujic O, Kong SY, et al. Identification of brain transcriptional variation reproduced in peripheral blood: an approach for mapping brain expression traits. *Hum Mol Genet* 2009;18: 4415-27.
- Jeppesen P, Petersen L, Thorup A, Abel MB, Ohlenschlaeger J, Christensen TO, et al. The association between pre-morbid adjustment, duration of untreated psychosis and outcome in first-episode psychosis. *Psychol Med* 2008;38: 1157-66.
- Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007;8: 253-62.
- Kabuyama Y, Suzuki T, Nakazawa N, Yamaki J, Homma MK, Homma Y. Dysregulation of very long chain acyl-CoA dehydrogenase coupled with lipid peroxidation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298: C107-13.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, et al. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 2005;7: 1167-78.

- Kamiya A, Tomoda T, Chang J, Takaki M, Zhan C, Morita M, et al. DISC1-NDEL1/NUDEL protein interaction, an essential component for neurite outgrowth, is modulated by genetic variations of DISC1. *Hum Mol Genet* 2006;15: 3313-23.
- Kang HJ, Kawasaki YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M, et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 2011;478: 483-9.
- Kapatos G, Stegenga SL, Hirayama K. Identification and characterization of basal and cyclic AMP response elements in the promoter of the rat GTP cyclohydrolase I gene. *J Biol Chem* 2000;275: 5947-57.
- Karayiorgou M, Morris MA, Morrow B, Shprintzen RJ, Goldberg R, Borrow J, et al. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 7612-6.
- Karayiorgou M, Gogos JA. The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;132: 95-104.
- Kavanagh DH, Tansey KE, O'Donovan MC, Owen MJ. Schizophrenia genetics: emerging themes for a complex disorder. *Mol Psychiatry* 2014.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987;13: 261-76.
- Kealey C, Roche S, Claffey E, McKeon P. Linkage and candidate gene analysis of 14q22-24 in bipolar disorder: support for GCHI as a novel susceptibility gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;136B: 75-80.
- Keshavan MS, Schooler NR. First-episode studies in schizophrenia: criteria and characterization. *Schizophr Bull* 1992;18: 491-513.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62: 617-27.
- Kikumoto O, Okamoto Y, Hayakawa H, Yokota N, Kawai K, Motohashi N, et al. [Effects of risperidone on catalepsy and cerebral dopamine, serotonin and GABA metabolism in the rat: comparison with haloperidol]. *Yakubutsu Seishin Kodo* 1993;13: 39-42.
- Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, et al. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron* 2009;63: 761-73.
- Kim YS, Choi YB, Lee JH, Yang SH, Cho JH, Shin CH, et al. Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of GCHI mutant allele. *Exp Mol Med* 2008;40: 271-5.

- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006;31: 89-97.
- Knapp M, Mangalore R, Simon J. The global costs of schizophrenia. *Schizophr Bull* 2004;30: 279-93.
- Kordi-Tamandani DM, Sahranavard R, Torkamanzehi A. DNA methylation and expression profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and dopamine transporter (DAT1) genes in patients with schizophrenia. *Mol Biol Rep* 2012;39: 10889-93.
- Kordi-Tamandani DM, Dahmardeh N, Torkamanzehi A. Evaluation of hypermethylation and expression pattern of GMR2, GMR5, GMR8, and GRIA3 in patients with schizophrenia. *Gene* 2013a;515: 163-6.
- Kordi-Tamandani DM, Sahranavard R, Torkamanzehi A. Analysis of association between dopamine receptor genes' methylation and their expression profile with the risk of schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2013b;23: 183-7.
- Kumarasinghe N, Beveridge NJ, Gardiner E, Scott RJ, Yasawardene S, Perera A, et al. Gene expression profiling in treatment-naive schizophrenia patients identifies abnormalities in biological pathways involving AKT1 that are corrected by antipsychotic medication. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16: 1483-503.
- Kundakovic M, Gudsnuk K, Herbstman JB, Tang D, Perera FP, Champagne FA. DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014.
- Kurian SM, Le-Niculescu H, Patel SD, Bertram D, Davis J, Dike C, et al. Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry* 2011;16: 37-58.
- Kuzman MR, Medved V, Terzic J, Krainc D. Genome-wide expression analysis of peripheral blood identifies candidate biomarkers for schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2009;43: 1073-7.
- Kwiecien JM, O'Connor LT, Goetz BD, Delaney KH, Fletch AL, Duncan ID. Morphological and morphometric studies of the dysmyelinating mutant, the Long Evans shaker rat. *J Neurocytol* 1998;27: 581-91.
- Lam AA, Hyland K, Heales SJ. Tetrahydrobiopterin availability, nitric oxide metabolism and glutathione status in the hph-1 mouse; implications for the pathogenesis and treatment of tetrahydrobiopterin deficiency states. *J Inherit Metab Dis* 2007;30: 256-62.
- Large M, Babidge N, Andrews D, Storey P, Nielssen O. Major self-mutilation in the first episode of psychosis. *Schizophr Bull* 2009;35: 1012-21.
- Larsen TK, Melle I, Auestad B, Friis S, Haahr U, Johannessen JO, et al. Early detection of first-episode psychosis: the effect on 1-year outcome. *Schizophr Bull* 2006;32: 758-64.

- Leitao RJ, Ferraz MB, Chaves AC, Mari JJ. Cost of schizophrenia: direct costs and use of resources in the State of Sao Paulo. *Rev Saude Publica* 2006;40: 304-9.
- Leucht S, Davis JM, Engel RR, Kissling W, Kane JM. Definitions of response and remission in schizophrenia: recommendations for their use and their presentation. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 2009;7-14.
- Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 2002;25: 409-32.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002;3: 662-73.
- Liang Y, Yu W, Li Y, Yang Z, Yan X, Huang Q, et al. Nudel functions in membrane traffic mainly through association with Lis1 and cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 2004;164: 557-66.
- Liang Y, Yu W, Li Y, Yu L, Zhang Q, Wang F, et al. Nudel modulates kinetochore association and function of cytoplasmic dynein in M phase. *Mol Biol Cell* 2007;18: 2656-66.
- Lieberman JA, Koreen AR, Chakos M, Sheitman B, Woerner M, Alvir JM, et al. Factors influencing treatment response and outcome of first-episode schizophrenia: implications for understanding the pathophysiology of schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 1996;57 Suppl 9: 5-9.
- Lima MS, Soares BG, Paoliello G, Machado Vieira R, Martins CM, Mota Neto JI, et al. The Portuguese version of the Clinical Global Impression-Schizophrenia Scale: validation study. *Rev Bras Psiquiatr* 2007;29: 246-9.
- Lindenmayer JP, Czobor P, Volavka J, Citrome L, Sheitman B, McEvoy JP, et al. Changes in glucose and cholesterol levels in patients with schizophrenia treated with typical or atypical antipsychotics. *Am J Psychiatry* 2003;160: 290-6.
- Lipska BK, Peters T, Hyde TM, Halim N, Horowitz C, Mitkus S, et al. Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Hum Mol Genet* 2006;15: 1245-58.
- Liu J, Chen J, Ehrlich S, Walton E, White T, Perrone-Bizzozero N, et al. Methylation Patterns in Whole Blood Correlate With Symptoms in Schizophrenia Patients. *Schizophr Bull* 2013a.
- Liu L, Yuan G, Cheng Z, Zhang G, Liu X, Zhang H. Identification of the mRNA expression status of the dopamine D2 receptor and dopamine transporter in peripheral blood lymphocytes of schizophrenia patients. *PLoS One* 2013b;8: e75259.
- Ma L, Tsai MY, Wang S, Lu B, Chen R, Iii JR, et al. Requirement for Nudel and dynein for assembly of the lamin B spindle matrix. *Nat Cell Biol* 2009;11: 247-56.

- Magri C, Gardella R, Barlati SD, Podavini D, Iatropoulos P, Bonomi S, et al. Glutamate AMPA receptor subunit 1 gene (GRIA1) and DSM-IV-TR schizophrenia: a pilot case-control association study in an Italian sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141B: 287-93.
- Malhotra D, Sebat J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 2012;148: 1223-41.
- Mamdani F, Martin MV, Lencz T, Rollins B, Robinson DG, Moon EA, et al. Coding and noncoding gene expression biomarkers in mood disorders and schizophrenia. *Dis Markers* 2013;35: 11-21.
- Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet* 2010;11: 285-96.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Maccarrone G, Hunyadi-Gulyas E, Eberlin MN, et al. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2009a;43: 978-86.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Rewerts C, Marangoni S, Novello JC, et al. Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe are revealed by shotgun proteome analysis. *J Neural Transm* 2009b;116: 275-89.
- Martins-de-Souza D. Proteome and transcriptome analysis suggests oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2010;44: 149-56.
- Marty MC, Alliot F, Rutin J, Fritz R, Trisler D, Pessac B. The myelin basic protein gene is expressed in differentiated blood cell lineages and in hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99: 8856-61.
- Maschietto M, Silva AR, Puga RD, Lima L, Pereira CB, Nakano EY, et al. Gene expression of peripheral blood lymphocytes may discriminate patients with schizophrenia from controls. *Psychiatry Res* 2012;200: 1018-21.
- Matthews PR, Eastwood SL, Harrison PJ. Reduced myelin basic protein and actin-related gene expression in visual cortex in schizophrenia. *PLoS One* 2012;7: e38211.
- Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science* 2012;337: 1190-5.
- McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, Addington AM, McClellan J, Yoon S, et al. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* 2009;41: 1223-7.

- McGorry PD, Cocks J, Power P, Burnett P, Harrigan S, Lambert T. Very low-dose risperidone in first-episode psychosis: a safe and effective way to initiate treatment. *Schizophr Res Treatment* 2011;2011: 631690.
- McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med* 2004;2: 13.
- Meador-Woodruff JH, Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;31: 288-94.
- Melas PA, Rogdaki M, Osby U, Schalling M, Lavebratt C, Ekstrom TJ. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *Faseb J* 2012;26: 2712-8.
- Melle I, Larsen TK, Haahr U, Friis S, Johannessen JO, Opjordsmoen S, et al. Reducing the duration of untreated first-episode psychosis: effects on clinical presentation. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61: 143-50.
- Menezes NM, Arenovich T, Zipursky RB. A systematic review of longitudinal outcome studies of first-episode psychosis. *Psychol Med* 2006;36: 1349-62.
- Menezes PR, Scazufca M, Busatto G, Coutinho LM, McGuire PK, Murray RM. Incidence of first-contact psychosis in Sao Paulo, Brazil. *Br J Psychiatry Suppl* 2007;51: s102-6.
- Middleton FA, Pato CN, Gentile KL, McGann L, Brown AM, Trauzzi M, et al. Gene expression analysis of peripheral blood leukocytes from discordant sib-pairs with schizophrenia and bipolar disorder reveals points of convergence between genetic and functional genomic approaches. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;136B: 12-25.
- Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, et al. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet* 2008;82: 696-711.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, et al. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2000;9: 1415-23.
- Millar JK, James R, Brandon NJ, Thomson PA. DISC1 and DISC2: discovering and dissecting molecular mechanisms underlying psychiatric illness. *Ann Med* 2004;36: 367-78.
- Mitchell AC, Jiang Y, Peter C, Akbarian S. Transcriptional regulation of GAD1 GABA synthesis gene in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Schizophr Res* 2014.
- Mori D, Yano Y, Toyooka K, Yoshida N, Yamada M, Muramatsu M, et al. NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol* 2007;27: 352-67.

- Mori D, Yamada M, Mimori-Kiyosue Y, Shirai Y, Suzuki A, Ohno S, et al. An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat Cell Biol* 2009;11: 1057-68.
- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 2003;12: 1591-608.
- Muller C, Bauer NM, Schafer I, White R. Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front Cell Neurosci* 2013;7: 169.
- Murdoch H, Mackie S, Collins DM, Hill EV, Bolger GB, Klussmann E, et al. Isoform-selective susceptibility of DISC1/phosphodiesterase-4 complexes to dissociation by elevated intracellular cAMP levels. *J Neurosci* 2007;27: 9513-24.
- Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 1999;56: 940-5.
- Narayan S, Kass KE, Thomas EA. Chronic haloperidol treatment results in a decrease in the expression of myelin/oligodendrocyte-related genes in the mouse brain. *J Neurosci Res* 2007;85: 757-65.
- Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, et al. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res* 2012;22: 467-77.
- Nguyen MD, Shu T, Sanada K, Lariviere RC, Tseng HC, Park SK, et al. A NUDEL-dependent mechanism of neurofilament assembly regulates the integrity of CNS neurons. *Nat Cell Biol* 2004;6: 595-608.
- Nicodemus KK, Callicott JH, Higier RG, Luna A, Nixon DC, Lipska BK, et al. Evidence of statistical epistasis between DISC1, CIT and NDEL1 impacting risk for schizophrenia: biological validation with functional neuroimaging. *Hum Genet* 2010;127: 441-52.
- Nicolae DL, Gamazon E, Zhang W, Duan S, Dolan ME, Cox NJ. Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genet* 2010;6: e1000888.
- Nielssen OB, Malhi GS, McGorry PD, Large MM. Overview of violence to self and others during the first episode of psychosis. *J Clin Psychiatry* 2012;73: e580-7.
- Niethammer M, Smith DS, Ayala R, Peng J, Ko J, Lee MS, et al. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* 2000;28: 697-711.

- Nishioka M, Bundo M, Koike S, Takizawa R, Kakiuchi C, Araki T, et al. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. *J Hum Genet* 2013;58: 91-7.
- Nordentoft M, Laursen TM, Agerbo E, Qin P, Hoyer EH, Mortensen PB. Change in suicide rates for patients with schizophrenia in Denmark, 1981-97: nested case-control study. *BMJ* 2004;329: 261.
- Nordentoft M, Mortensen PB, Pedersen CB. Absolute risk of suicide after first hospital contact in mental disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2011;68: 1058-64.
- Nordentoft M, Rasmussen JO, Melau M, Hjorthoj CR, Thorup AA. How successful are first episode programs? A review of the evidence for specialized assertive early intervention. *Curr Opin Psychiatry* 2014;27: 167-72.
- Numata S, Ueno S, Iga J, Yamauchi K, Hongwei S, Hashimoto R, et al. TGFBR2 gene expression and genetic association with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2008;42: 425-32.
- Oosthuizen P, Emsley RA, Keyter N, Niehaus DJ, Koen L. Duration of untreated psychosis and outcome in first-episode psychosis. Perspective from a developing country. *Acta Psychiatr Scand* 2005;111: 214-9.
- Ota VK, Belangero SI, Gadelha A, Bellucco FT, Christofolini DM, Mancini TI, et al. The UFD1L rs5992403 polymorphism is associated with age at onset of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2010;44: 1113-5.
- Ota VK, Berberian AA, Gadelha A, Santoro ML, Ottoni GL, Matsuzaka CT, et al. Polymorphisms in schizophrenia candidate gene UFD1L may contribute to cognitive deficits. *Psychiatry Res* 2013a;209: 110-3.
- Ota VK, Gadelha A, Assuncao IB, Santoro ML, Christofolini DM, Bellucco FT, et al. ZDHHC8 gene may play a role in cortical volumes of patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2013b;145: 33-5.
- Ota VK, Gadelha A, Pellegrino R, Santoro ML, Bellucco FT, Christofolini DM, et al. Candidate genes for schizophrenia in a mixed Brazilian population using pooled DNA. *Psychiatry Res* 2013c;208: 201-2.
- Ota VK, Noto C, Gadelha A, Santoro ML, Silva PN, Melaragno MI, et al. Neurotransmitter receptor and regulatory gene expression in peripheral blood of Brazilian drug-naive first-episode psychosis patients before and after antipsychotic treatment. *Psychiatry Res* 2013d;210: 1290-2.
- Ota VK, Bellucco FT, Gadelha A, Santoro ML, Noto C, Christofolini DM, et al. PRODH polymorphisms, cortical volumes and thickness in schizophrenia. *PLoS One* 2014a;9: e87686.

- Ota VK, Noto C, Gadelha A, Santoro ML, Ortiz BB, Andrade EH, et al. Evaluation of neurotransmitter receptor gene expression identifies GABA receptor changes: a follow-up study in antipsychotic-naive patients with first-episode psychosis. *J Psychiatr Res* 2014b;56: 130-6.
- Ota VK, Noto C, Gadelha A, Santoro ML, Spindola LM, Gouvea ES, et al. Changes in gene expression and methylation in the blood of patients with first-episode psychosis. *Schizophr Res* 2014c;159: 358-64.
- Ott J, Kamatani Y, Lathrop M. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2011;12: 465-74.
- Ouchi Y, Kubota Y, Kuramasu A, Watanabe T, Ito C. Gene expression profiling in whole cerebral cortices of phencyclidine- or methamphetamine-treated rats. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;140: 142-9.
- Ozeki Y, Tomoda T, Kleiderlein J, Kamiya A, Bord L, Fujii K, et al. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 289-94.
- Park Y, Kuroda MI. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *Science* 2001;293: 1083-5.
- Parlapani E, Schmitt A, Erdmann A, Bernstein HG, Breunig B, Gruber O, et al. Association between myelin basic protein expression and left entorhinal cortex pre-alpha cell layer disorganization in schizophrenia. *Brain Res* 2009;1301: 126-34.
- Perkins DO, Gu H, Boteva K, Lieberman JA. Relationship between duration of untreated psychosis and outcome in first-episode schizophrenia: a critical review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 2005;162: 1785-804.
- Petronis A, Gottesman, II, Kan P, Kennedy JL, Basile VS, Paterson AD, et al. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr Bull* 2003;29: 169-78.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001;276: 36734-41.
- Plomin R, DeFries JC, McClearn GE, McGuffin P. Schizophrenia. In: Behavioral genetics. ed. New York: Worth Publishers; 2008.
- Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, Massart R, Ruggiero A, Wang D, et al. The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *J Neurosci* 2012;32: 15626-42.

Pulver AE, Nestadt G, Goldberg R, Shprintzen RJ, Lamacz M, Wolyniec PS, et al. Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. *J Nerv Ment Dis* 1994;182: 476-8.

Readhead C, Hood L. The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shimld). *Behav Genet* 1990;20: 213-34.

Reiner O. LIS1. let's interact sometimes... (part 1). *Neuron* 2000;28: 633-6.

Reiner O, Cahana A, Escamez T, Martinez S. LIS1-no more no less. *Mol Psychiatry* 2002;7: 12-6.

Richards AL, Jones L, Moskvina V, Kirov G, Gejman PV, Levinson DF, et al. Schizophrenia susceptibility alleles are enriched for alleles that affect gene expression in adult human brain. *Mol Psychiatry* 2012;17: 193-201.

Richardson MA, Read LL, Reilly MA, Clelland JD, Clelland CL. Analysis of plasma biopterin levels in psychiatric disorders suggests a common BH4 deficit in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Neurochem Res* 2007;32: 107-13.

Riecher-Rossler A, Rossler W. The course of schizophrenic psychoses: what do we really know? A selective review from an epidemiological perspective. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1998;248: 189-202.

Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kahler AK, Akterin S, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet* 2013;45: 1150-9.

Rollins B, Martin MV, Morgan L, Vawter MP. Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;153B: 919-36.

Rosenbloom M. Chlorpromazine and the psychopharmacologic revolution. *Jama* 2002;287: 1860-1.

Rossler W, Salize HJ, van Os J, Riecher-Rossler A. Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15: 399-409.

Rund BR, Melle I, Friis S, Larsen TK, Midboe LJ, Opjordsmoen S, et al. Neurocognitive dysfunction in first-episode psychosis: correlates with symptoms, premorbid adjustment, and duration of untreated psychosis. *Am J Psychiatry* 2004;161: 466-72.

Sadahiro R, Suzuki A, Matsumoto Y, Shibuya N, Enokido M, Kamata M, et al. Functional polymorphism of the GTP cyclohydrolase 1 gene affects the personality trait of novelty seeking in healthy subjects. *Neurosci Lett* 2011;503: 220-3.

- Saetre P, Emilsson L, Axelsson E, Kreuger J, Lindholm E, Jazin E. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. *BMC Psychiatry* 2007;7: 46.
- Sainz J, Mata I, Barrera J, Perez-Iglesias R, Varela I, Arranz MJ, et al. Inflammatory and immune response genes have significantly altered expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2013;18: 1056-7.
- Salinas PC, Zou Y. Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci* 2008;31: 339-58.
- Sanders AR, Goring HH, Duan J, Drigalenko EI, Moy W, Freda J, et al. Transcriptome study of differential expression in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2013;22: 5001-14.
- Sasaki S, Mori D, Toyo-oka K, Chen A, Garrett-Beal L, Muramatsu M, et al. Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2005;25: 7812-27.
- Schimmelmann BG, Huber CG, Lambert M, Cotton S, McGorry PD, Conus P. Impact of duration of untreated psychosis on pre-treatment, baseline, and outcome characteristics in an epidemiological first-episode psychosis cohort. *J Psychiatr Res* 2008;42: 982-90.
- Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 2011;43: 969-76.
- Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study GWAS Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 2011;43: 969-76.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 2014;511: 421-7.
- Schmitt A, Leonardi-Essmann F, Durrenberger PF, Parlapani E, Schneider-Axmann T, Spanagel R, et al. Regulation of immune-modulatory genes in left superior temporal cortex of schizophrenia patients: a genome-wide microarray study. *World J Biol Psychiatry* 2011;12: 201-15.
- Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1987;1: 133-52.
- Sequeira PA, Martin MV, Vawter MP. The first decade and beyond of transcriptional profiling in schizophrenia. *Neurobiol Dis* 2012;45: 23-36.
- Sernyak MJ, Leslie DL, Alarcon RD, Losonczy MF, Rosenheck R. Association of diabetes mellitus with use of atypical neuroleptics in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2002;159: 561-6.
- Sharma RP. Schizophrenia, epigenetics and ligand-activated nuclear receptors: a framework for chromatin therapeutics. *Schizophr Res* 2005;72: 79-90.

- Shen Y, Li N, Wu S, Zhou Y, Shan Y, Zhang Q, et al. Nudel binds Cdc42GAP to modulate Cdc42 activity at the leading edge of migrating cells. *Dev Cell* 2008;14: 342-53.
- Shepherd M, Watt D, Falloon I, Smeeton N. The natural history of schizophrenia: a five-year follow-up study of outcome and prediction in a representative sample of schizophrenics. *Psychol Med Monogr Suppl* 1989;15: 1-46.
- Shim SY, Samuels BA, Wang J, Neumayer G, Belzil C, Ayala R, et al. Ndel1 controls the dynein-mediated transport of vimentin during neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2008;283: 12232-40.
- Shimabukuro M, Sasaki T, Imamura A, Tsujita T, Fuke C, Umekage T, et al. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2007;41: 1042-6.
- Shmueli A, Segal M, Sapir T, Tsutsumi R, Noritake J, Bar A, et al. Ndel1 palmitoylation: a new mean to regulate cytoplasmic dynein activity. *EMBO J* 2010;29: 107-19.
- Shu T, Ayala R, Nguyen MD, Xie Z, Gleeson JG, Tsai LH. Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 2004;44: 263-77.
- Smith GS, Paez PM, Spreuer V, Campagnoni CW, Boggs JM, Campagnoni AT, et al. Classical 18.5- and 21.5-kDa isoforms of myelin basic protein inhibit calcium influx into oligodendroglial cells, in contrast to golli isoforms. *J Neurosci Res* 2011;89: 467-80.
- St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, et al. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 1990;336: 13-6.
- Stahl SM. *Psicofarmacologia: Bases neurocientíficas e aplicações práticas*. 3ª edição Guanabara Koogan; 2010
- Stec I, Nagl SB, van Ommen GJ, den Dunnen JT. The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Lett* 2000;473: 1-5.
- Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietilainen OP, Ingason A, Steinberg S, et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 2008;455: 232-6.
- Steiner J, Bielau H, Bernstein HG, Bogerts B, Wunderlich MT. Increased cerebrospinal fluid and serum levels of S100B in first-onset schizophrenia are not related to a degenerative release of glial fibrillar acidic protein, myelin basic protein and neurone-specific enolase from glia or neurones. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77: 1284-7.

- Stevens H, Agerbo E, Dean K, Nordentoft M, Nielsen PR, Mortensen PB. Offending prior to first psychiatric contact: a population-based register study. *Psychol Med* 2012;42: 2673-84.
- Sugai T, Kawamura M, Iritani S, Araki K, Makifuchi T, Imai C, et al. Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA microarray: impact on glial and neurotrophic gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1025: 84-91.
- Sullivan PF, Fan C, Perou CM. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141B: 261-8.
- Suzuki K, Nakamura K, Iwata Y, Sekine Y, Kawai M, Sugihara G, et al. Decreased expression of reelin receptor VLDLR in peripheral lymphocytes of drug-naive schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2008;98: 148-56.
- Takahashi M, Hayashi H, Watanabe Y, Sawamura K, Fukui N, Watanabe J, et al. Diagnostic classification of schizophrenia by neural network analysis of blood-based gene expression signatures. *Schizophr Res* 2010;119: 210-8.
- Talkowski ME, Mullegama SV, Rosenfeld JA, van Bon BW, Shen Y, Repnikova EA, et al. Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 2011;89: 551-63.
- Taya S, Shinoda T, Tsuboi D, Asaki J, Nagai K, Hikita T, et al. DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci* 2007;27: 15-26.
- Tienari P, Wynne LC, Sorri A, Lahti I, Laksy K, Moring J, et al. Genotype-environment interaction in schizophrenia-spectrum disorder. Long-term follow-up study of Finnish adoptees. *Br J Psychiatry* 2004;184: 216-22.
- Tirupati NS, Rangaswamy T, Raman P. Duration of untreated psychosis and treatment outcome in schizophrenia patients untreated for many years. *Aust N Z J Psychiatry* 2004;38: 339-43.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* 2003;362: 798-805.
- Toth C, Shim SY, Wang J, Jiang Y, Neumayer G, Belzil C, et al. Ndel1 promotes axon regeneration via intermediate filaments. *PLoS One* 2008;3: e2014.
- Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, et al. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet* 2003;34: 274-85.

- Toyo-Oka K, Sasaki S, Yano Y, Mori D, Kobayashi T, Toyoshima YY, et al. Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. *Hum Mol Genet* 2005;14: 3113-28.
- Tremolizzo L, Doueiri MS, Dong E, Grayson DR, Davis J, Pinna G, et al. Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. *Biol Psychiatry* 2005;57: 500-9.
- Tsuang MT, Nossova N, Yager T, Tsuang MM, Guo SC, Shyu KG, et al. Assessing the validity of blood-based gene expression profiles for the classification of schizophrenia and bipolar disorder: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;133B: 1-5.
- Turecki G, Ota VK, Belangero SI, Jackowski A, Kaufman J. Early life adversity, genomic plasticity, and psychopathology. *The Lancet Psychiatry* 2014;1: 461-66.
- van Bon BW, Koolen DA, Brueton L, McMullan D, Lichtenbelt KD, Ades LC, et al. The 2q23.1 microdeletion syndrome: clinical and behavioural phenotype. *Eur J Hum Genet* 2010;18: 163-70.
- van Eijk KR, de Jong S, Strengman E, Buizer-Voskamp JE, Kahn RS, Boks MP, et al. Identification of schizophrenia-associated loci by combining DNA methylation and gene expression data from whole blood. *Eur J Hum Genet* 2014.
- van Os J, Fahy TA, Jones P, Harvey I, Sham P, Lewis S, et al. Psychopathological syndromes in the functional psychoses: associations with course and outcome. *Psychol Med* 1996;26: 161-76.
- van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature* 2010;468: 203-12.
- Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, Davis J, Satta R, Grayson DR, et al. DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 348-53.
- Veldic M, Guidotti A, Maloku E, Davis JM, Costa E. In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 2152-7.
- Vessoni AL (1993). Adaptação e estudo de confiabilidade da escala de avaliação das síndromes positiva e negativa para a esquizofrenia no Brasil. São Paulo Escola Paulista de Medicina.
- Visscher PM, Goddard ME, Derks EM, Wray NR. Evidence-based psychiatric genetics, AKA the false dichotomy between common and rare variant hypotheses. *Mol Psychiatry* 2012;17: 474-85.

- Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, et al. Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007;81: 768-79.
- Wang G, Hu C, Jiang T, Luo J, Hu J, Ling S, et al. Overexpression of serotonin receptor and transporter mRNA in blood leukocytes of antipsychotic-free and antipsychotic-naive schizophrenic patients: gender differences. *Schizophr Res* 2010a;121: 160-71.
- Wang KS, Liu XF, Aragam N. A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* 2010b;124: 192-9.
- Wassef A, Baker J, Kochan LD. GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* 2003;23: 601-40.
- Wender PH, Rosenthal D, Kety SS, Schulsinger F, Welner J. Crossfostering. A research strategy for clarifying the role of genetic and experiential factors in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1974;30: 121-8.
- Williams SR, Mullegama SV, Rosenfeld JA, Dagli AI, Hatchwell E, Allen WP, et al. Haploinsufficiency of MBD5 associated with a syndrome involving microcephaly, intellectual disabilities, severe speech impairment, and seizures. *Eur J Hum Genet* 2010;18: 436-41.
- World Health Organization (2013). *Mental Health Action Plan 2013-2020*. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- Wu EQ, Birnbaum HG, Shi L, Ball DE, Kessler RC, Moulis M, et al. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2002. *J Clin Psychiatry* 2005;66: 1122-9.
- Wu H, Zeng H, Lam R, Tempel W, Amaya MF, Xu C, et al. Structural and histone binding ability characterizations of human PWWP domains. *PLoS One* 2011;6: e18919.
- Wunderink A, Nienhuis FJ, Sytema S, Wiersma D. Treatment delay and response rate in first episode psychosis. *Acta Psychiatr Scand* 2006;113: 332-9.
- Wyatt RJ, Termini BA, Davis J. Biochemical and sleep studies of schizophrenia. A review of the literature 1960-1970. *Schizophr Res* 1971;4: 10-14.
- Xiong P, Zeng Y, Wu Q, Han Huang DX, Zainal H, Xu X, et al. Combining serum protein concentrations to diagnose schizophrenia: a preliminary exploration. *J Clin Psychiatry* 2014;75: e794-801.
- Xu J, Sun J, Chen J, Wang L, Li A, Helm M, et al. RNA-Seq analysis implicates dysregulation of the immune system in schizophrenia. *BMC Genomics* 2012;13 Suppl 8: S2.
- Xu J, He G, Zhu J, Zhou X, St Clair D, Wang T, et al. Prenatal nutrition deficiency reprogramed postnatal gene expression in mammals brain: Implications for schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014.

- Yamada M, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, et al. LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *EMBO J* 2008;27: 2471-83.
- Youn YH, Pramparo T, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. Distinct dose-dependent cortical neuronal migration and neurite extension defects in Lis1 and Ndel1 mutant mice. *J Neurosci* 2009;29: 15520-30.
- Zhang HX, Zhao JP, Lv LX, Li WQ, Xu L, Ouyang X, et al. Explorative study on the expression of neuregulin-1 gene in peripheral blood of schizophrenia. *Neurosci Lett* 2008;438: 1-5.
- Zhang Q, Wang F, Cao J, Shen Y, Huang Q, Bao L, et al. Nudel promotes axonal lysosome clearance and endo-lysosome formation via dynein-mediated transport. *Traffic* 2009;10: 1337-49.
- Zhao X, Li H, Shi Y, Tang R, Chen W, Liu J, et al. Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene GRIN1 and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006;59: 747-53.
- Zhou Y, Wang J, Lu X, Song X, Ye Y, Zhou J, et al. Evaluation of six SNPs of MicroRNA machinery genes and risk of schizophrenia. *J Mol Neurosci* 2013;49: 594-9.
- Zhubi A, Veldic M, Puri NV, Kadriu B, Caruncho H, Loza I, et al. An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes. *Schizophr Res* 2009;111: 115-22.

8 ABSTRACT

Schizophrenia is the most severe and disabling mental disorder among psychiatric disorders. The delay in providing appropriate treatment and the duration of the first episode of psychosis (FEP) are among the main factors of poor prognosis of the disease. In this study we investigated genetic and epigenetic markers for the treatment of schizophrenia through the study of the expression of target genes and the pattern of DNA methylation. Meanwhile, in neural progenitor cells, we study the effect of gene interactions and the silencing of *MBD5* gene (Methyl-CpG Binding Domain Protein 5), which is important for brain development and possibly related to DNA methylation. For the first study, patients with antipsychotic-naïve FEP patients and healthy controls underwent clinical assessment and collection of peripheral blood. Patients were reevaluated with the same tests after two months of risperidone treatment, and part of them were also reassessed after one year, at those moments blood was also collected. DNA and RNA were extracted from blood. Gene expression was assessed by real-time PCR, and methylation analysis by sequencing after sodium bisulfite conversion. For the functional studies, the silencing of *MBD5* gene was performed in neural progenitor cells, which underwent RNA sequencing, real-time PCR, Western blotting and flow cytometry. The results indicated that *GCH1* (GTP cyclohydrolase 1) was downregulated and *NDEL1* (nude neurodevelopment protein 1-like 1) and *MBP* (myelin basic protein) were upregulated in the blood of FEP patients compared to healthy controls. Comparing the patients before and after treatment, *GABRR2* gene (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 2) was shown to be downregulated after risperidone treatment. In addition, *GCH1* seems to be regulated by DNA methylation. As for the functional study, we found that *MBD5* knockdown led to an imbalance between proliferation and differentiation of neural progenitor cells. These data indicated three genes that may be involved in psychosis *per se*, and is related to the dopaminergic and serotonergic pathways (*GCH1*), neurodevelopment (*NDEL1*) and myelination (*MBP*). Furthermore, *GABRR2* gene, although it does not seem to be a direct target of risperidone, can be associated with response to treatment or disease progression, thus indicating the importance of the GABA pathway. These data may be further investigated to identify biological markers for both the psychosis and for schizophrenia treatment, helping in the early intervention and resulting in the reduction of the duration of untreated psychosis, which can result in a decreased morbidity

and improved quality of life for patients. We also observed that the *MBD5* knockdown, a gene involved in neurodevelopmental diseases, promotes a more differentiated state than proliferative of neural progenitor cells, a phenotype that seems to be presented in the knockdown of other genes involved in these diseases, and hence may be a convergent mechanism of neurodevelopmental disorders such as autism, intellectual disability and schizophrenia.

APÊNDICES

Apêndice 1: Christofolini et al. *Schizophrenia Research*, 2011

Schizophrenia Research 132 (2011) 99–100



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

Letter to the Editor

Assessment of 22q11.2 copy number variations in a sample of Brazilian schizophrenia patients

Dear Editors,

1. Introduction

The 22q11.2 deletion is one of the most important known risk factor for developing schizophrenia (Levinson et al., 2011). While in the general population the prevalence of chromosome 22q11.2 deletions is one in 4000 individuals, among patients with schizophrenia, the number seems to be increased. However, the exact proportion of the patients whose disease is explained by the presence of the deletion is still in debate.

Initial studies proposed that 2% of schizophrenia patients would present the deletion (Karayiorgou et al., 1995; Lindsay et al., 1995). Later studies however, have found prevalence with values ranging from 5.3% in a study of patients with childhood onset schizophrenia (Sporn et al., 2004) to 1% or less in studies with ethnically different populations (Hoogendoorn et al., 2008).

The microduplication on the 22q11.2 region has been also associated with neuropsychiatric disorders. However, studies fail to find 22q11.2 duplications in patients with schizophrenia (Brunet et al., 2008).

Thus, the objective of this work was to investigate the prevalence of the 22q11.2 copy number variation (CNV) in a sample of Brazilian patients with schizophrenia.

2. Methods

Patients, ages ranging from 18 to 65 years, were consecutively recruited from an outpatient clinic, the Schizophrenia Program (PROESQ) of Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A total of 158 patients with schizophrenia agreed to participate. Patients were not selected by clinical characteristics of the 22q11.2 deletion. The diagnosis was confirmed by SCID applied by trained psychiatrists. The clinical assessment also included PANSS, Calgary Depression Scale, CGI and GAF. All the patients enrolled in the present study have been followed in our service for at least two years. The exclusion criteria were not fulfilling diagnosis for schizophrenia. None of the subjects assessed were excluded. The Research Ethics Committee of UNIFESP approved this study and all participants or legal representatives signed an informed consent.

The MLPA P250 DiGeorge assay was performed on DNA extracted from lymphocytes, as described by the manufacturer (MRC-Holland®, Amsterdam, The Netherlands). Karyotype analysis was performed in metaphase cells from lymphocyte cultures prepared according to standard protocols. To confirm MLPA positive results, FISH technique was performed using a commercial set of probes that includes the *TUPLE1* gene and a control probe of chromosome 22 (Cytocell®, Cambridge, UK).

3. Results and discussion

The patients enrolled in the present study have a mean age of 36.1 ± 10.1 years, with a greater proportion of men (70.3%) as compared to women (29.7%). There is a predominance of chronic patients with a mean duration of illness of 14.5 ± 8.6 years. As a specialized clinic, we are a referral for severe cases and 53.5% of patients in this sample are refractory to treatment (IPAP criteria).

All 158 patients showed normal karyotypes, six of which presented normal heteromorphisms of chromosome 9 (9 ph), observed in four patients, and chromosome 16 (16qh+), observed in two patients. Patient's parents were also investigated and presented normal karyotypes and FISH results.

A prevalence of 0.6% of the deletion was found in our samples. This prevalence is in accordance to the expected in adults with schizophrenia (Bassett and Chow, 2008). The commonly deleted region of 22q11.2 contains 3 Mb and is flanked by LCR22A-LCR22D (low copy repeat), corresponding to 87% of deletion cases, while the 1.5 Mb deletion, flanked by LCR22A and LCR22B, is found in a small proportion of patients (8%) (Shaikh et al., 2000).

In the MLPA analysis of one patient, the probe for *CLTCL1* through *MED15* demonstrated peak ratios relative to a reference lower than 0.7, suggesting a deletion between LCR22A through LCR22B, relative to a 1.5 Mb deletion in heterozygosis. Results were confirmed by FISH. No other rearrangements, such as microduplications or atypical deletions, were found in the 22q11.2 region.

The patient is the first of three children of a healthy, nonconsanguineous couple. The family history was unremarkable. His first psychotic event occurred at 26 years of age; however, the family had observed inconstant behavior with aggression and alienation periods since adolescence. At 30 years and 10 months old, his height was 182.5 cm, weight 143 kg, and head circumference 60 cm ($>97\%$ ile), showing obesity (IMC = 42.9) and macrocrania. The patient's physical features included a long face, short forehead, down-slanting and short palpebral fissures, prominent nasal bridge with a bulbous nasal tip, hypoplastic alae nasi, long and discrete philtrum, small ear lobes with a thick edge of the helices, and a narrow and high palate. Serum calcium levels were normal and the echocardiogram showed no structural heart abnormality. The patient presented neither nasal speech nor velopharyngeal insufficiency.

In conclusion, the prevalence of the deletion in a Brazilian sample is in agreement with the latest studies and suggests that the 22q11.2 deletion is an important model to comprehend genetic influence for the risk of schizophrenia.

Role of the funding source

Funding of this study was provided by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Brazil. FAPESP had no further role in the study design, analyses and interpretation of the data, in writing of the manuscript, and in the decision to submit the paper for publication.

Acknowledgements

We want to thank all subjects for their participation in this study.

Apêndice 2: Ota et al. *Schizophrenia Research*, 2012

Schizophrenia Research 142 (2012) 206–208



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

DRD1 rs4532 polymorphism: A potential pharmacogenomic marker for treatment response to antipsychotic drugs

Vanessa Kiyomi Ota^{a,b,1}, Letícia Nery Spíndola^{a,1}, Ary Gadelha^b, Airton Ferreira dos Santos Filho^b, Marcos Leite Santoro^{a,b}, Denise Maria Christofolini^c, Fernanda Teixeira Bellucco^a, Ândrea Kely Ribeiro-dos-Santos^d, Sidney Santos^d, Jair de Jesus Mari^b, Maria Isabel Melaragno^a, Rodrigo Affonseca Bressan^b, Marília de Arruda Cardoso Smith^a, Sítia Iole Belangero^{a,b,*}

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^b LINC – Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^c Disciplina de Genética e Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina do ABC (FMABC), Santo André, Brazil

^d Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2012

Received in revised form 1 August 2012

Accepted 3 August 2012

Available online 1 October 2012

Keywords:

Schizophrenia

DRD1

Pharmacogenomics

Treatment-resistant

Antipsychotic

Dopamine

ABSTRACT

We investigated the association of dopamine receptor D1 gene (*DRD1*) rs4532 polymorphism with antipsychotic treatment response in schizophrenia. We have analyzed 124 patients with schizophrenia, consisting of 59 treatment resistant (TR) and 65 non-TR. We found an association between G-allele and TR schizophrenia ($p=0.001$; adjusted OR=2.71). Setting the common AA-genotype as reference, the GG-homozygous presented a five-fold risk compared to AA-homozygous ($p=0.010$; OR=5.56) with an intermediate result for AG-genotype ($p=0.030$; adjusted OR=2.64). The *DRD1* rs4532 polymorphism showed a dose-response gradient with increased risk for treatment resistance and may be a potential pharmacogenetic marker for antipsychotic drug treatment response.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia is a complex disease that results from an interaction between genetic and environmental factors. Antipsychotic medication is the major treatment for schizophrenia, however, the overall response is still limited: it is estimated that 20–30% of patients with schizophrenia do not respond to treatment with conventional antipsychotics (Kane et al., 1988). Patients with treatment-resistant schizophrenia (TRS) have persistent psychotic symptoms combined with poor social/work function (Conley and Kelly, 2001). It has been suggested that TRS is a distinct and homogenous subgroup of schizophrenia (Meltzer et al.,

1997), and genome-wide association studies have been undertaken to investigate the genetic factors that underlie treatment response in schizophrenia (McClay et al., 2010; Liou et al., 2012).

Converging evidence has shown a dysregulation of dopaminergic neurotransmission in schizophrenia (Abi-Dargham and Moore, 2003; Howes et al., in press), and, hence, some studies have investigated the role of genes involved in this pathway (Talkowski et al., 2008). The whole cerebral cortex, including the prefrontal cortex, is rich in dopamine D1 receptors (De Keyser et al., 1988), which stimulates adenylyl cyclase, increasing cAMP levels. *In vivo* positron emission tomography studies in schizophrenia have found an association of D1 levels with cognitive impairment and negative symptoms (Okubo et al., 1997; Abi-Dargham et al., 2002). Abi-Dargham et al. (2012) have suggested that D1 receptors are upregulated in schizophrenia, which is related to the illness itself, and may be normalized by chronic antipsychotic administration (Abi-Dargham et al., 2012). Additionally, chronic administration of antipsychotic drugs, even those that devoid of any D1 antagonism, induces downregulation of prefrontal D1 receptors in primates, indicating that it may represent a compensatory mechanism induced by chronic D2 receptor blockade (Lidow et al., 1997). Furthermore, one of the putative mechanisms for the superiority of the antipsychotic clozapine in TRS may be its affinity for D1 receptors (Tauscher et al., 2004).

* Corresponding author at: Disciplina de Genética/UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Ed. Leita da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4260; fax: +55 11 5576 4264.

E-mail addresses: vanessakaota@gmail.com (V.K. Ota), leticia.n.spindola@gmail.com (L.N. Spíndola), aryarripe@yahoo.com.br (A. Gadelha), airton_fsantos@yahoo.com.br (A.F. Santos Filho), santorogen@gmail.com (M.L. Santoro), denise.morfi@gmail.com (D.M. Christofolini), fernandatsb@gmail.com (F.T. Bellucco), akely@ufpa.br (Â.K. Ribeiro-dos-Santos), sidney.santos@pq.cnpq.br (S. Santos), jamari17@gmail.com (J.J. Mari), melaragno.morfi@epm.br (M.L. Melaragno), rodrigoabressan@gmail.com (R.A. Bressan), macsmith.morfi@epm.br (M.A.C. Smith), sinogueira@gmail.com (S.I. Belangero).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Apêndice 3: Gadelha et al. *PloS One*, 2012

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Linkage Replication for Chromosomal Region 13q32 in Schizophrenia: Evidence from a Brazilian Pilot Study on Early Onset Schizophrenia Families

Ary Gadelha^{1*}, Vanessa Kiyomi Ota^{1,2}, Jose Paya Cano³, Maria Isabel Melaragno², Marilia A. C. Smith², Jair de Jesus Mari¹, Rodrigo A. Bressan¹, Sintia Iole Belangero^{1,2}, Gerome Breen^{3,4}

1 Interdisciplinary Lab of Clinical Neurosciences (LINC), and Schizophrenia Program (PROESQ), Department of Psychiatry, Universidade Federal de Sao Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, **2** Morphology and Genetics Department, Universidade Federal de Sao Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, **3** Medical Research Council Social Genetic and Developmental Psychiatry Centre, Institute of Psychiatry, King's College London, London, United Kingdom, **4** National Institute of Health Research Biomedical Research Centre for Mental Health, Institute of Psychiatry, King's College London, London, United Kingdom

Abstract

We report analyses of a Brazilian study of early onset schizophrenia (BEOS) families. We genotyped 22 members of 4 families on a linkage SNP array and report here non-parametric linkage analyses using MERLIN[®] software. We found suggestive evidence for linkage on two chromosomal regions, 13q32 and 11p15.4. A LOD score of 2.71 was observed at 13q32 with a one LOD interval extending from 60.63–92.35 cM. From simulations, this LOD score gave a genome-wide empirical corrected $p=0.33$, after accounting for all markers tested. Similarly 11p15.4 showed the same maximum LOD of 2.71 and a narrower one LOD interval of 4–14 cM. Of these, 13q32 has been reported to be linked to schizophrenia by multiple different studies. Thus, our study provides additional supporting evidence for an aetiological role of variants at 13q32 in schizophrenia.

Citation: Gadelha A, Ota VK, Cano JP, Melaragno MI, Smith MAC, et al. (2012) Linkage Replication for Chromosomal Region 13q32 in Schizophrenia: Evidence from a Brazilian Pilot Study on Early Onset Schizophrenia Families. *PLoS ONE* 7(12): e52262. doi:10.1371/journal.pone.0052262

Editor: James Bennett Potash, University of Iowa Hospitals & Clinics, United States of America

Received: June 21, 2012; **Accepted:** November 12, 2012; **Published:** December 31, 2012

Copyright: © 2012 Gadelha et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (grant number 2011/00030-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: aryarape@yahoo.com.br

Introduction

Schizophrenia is a chronic, highly disabling disease that has a point prevalence estimate of ~0.5% general population, which usually leads to persistent functional impairment with considerable morbidity and economic cost [1,2]. It is considered a complex trait resulting from both genetic and shared environmental etiological influences. Several studies support a familial aggregation (as reviewed by Sullivan [3]) with a 10-fold increase in risk to sibling of one proband and up to a 40-fold increase when both parents are affected [4]. The genetic contribution to risk is high and heritability estimates based on clinical ascertainment are usually given as over 80% [5,6]. A recent population-based study of 2 million families in Sweden put the estimate at a lower, but still considerable, 64.3%, with a 95% Confidence Interval (C.I.) estimate of 61.7%–67.5% [7].

Linkage analysis is a standard approach for identifying the location of genes that cause genetic diseases [8], whose primary advantage lies in detecting genes of moderate to major effect. This contrasts with genome-wide association studies, which are superior at finding loci of small effect [9]. Linkage studies conducted in schizophrenia have yielded positive findings in many different regions of the genome, with a somewhat confusing mixture of replication and non-replication. There is clear heterogeneity with no 'hard' replication for any region, with none being implicated in more than 20% independent studies [3].

Several reasons may explain these results, including locus and phenotypic heterogeneity, inadequate sample size, differences in ascertainment, marker sets, ancestry and statistical methods [10]. A systematic genome-scan meta-analysis [11] found 20 regions that achieved genome-wide linkage evidence. In a recent update of their meta-analysis that included 32 genome-wide SCZ studies, 10 regions were identified, with a concordant finding for the two meta-analysis on chromosome 2q (118.7–152 Mb) [10]. More specifically, they found that 10 genome bins are likely to contain loci linked to SCZ, including regions of chromosomes 1q, 2q, 3q, 4q, 5q, 8p and 10q. In a secondary analysis of 22 studies of European-ancestry samples, they reported suggestive evidence for linkage on chromosome 8p. Other loci have been reported and replicated in two regions of chromosome 13, one in the region of 13q21–33, (~ 95 Mb) and another in the 13q13–14 region (~ 40 Mb) [12–17].

In the present study we perform a pilot linkage study in Brazilian families with early-onset schizophrenia in Sao Paulo, Brazil. We report here the results of non-parametric linkage analyses in 4 small multiplex families.

Methods

Ethics Statement

This study was approved by Research Ethics Committee of UNIFESP [CEP No. 1737/06]. Written informed consent was

Apêndice 4: Ota et al. *Psychiatry Research*, 2013a

Psychiatry Research 209 (2013) 110–113



Contents lists available at ScienceDirect

Psychiatry Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psychres

Brief report

Polymorphisms in schizophrenia candidate gene *UFD1L* may contribute to cognitive deficits

Vanessa K. Ota^{a,b,*}, Arthur A. Berberian^{b,c,*}, Ary Gadelha^{b,c}, Marcos L. Santoro^{a,b}, Gustavo L. Ottoni^d, Camila T. Matsuzaka^c, Jair J. Mari^c, Maria I. Melaragno^a, Diogo R. Lara^d, Marília A.C. Smith^a, Sintia I. Belangero^{a,b,c}, Rodrigo A. Bressan^{b,c}

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu 740, Edifício Leitão da Cunha, 1º Andar, CEP 04023-900 São Paulo, Brazil

^b Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC), Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^c Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^d Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2012

Received in revised form

19 March 2013

Accepted 30 March 2013

Keywords:

Executive functions

Cognition

Gene

ABSTRACT

We aimed to investigate *UFD1L* polymorphisms in schizophrenia and in relation to cognition. A total of 299 cases and 363 controls were genotyped, and 130 patients completed nine neuropsychological tests. We found that rs5992403 AA-genotype carriers showed lower scores on the set-shifting task. Therefore, *UFD1L* may participate in the core cognitive deficits observed in schizophrenia.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia is a heterogeneous disorder with a worldwide prevalence of 0.3–1.6% (Kessler et al., 2005; Saha et al., 2005). It is considered a multifactorial disease that results from a complex interaction of genetic and environmental elements (Sullivan et al., 2003).

In the last decade, several studies have suggested cognitive deficits as a core feature of schizophrenia (Andreasen et al., 1998; Meshulam-Gately et al., 2009). These cognitive deficits are usually present in all phases of the illness, even beginning before the onset of psychotic symptoms (Seidman et al., 2010). Moreover,

unaffected first-degree relatives of patients present similar patterns of cognitive deficits, but at a more attenuated level (Szok et al., 2005; Trandafir et al., 2006).

Data from studies using different methodologies, such as functional and structural imaging, postmortem techniques and neurocognition, converge in showing several brain alterations related to schizophrenia. Such abnormalities are thought to be an effect of genetic liability and environmental factors implicated in schizophrenia (Gur et al., 2007).

Copy number variations in 22q11 are among the most important and replicated known genetic risk factors for developing schizophrenia (Levinson et al., 2011). One gene located at this region is ubiquitin fusion degradation 1-like (*UFD1L*) protein, which encodes the human homolog of the yeast ubiquitin-fusion-degradation 1 protein (*UFD1*) (Yamagishi et al., 1999). Deficiency of this protein might result in cell death or aberrant differentiation (Meyer et al., 2000). In humans, *UFD1L* expression is increased in a sensitive phase for neurodevelopment (Novelli et al., 1998). Moreover, *UFD1L* single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with schizophrenia (De Luca et al., 2001; Xie et al., 2008; Ota et al., 2010).

We aimed to investigate the association of three *UFD1L* SNPs (rs5992403, rs1547631 and rs5746744) with: (1) schizophrenia in a case-control analysis and (2) neuropsychological performance in a comprehensive battery of tasks within a sample of patients.

* Corresponding author at: Genetics Division, UNIFESP, Morphology and Genetics, Rua Botucatu 740, Edifício Leitão da Cunha 1º, Andar, CEP 04023-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 115576 4260, +55 1155764264.

** Corresponding author at: Psychiatry Department, UNIFESP, Rua Borges Lagoa, no. 570 Vila Clementino, São Paulo, SP CEP 04038-020, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4845. E-mail addresses: vanessakaota@gmail.com (V.K. Ota), a.berberian@unifesp.br

(A.A. Berberian), aryararipe@yahoo.com.br (A. Gadelha), santorogen@gmail.com (M.L. Santoro), ottonigl@gmail.com (G.L. Ottoni), camila.tm@gmail.com (C.T. Matsuzaka), jamari@attglobal.net (J.J. Mari), melaragno.morf@epm.br (M.I. Melaragno), drlara@pucrs.br (D.R. Lara), mactsmith.morf@epm.br (M.A.C. Smith), sintia.morf@epm.br (S.I. Belangero), rodrigoabressan@gmail.com (R.A. Bressan).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Apêndice 5: Ota et al. *Schizophrenia Research*, 2013b

Schizophrenia Research 145 (2013) 33–35



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres*ZDHHC8* gene may play a role in cortical volumes of patients with schizophrenia

Vanessa K. Ota^{a,b}, Ary Gadelha^{b,c}, Idaiane B. Assunção^b, Marcos L. Santoro^{a,b}, Denise M. Christofolini^d, Fernanda T. Bellucco^a, Airton F. Santos-Filho^c, Gustavo L. Ottoni^e, Diogo R. Lara^e, Jair J. Mari^c, Maria I. Melaragno^a, Marília A.C. Smith^a, Rodrigo A. Bressan^{b,c}, Sintia I. Belangero^{a,b,c}, Andrea P. Jackowski^{b,c,*}

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740, Edifício Letícia da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, Brazil

^b Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC), Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^c Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^d Disciplina de Genética e Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina do ABC (FMABC), São Paulo, Brazil

^e Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2012

Received in revised form 11 January 2013

Accepted 14 January 2013

Available online 8 February 2013

Keywords:

Schizophrenia

ZDHHC8

22q11

Cortical volumes

MRI

ABSTRACT

ZDHHC8 rs175174 polymorphism is located in 22q11.2 region and its role in brain volume has not been fully addressed. A total of 282 schizophrenia patients and 379 controls were genotyped. A sample of 138 patients underwent brain MRI scan. No association was found between schizophrenia and genotypes. Nevertheless, GG-genotype carriers presented gray matter volume (GMV) reduction in frontal lobe compared to A-allele carriers, and cerebellar hemispheres GMV reductions were found in G-allele carriers compared to AA-genotype. Moreover, A-allele carriers presented posterior brain GMV reductions when compared to GG-genotype. These data suggest that *ZDHHC8* may play a role in cortical volumes.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

One of the strongest genetic risk factors identified for schizophrenia is the presence of 22q11 deletion (Levinson et al., 2011). The zinc finger DHH domain-containing protein 8 gene (*ZDHHC8*) is located at 22q11.2 and encodes a putative transmembrane palmitoyltransferase enzyme (Mukai et al., 2008). Protein palmitoylation is a common protein lipid modification in the brain (Fukata and Fukata, 2010). It increases the hydrophobicity of neuronal proteins, affecting their interaction with cell membranes (el-Husseini Ael and Bredt, 2002; Drew et al., 2011). Since palmitoylation is critical for some proteins involved in

neurodevelopment (Young et al., 2012), *ZDHHC8* might participate in the brain morphology. Indeed, *ZDHHC8* is highly expressed in the cortex and hippocampus (Liu et al., 2002).

The A-allele of rs175174, a single nucleotide polymorphism (SNP) in *ZDHHC8*, was associated to schizophrenia (Liu et al., 2002). This allele was shown to increase levels of unspliced form, which is predicted to encode a truncated protein (Mukai et al., 2004). However, another study in Han-Chinese population reported that G-allele was the risk allele (Chen et al., 2004).

Structural neuroimaging techniques are useful tools in understanding the biological underpinnings of schizophrenia (Perlini et al., 2012). There is evidence for gray matter reductions of anterior cingulate, frontal and temporal lobes, hippocampus/amygdala, thalamus, and insula that may be magnified over time (Shepherd et al., 2012) providing support for the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. Genes related to schizophrenia and neurodevelopment have been associated with brain-based changes, mainly variations of gray matter volumes (Wang et al., 2009; Trost et al., in press; Wei et al., 2012). Furthermore, patients with 22q11.2 deletion syndrome present abnormalities in brain structure, such as global brain volumetric reduction including several cortical regions, cerebellum and hippocampus (Tan et al., 2009). To our knowledge, no studies assessed the effect of *ZDHHC8* on regional gray matter volume in patients with schizophrenia.

* Corresponding author at: Departamento de Psiquiatria UNIFESP/EPM, Rua Pedro de Toledo 669, 3o. andar, SP, Brasil. Tel.: +55 11 55764845.

E-mail addresses: vansakaota@gmail.com (V.K. Ota), aryarape@yahoo.com.br (A. Gadelha), idaiane@gmail.com (I.B. Assunção), santorogen@gmail.com (M.L. Santoro), denise.morf@gmail.com (D.M. Christofolini), fernandatsb@gmail.com (F.T. Bellucco), airton_fsantos@yahoo.com.br (A.F. Santos-Filho), ottonig1@gmail.com (G.L. Ottoni), dlara@puers.br (D.R. Lara), jamari@attglobal.net (J.J. Mari), melaragno.morf@epm.br (M.I. Melaragno), mactmith.morf@epm.br (M.A.C. Smith), rodrigoabressan@gmail.com (R.A. Bressan), sintia.morf@epm.br (S.I. Belangero), andrea.jackowski@gmail.com (A.P. Jackowski).

Apêndice 6: Ota et al. *Psychiatry Research*, 2013c

Psychiatry Research 208 (2013) 201–202



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Psychiatry Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psychres

Letter to the Editor

Candidate genes for schizophrenia in a mixed Brazilian population using pooled DNA



To the Editors:

Some studies have reported rare and *de novo* copy number variations (CNVs) associated with schizophrenia (International Schizophrenia Consortium, 2008). However, common CNVs may also contribute to its genetic liability (Glessner et al., 2010).

DNA pooling may be a cost-effective way to discover common CNVs (Breen et al., 2000); this may reduce detection of inter-individual CNV variability unrelated to the disease (de Cid et al., 2009).

In this study, we investigated CNVs in people with schizophrenia using microarray analysis of DNA pools. We recruited 138 patients and 120 healthy controls from Sao Paulo (SP; in the southeast region of Brazil). Additionally, we selected 74 cases of schizophrenia from Rio Grande do Sul (RS; in the south of Brazil) for replication in a distinct population. In both groups we only included stable patients who were being followed in outpatient clinics and who had been diagnosed using the Structured Clinical Interview for DSM-IV.

The Research Ethics Committee of UNIFESP approved the research protocol and all participants gave informed consent. The characteristics of the study population are described in Supplementary Table 1. The population structure was assessed as previously described (Santos et al., 2010).

We constructed six pools by mixing equal amounts of DNA isolated from blood: a) SP pool: a total of 138 samples from patients with schizophrenia from SP; these samples were then randomly distributed among three other pools comprising 46 samples each (SP-A, SP-B and SP-C). Clinical characteristics such as severity were not taken into consideration; b) CON pool: a total of 120 samples from controls; and c) RS pool: a total of 74 samples from patients with schizophrenia from RS. Each pool was hybridised to one array, except for the SP and CON pools, which were hybridised to two each, making a total of eight arrays (Supplementary Fig. 1).

Samples were analysed on a single-nucleotide polymorphism (SNP) array 6.0 (Affymetrix) and analysed with the Partek[®] Genomics Suite[™] (PGS; Partek Inc.) and PennCNV (<http://www.openbioinformatics.org/penncnv/>). CNVs were scored using the Hidden Markov Model (for PennCNV) or segmentation (for PGS) and calculated according to a set of 270 normal samples from the HapMap database. For PGS, only non-polymorphic probes were considered.

We considered relevant the regions that were identified as CNVs by both methods, between both replicates of the SP pool and in at least one subdivided DNA pool (SP-A, SP-B or SP-C). In addition, we validated the CNVs in the RS pool. Finally, we compared the identified CNVs with those in the CON pool (Supplementary Fig. 1).

After calculating all the overlaps, regions on 2p11.2, 10q11.21, and 14q32.33 were found to be duplicated (Table 1) in patients

with schizophrenia. Those on 2p11.2 and 14q32.33 were also found in the CON pool, but that on 10q11.21 was not.

Both 2p11.2 and 14q32.33 have been previously reported to be CNVs in the Database of Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>), suggesting that they might be common variants. Although the other CNV, at 10q11.21, was not found in our CON pool and is not registered in the DGV, it was found in control samples from the SFARIgene database (<https://gene.sfari.org/>), with a frequency > 1%.

Among the genes at 10q11.21, one of the most interesting is *RET*. This gene encodes a receptor tyrosine kinase that is a receptor of the glial cell-derived neurotrophic factor family and a potent trophic factor for dopaminergic neurons. Recently, a *RET* deletion was associated with schizophrenia in a whole-genome CNV study (Glessner et al., 2010).

Furthermore, the 14q32.3 region includes *AKT1*, which is adjacent to our amplified region and is involved in the pathophysiology of schizophrenia. Although still uncharacterised, another gene located in this region, *KIAA0125*, may be involved in neurogenesis.

There are limitations to the pooling methodology and we cannot rule out false-positives, although we adopted stringent strategies. In addition, pooling might add experimental error (Bosse et al., 2009). Another limitation is that, although we assessed population stratification for the SP samples, we did not do the same for the RS samples. Further validation of our candidate regions with another methodology and individual genotyping are needed.

In summary, we identified, in a Brazilian sample, CNVs previously associated with schizophrenia and suggested novel chromosome regions possibly involved in this disease. DNA pooling with microarray analysis is a cost-effective methodology that may be applicable to pilot screens to discover disease-associated CNVs.

Acknowledgements

We would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, 472698/2008-7) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil, 2007/58736 and 2011/00030-1 for financial support; the patients, their families and psychiatrists for their participation in this study; Cuiping Hou for helping with PennCNV analyses; Dr Camila Guindalini and Diego Mazzotti for helping with statistical analyses; and Dr Sérgio Tufik for our use of the Molecular Core AFIP (Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa) microarray core facility.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2012.12.009>.

Apêndice 7: Zugman et al. *Schizophrenia Research*, 2013

Schizophrenia Research 148 (2013) 81–86



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

Reduced dorso-lateral prefrontal cortex in treatment resistant schizophrenia



André Zugman^{a,*}, Ary Gadelha^{a,b}, Idaiane Assunção^a, João Sato^c, Vanessa K. Ota^{a,d}, Deyvis L. Rocha^b,
 Jair J. Mari^{a,b,e}, Sintia I. Belangero^{a,d,e}, Rodrigo A. Bressan^{a,b,e},
 Elisa Brietzke^{a,e}, Andrea P. Jackowski^{a,e}

^a Interdisciplinary Laboratory in Clinical Neuroscience (LINC), Department of Psychiatry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b PROESQ: Schizophrenia Program, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Center of Mathematics, Computation and Cognition, Federal University of ABC, Santo André, Brazil

^d Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Department of Psychiatry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 January 2013

Received in revised form 30 April 2013

Accepted 2 May 2013

Available online 28 May 2013

Keywords:

Cortical thickness

Schizophrenia

Treatment resistant

Refractory

MRI

ABSTRACT

Background: Treatment resistance affects up to one third of patients with schizophrenia (SCZ). A better understanding of its biological underlying processes could improve treatment. The aim of this study was to compare cortical thickness between non-resistant SCZ (NR-SCZ), treatment-resistant SCZ (TR-SCZ) patients and healthy controls (HC).

Methodology: Structural MRI scans were obtained from 3 groups of individuals: 61 treatment resistant SCZ individuals, 67 non-resistant SCZ and 80 healthy controls. Images were analyzed using cortical surface modeling (implemented in freesurfer package) to identify group differences in cortical thickness. Statistical significant differences were identified using Monte-Carlo simulation method with a corrected p-cluster < 0.01.

Results: Patients in the TR-SCZ group showed a widespread reduction in cortical thickness in frontal, parietal, temporal and occipital regions bilaterally. NR-SCZ group had reduced cortex in two regions (left superior frontal cortex and left caudal middle frontal cortex). TR-SCZ group also showed decreased thickness in the left dorso-lateral prefrontal cortex (DLPFC) when compared with patients from NR-SCZ group.

Conclusions: The reduction in cortical thickness in DLPFC indicates a more severe form of the disease or a specific finding for this group. Alterations in this region should be explored as a putative marker for treatment resistance. Prospective studies, with individuals being followed from first episode psychosis until refractoriness is diagnosed, are needed to clarify these hypotheses.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia (SCZ) is a chronic psychotic disorder associated with significant impairment in social and occupational functioning that is estimated to affect 0.3 to 1.6% of the population (Kessler et al., 2005; Tandon et al., 2008).

In spite of recent advances in development of new antipsychotics, failure to achieve expected response is rather common, and 20–33% of patients with SCZ show limited response to standard medications (Lieberman et al., 1989; Lieberman, 1993; Wiersma et al., 1998). Treatment resistance to neuroleptic agents is more frequent in male than female, patients with poorer premorbid functioning, and earlier age of onset (Meltzer, 1997).

After the robust evidence of the superiority in efficacy of clozapine over other antipsychotics (Kane et al., 1988; Wahlbeck et al., 1999;

Chakos et al., 2001; Iqbal et al., 2003), there was a recent trend to move to broader definitions of treatment resistance so that more patients are offered treatment with clozapine (Bondolfi et al., 1998; Pantelis and Lambert, 2003; The British Psychological Society and The Royal College of Psychiatrists, 2010). In fact, clozapine appears to have a positive effect even in symptoms traditionally considered resistant, such as negative symptoms and cognitive disturbances, particularly in domains of attention, verbal fluency and executive functions (Meltzer and McGurk, 1999). Nevertheless, due to its severe adverse effects clozapine prescription is recommended only after the patient being considered as treatment resistant (i.e.: failure to two adequate trial with antipsychotics) (Moore et al., 2007; The British Psychological Society and The Royal College of Psychiatrists, 2010). In contrast with the significance of refractoriness in clinical setting, there are only few studies investigating possible neurobiological correlates or consequences of lack of response to neuroleptic agents. To date there are no putative biological marker that could help clinicians to propose an earlier introduction of clozapine.

Regarding structural abnormalities in SCZ, one of the most replicated findings is that individuals with this disease show reductions

* Corresponding author at: Interdisciplinary Laboratory in Clinical Neuroscience (LINC), Department of Psychiatry, UNIFESP, Edifício de Pesquisas II, Rua Pedro de Toledo, 669, 3rd floor, Vila Clementino, Unmarked definida por andrezugman, 04039-032 São Paulo, SP. Tel.: +55 11 5576 4845.

E-mail address: andre.zugman@gmail.com (A. Zugman).

Apêndice 8: Assunção Leme et al. *CNS Spectrums*, 2013

CNS Spectrums (2013), 18, 315–321. © Cambridge University Press 2013
doi:10.1017/S1092852913000333

ORIGINAL RESEARCH

Is there an association between cortical thickness, age of onset, and duration of illness in schizophrenia?

Idaiane Batista Assunção Leme,^{1*} Ary Gadelha,² João Ricardo Sato,³ Vanessa Kiyomi Ota,⁴ Jair de Jesus Mari,⁵ Maria Isabel Melaragno,⁶ Marília de Arruda Cardoso Smith,⁶ Sintia Iole Nogueira Belangero,⁴ Rodrigo Affonseca Bressan,² and Andrea Parolin Jackowski¹

¹ Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

² Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC) and Programa de Esquizofrenia (PROESQ), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

³ Center of Mathematics, Computation and Cognition, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, Brazil

⁴ Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC) and Morphology and Genetics Department, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

⁵ Psychiatry Department, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

⁶ Morphology and Genetics Department, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

Objective. Several studies have shown cortical volume loss in frontotemporal regions in schizophrenia patients, and it is known that these reductions may be associated with disease symptoms and cognitive deficits. The aim of this study was to investigate possible cortical thickness correlations in frontotemporal regions in relation to age at onset and duration of illness.

Methods. One hundred forty-eight schizophrenia patients (97 males; age and SD 36.30 ± 10.06) and 87 (57 males; age and SD 36.48 ± 10.10) age-matched healthy subjects underwent a brain MRI scan. Cortical segmentation and surface statistical analysis were performed using the FreeSurfer software package. Results were corrected for multiple comparisons using the Monte Carlo method considering a cluster-corrected Type I Error of 5%.

Results. Compared to controls, schizophrenia patients presented significant cortical thinning in the frontotemporal, parietal, and occipital cortices. No correlation between prefrontal cortex thickness and duration of illness in patients with schizophrenia or between frontotemporal cortical thickness and age at onset was found. However, a significant interaction between age and diagnosis was observed on frontal cortical thickness with patients presenting a thinner cortex than expected for age.

Conclusion. Although there was no correlation between age of onset and duration of illness with brain volume, our findings suggest that there is an accelerated cortical loss in schizophrenia, thus reinforcing the progressive processes of the disease.

Received 23 January 2013; Accepted 10 April 2013; First published online 6 June 2013

Key words: Age, age at onset, cortical thickness, duration of illness, frontal lobe, schizophrenia.

Clinical Implications

- The quantification of cortical thickness expands our understanding of the neurobiological bases of

schizophrenia, and therefore provides more robust data for understanding the pathophysiology of the disease.

- No significant correlations between frontotemporal cortical thickness and age of onset and duration of the disease were found.
- There is progressive cortical thinning associated with schizophrenia.
- There is a significant interaction between age and diagnosis, with patients presenting an accelerated cortical thinning in the frontal regions.

*Address for correspondence: Idaiane Batista Assunção Leme, Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas (LiNC), Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669 - 3º andar (fundos), Vila Clementino, São Paulo, SP CEP: 04039-032, Brazil.

(Email: idaiane@gmail.com)

We would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil; grant number n° 07/58736-1) for the financial support. We also thank the patients, their families, psychiatrists, psychologists, and nurses for their participation in this study.

Introduction

Schizophrenia is a chronic and debilitating disease that causes significant disruption in daily activities and

Apêndice 9: Ota et al. *PloS One*, 2014a

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

***PRODH* Polymorphisms, Cortical Volumes and Thickness in Schizophrenia**

Vanessa K. Ota^{1,2,3}, Fernanda T. Bellucco^{1,3}, Ary Gadelha^{2,3}, Marcos L. Santoro^{1,2}, Cristiano Noto^{2,3}, Denise M. Christofolini⁴, Idaiane B. Assunção³, Karen M. Yamada¹, Andrea K. Ribeiro-dos-Santos⁵, Sidney Santos⁵, Jair J. Mari³, Marília A. C. Smith¹, Maria I. Melaragno¹, Rodrigo A. Bressan^{2,3}, João R. Sato^{2,6}, Andrea P. Jackowski², Sintia I. Belangero^{1,2,3*}

1 Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** LINC - Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, **4** Disciplina de Genética e Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina do ABC (FMABC), Santo André, São Paulo, Brazil, **5** Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brazil, **6** Center of Mathematics, Computation and Cognition, Universidade Federal do ABC, Santo André, Brazil

Abstract

Schizophrenia is a neurodevelopmental disorder with high heritability. Several lines of evidence indicate that the *PRODH* gene may be related to the disorder. Therefore, our study investigates the effects of 12 polymorphisms of *PRODH* on schizophrenia and its phenotypes. To further evaluate the roles of the associated variants in the disorder, we have conducted magnetic resonance imaging (MRI) scans to assess cortical volumes and thicknesses. A total of 192 patients were evaluated using the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID), Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS), Calgary Depression Scale, Global Assessment of Functioning (GAF) and Clinical Global Impression (CGI) instruments. The study included 179 controls paired by age and gender. The samples were genotyped using the real-time polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR and Sanger sequencing methods. A sample of 138 patients and 34 healthy controls underwent MRI scans. One polymorphism was associated with schizophrenia (rs2904552), with the G-allele more frequent in patients than in controls. This polymorphism is likely functional, as predicted by PolyPhen and SIFT, but it was not associated with brain morphology in our study. In summary, we report a functional *PRODH* variant associated with schizophrenia that may have a neurochemical impact, altering brain function, but is not responsible for the cortical reductions found in the disorder.

Citation: Ota VK, Bellucco FT, Gadelha A, Santoro ML, Noto C, et al. (2014) *PRODH* Polymorphisms, Cortical Volumes and Thickness in Schizophrenia. PLoS ONE 9(2): e87686. doi:10.1371/journal.pone.0087686

Editor: James D. Clelland, The Nathan Kline Institute, United States of America

Received: May 14, 2013; **Accepted:** January 2, 2014; **Published:** February 3, 2014

Copyright: © 2014 Ota et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2011/50740-5 and 2007/58736-1, Brazil), which had no further role in study design, data collection and analysis, in the writing of the paper, and in the decision of submitting the paper for publication.

Competing Interests: Dr. Mari served as a symposia speaker from Eli Lilly and Astra Zeneca. Also Dr. Bressan has received honoraria and/or consultations fees from Astra Zeneca, Janssen and Lundbeck; has received research funding from Janssen, Eli Lilly, Lundbeck, Novartis and Roche; and is a shareholder of Biomolecular Technology Ltda. Dr. Gadelha reports having received PhD fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and served as a speaker from Janssen-Cilag. The other authors have no conflicts of interest to disclose. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: sinbelangero@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Schizophrenia is currently considered to be a neurodevelopmental disease that arises from a complex phase-specific interaction of genetic and environmental factors [1–3]. The prevalence of schizophrenia in the general population is estimated to be 0.3%–1.6% [4,5]. The high heritability (~64%–83%) of schizophrenia [6,7] may be due to a combination of multiple common alleles, each one with a small to moderate effect, and some rare alleles with much larger effect sizes [8].

One of the strongest known genetic risk factors for schizophrenia is the 22q11 deletion [9]. Up to one-third of patients with 22q11 deletion syndrome (22q11DS), also known as DiGeorge or velocardiofacial syndrome, develop schizophrenia or schizoaffective disorder [10]. Moreover, while the prevalence of the

chromosome 22q11 deletion in the general population is one in 4000 individuals, its frequency is estimated to be approximately 1% in adult patients with schizophrenia [11–14]. Therefore, the 22q11DS deletion has been suggested as a genetic subtype of schizophrenia, and the genes located in this region might therefore contribute to susceptibility to the disease.

One of the genes commonly deleted in 22q11DS is the proline dehydrogenase (*PRODH*) gene, which encodes the proline dehydrogenase enzyme that catalyzes the first step in proline catabolism [15]. The *PRODH* gene, consisting of 14 coding exons and located in a low copy repeat sequence, is widely expressed in the brain and in other tissues [16,17]. The resulting enzyme, also known as proline oxidase (POX), is a mitochondrial tumor suppressor [18] that inhibits proliferation and induces apoptosis [19]. High proline concentrations appear to activate NMDA and

Apêndice 10: Asevedo et al. *Physiology & Behavior*, 2014

Physiology & Behavior 129 (2014) 194–198



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phb

Peripheral interleukin-2 level is associated with negative symptoms and cognitive performance in schizophrenia

Elson Asevedo^{a,b}, Lucas B. Rizzo^b, Ary Gadelha^{a,b}, Rodrigo B. Mansur^b, Vanessa K. Ota^b, Arthur A. Berberian^{a,b}, Bruno S. Scarpato^b, Antônio L. Teixeira^c, Rodrigo A. Bressan^{a,b}, Elisa Brietzke^{b,*}^a Schizophrenia Program (PROESQ), Department of Psychiatry, Federal University of São Paulo, Rua Machado Bitencourt, 222, São Paulo, SP, CEP 04044-000, Brazil^b Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences (LINC), Department of Psychiatry, Federal University of São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669, Edifício de Pesquisas II, third floor, São Paulo SP, CEP 04039-032, Brazil^c Translational Psychoneuroimmunology Group, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte MG, CEP 31270-901, Brazil

HIGHLIGHTS

- Peripheral IL-2 levels correlated positively with performance in tests of working memory and intelligence in patients with schizophrenia.
- IL-2 levels correlated negatively with scores in the negative subscale of PANSS.
- These associations pose IL-2 as a possible marker of cognitive and affective preservation in schizophrenia.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2013

Received in revised form 7 October 2013

Accepted 12 February 2014

Available online 25 February 2014

Keywords:

Schizophrenia

Interleukin-2

Biological markers

Cognition

Behavioral symptoms

ABSTRACT

Although several studies have pointed to a possible role of interleukin 2 (IL-2) in schizophrenia (SZ), association between IL-2 and the different groups of symptoms has not been explored. The objective of this study was to investigate a possible correlation of peripheral IL-2 levels with symptoms and cognitive performance in patients with SZ. In addition, we compared the plasma levels of IL-2 between patients with SZ and healthy controls. Twenty-nine chronically medicated outpatients with SZ according to DSM-IV were compared with twenty-six healthy controls. The patients were evaluated with the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS), the Calgary Depression Scale for Schizophrenia (CDSS), the Clinical Global Impression (CGI) and the Global Assessment of Functioning (GAF). All the participants had blood collected into EDTA tubes by venipuncture between 9:00 and 10:00 AM. Plasma concentrations of IL-2 were determined by cytometric bead array. A computerized neuropsychological battery assessed verbal learning, verbal fluency, working memory, set shifting, executive function, inhibition and intelligence. Patients with SZ had lower levels of IL-2 than healthy controls ($p < 0.001$). In the SZ group, IL-2 levels were positively correlated with scores in the digit span test ($\rho = 0.416, P = 0.025$) and intelligence ($\rho = 0.464, P = 0.011$). We also found a negative correlation between IL-2 and total score in the negative subscale of PANSS ($\rho = -0.447, p = 0.015$). Our findings suggest that IL-2 may be involved in the mechanisms related to cognitive deterioration and negative symptomatology in schizophrenia.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia (SZ) is a chronic, severe and highly prevalent mental disorder that is frequently associated with significant disability [1]. Symptoms of SZ are often divided into two clusters: positive symptoms (hallucinations, delusions, disorganized speech and behavior) and negative symptoms (blunted affect, social withdrawal, loss of volition and alogia) [1]. In addition to the positive and negative syndromes, cognitive impairment is an essential feature of SZ that seems to be directly associated with functional disability in work, poor social functioning and difficulties in daily life activities [2,3]. When compared with healthy individuals, people diagnosed with SZ display deficits in several domains

* Corresponding author at: Federal University of São Paulo, UNIFESP, Rua Machado Bitencourt, 222, 04044-000, São Paulo SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 55764845.

E-mail addresses: elsonmed@gmail.com (E. Asevedo), lucas-rizzo@hotmail.com (L.B. Rizzo), aryararipe@gmail.com (A. Gadelha), rodrigomansur71@uol.com.br (R.B. Mansur), vanessakota@gmail.com (V.K. Ota), arthur.berberian@gmail.com (A.A. Berberian), brunosini@yahoo.com.br (B.S. Scarpato), altexr@gmail.com (A.L. Teixeira), rodrigoabressan@gmail.com (R.A. Bressan), elisabrietzke@hotmail.com (E. Brietzke).

Apêndice 11: Chen et al. *BMC Genomics*, 2014

Chen et al. *BMC Genomics* 2014, **15**:290
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/290>



METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

BisQC: an operational pipeline for multiplexed bisulfite sequencing

Gary G Chen^{1,2}, Alpha B Diallo^{1,2}, Raphaël Poujol^{1,2}, Corina Nagy^{1,2}, Alfredo Staffa³, Kathryn Vaillancourt^{1,2}, Pierre-Eric Lutz^{1,2}, Vanessa K Ota^{1,2}, Deborah C Mash⁴, Gustavo Turecki^{1,2,5} and Carl Ernst^{1,2,5*}

Abstract

Background: Bisulfite sequencing is the most efficient single nucleotide resolution method for analysis of methylation status at whole genome scale, but improved quality control metrics are needed to better standardize experiments.

Results: We describe BisQC, a step-by-step method for multiplexed bisulfite-converted DNA library construction, pooling, spike-in content, and bioinformatics. We demonstrate technical improvements for library preparation and bioinformatic analyses that can be done in standard laboratories. We find that decoupling amplification of bisulfite converted (bis) DNA from the indexing reaction is an advantage, specifically in reducing total PCR cycle number and pre-selecting high quality bis-libraries. We also introduce a progressive PCR method for optimal library amplification and size-selection. At the sequencing stage, we thoroughly test the benefits of pooling non-bis DNA library with bis-libraries and find that BisSeq libraries can be pooled with a high proportion of non-bis DNA libraries with minimal impact on BisSeq output. For informatics analysis, we propose a series of optimization steps including the utilization of the mitochondrial genome as a QC standard, and we assess the validity of using duplicate reads for coverage statistics.

Conclusion: We demonstrate several quality control checkpoints at the library preparation, pre-sequencing, post-sequencing, and post-alignment stages, which should prove useful in determining sample and processing quality. We also determine that including a significant portion of non-bisulfite converted DNA with bisulfite converted DNA has a minimal impact on usable bisulfite read output.

Keywords: DNA methylation, Bisulfite sequencing, Bioinformatics

Background

DNA methylation has a role in the development of eukaryotic organisms [1,2] and may represent the interface between genome and environment [3]. Currently, the most widely used method for detecting 5-methylcytosine is the treatment of DNA with sodium bisulfite [4], which results in the deamination of all non-methylated cytosine to uracil. Since sodium bisulfite does not convert 5-methylcytosine bases to uracil, this approach allows for the direct interpretation of where methylation has or has not occurred in the genome. This interpretation is complicated by the need to generate percentage methylation statistics per

cytosine residue because the same locus can have different methylation levels across cells. This complication underscores the need to have careful metrics to assess experimental procedures.

Bisulfite treatment combined with Next-Generation sequencing (NGS) is the method of choice for the NIH Epigenomics Roadmap [5], a project with a stated goal to map methylation patterns in multiple tissue types. This experimental design underlies the expectation that there are different methylation patterns in different tissues, and there is a high likelihood that cells that make up these tissues themselves have different methylation patterns, even at the same genomic loci. This variation complicates analysis and can lead to high levels of noise, making data interpretation challenging. One major issue for all bis-DNA

* Correspondence: carl.ernst@mcgill.ca

¹Department of Psychiatry, McGill University, Douglas Hospital Research Institute, Montreal, Quebec, Canada

²McGill Group for Suicide Studies, Douglas Hospital Research Institute, 6875 LaSalle Boulevard, Frank Common Building, Room 2101.2 Verdun, Montreal, QC, H4H 1R3, Canada

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Chen et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Apêndice 12: Santoro et al. *Schizophrenia Research*, 2014a

Schizophrenia Research 157 (2014) 163–168



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

Effect of antipsychotic drugs on gene expression in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the spontaneously hypertensive rat (SHR)



Marcos Leite Santoro^{a,b}, Vanessa Kiyomi Ota^{a,b}, Roberta Sessa Stilhano^c, Patrícia Natália Silva^{a,b}, Camila Maurício Santos^{b,d}, Mariana Cepollaro Diana^{b,d}, Ary Gadelha^b, Rodrigo Affonseca Bressan^b, Maria Isabel Melaragno^a, Sang Won Han^c, Vanessa Costhek Abílio^{b,d}, Sintia Iole Belangero^{a,b,*}

^a Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740, Edifício Leita da Cunha, 1° andar, CEP 04023-900 São Paulo, Brazil

^b LINC – Interdisciplinary Lab of Clinical Neuroscience, Department of Psychiatry, UNIFESP, Rua Pedro de Toledo, 669, 3° floor, CEP 05039-032 São Paulo, Brazil

^c Department of Biophysics and Investigation Center for Gene Therapy, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Mirassol 207, CEP:04044-010, Brazil

^d Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Pedro de Toledo 669, 5th floor, CEP: 04039032, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2013

Received in revised form 3 April 2014

Accepted 5 May 2014

Available online 2 June 2014

Keywords:

Spontaneously hypertensive rats

Antipsychotic

Gene expression

DNA methylation

*Gra1**Brs3**Drd2**Drd3**Galr3**Gabbr1*

ABSTRACT

Antipsychotic drugs (APDs) are the standard treatment for schizophrenia. The therapeutic effect of these drugs is dependent upon the dopaminergic D2 blockade, but they also modulate other neurotransmitter pathways. The exact mechanisms underlying the clinical response to APDs are not fully understood. In this study, we compared three groups of animals for the expression of 84 neurotransmitter genes in the prefrontal cortex (PFC) and nucleus accumbens (NAcc). Each group was treated with a different APD (risperidone, clozapine or haloperidol), and with a non-treated group of spontaneously hypertensive rats (SHRs), which is an animal model for schizophrenia. This study also explored whether or not differential expression was regulated by DNA methylation in the promoter region (PR). In the clozapine group, we found that *Chng* was downregulated in the NAcc and six genes were downregulated in the PFC. In the haloperidol group, *Brs3* and *Gra1* were downregulated, as was *Drd2* in the clozapine group and *Drd3*, *Galr3* and *Gabbr1* in the clozapine and haloperidol groups. We also encountered four hypermethylated CG sites in the *Gra1* PR, as well as three in the risperidone group and another in the haloperidol group, when compared to non-treated rats. Following the APD treatment, the gene expression results revealed the involvement of genes that had not previously been described, in addition to the activity of established genes. The investigation of the involvement of these novel genes can lead to better understanding about the specific mechanisms of action of the individual APDs studied.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia, a complex disorder resulting from a gene–environment interaction, affects 0.3 to 1.6% of the general population (Kessler et al., 2005). Genetics plays a central role in schizophrenia vulnerability, with a heritability of approximately 80% (Cannon et al., 1998). Despite these findings, no single gene has been identified that can explain a substantial proportion of this estimated heritability (Allen et al., 2008).

Although alterations in several neurotransmitter pathways have been identified, such as the cholinergic and GABA-ergic (gamma aminobutyric acid) systems, the dopamine system has been proposed to be the final pathway (Seeman, 1987; Stephens et al., 2009; Volk et al., 2000). Hyperdopaminergic neurotransmission in the striatal area has been consistently reported to be related to the positive

symptoms of the disease (Laruelle and Abi-Dargham, 1999). Conversely, reduction of dopamine transmission in other areas, such as the prefrontal cortex (PFC), has been proposed to trigger the negative symptoms (Howes and Kapur, 2009; Sequeira et al., 2012).

APDs can be divided into two categories: typical APDs, which are mainly D2-like antagonists, and atypical APDs, which act not only on D2-like receptors, but also on other dopamine receptors and pathways, such as serotonin, histamine and acetylcholine, among others (Lopez-Munoz and Alamo, 2011). Receptor affinity studies have shown that additional receptors are involved in the molecular action of APDs (Roth et al., 2004), suggesting that multiple intracellular signal transduction cascades could be involved in APD action (Girgenti et al., 2010).

Considering the high heritability and the limited results of genomic studies, investigations of gene expression can provide additional information and may improve our understanding of the neurobiological processes related to the disorder and the subsequent response to APD treatment. Several studies have investigated gene expression changes in *postmortem* brain samples from patients with schizophrenia, and have reported alterations in gene expression related to multiple

* Corresponding author at: Disciplina de Genética/UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Ed. Leita da Cunha, 1° andar, CEP 04023-900 São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4260, +55 11 5576 4264.

E-mail address: sinbelangero@gmail.com (S.I. Belangero).

Apêndice 13: Santoro et al. *Psychiatry Research*, 2014b

Psychiatry Research 219 (2014) 674–679



Contents lists available at ScienceDirect

Psychiatry Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psychres

Expression profile of neurotransmitter receptor and regulatory genes in the prefrontal cortex of spontaneously hypertensive rats: Relevance to neuropsychiatric disorders



Marcos Leite Santoro^{a,b}, Camila Maurício Santos^{b,c}, Vanessa Kiyomi Ota^{a,b}, Ary Gadelha^{b,c}, Roberta Sessa Stilhano^e, Mariana Cepollaro Diana^{b,d}, Patrícia Natália Silva^{a,c}, Letícia Maria Nery Spíndola^a, Maria Isabel Melaragno^a, Rodrigo Affonseca Bressan^{b,c}, Sang Won Han^e, Vanessa Costhek Abílio^{b,d}, Sintia Iole Belangero^{a,b,c,*}

^a Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

^b Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences (LINC), Sao Paulo, Brazil

^c Department of Psychiatry, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

^d Department of Pharmacology, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

^e Department of Biophysics and Investigation Center for Gene Therapy, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2013

Received in revised form

22 April 2014

Accepted 18 May 2014

Available online 5 June 2014

Keywords:

Spontaneously hypertensive rats

Gene expression

DNA methylation

Gad2

Qrfpr

Slc5a7

Chrb4

ABSTRACT

The spontaneously hypertensive rat (SHR) strain was shown to be a useful animal model to study several behavioral, pathophysiological and pharmacological aspects of schizophrenia and attention-deficit/hyperactivity disorder. To further understand the genetic underpinnings of this model, our primary goal in this study was to compare the gene expression profile of neurotransmitter receptors and regulators in the prefrontal cortex (PFC) and *nucleus accumbens* (NAcc) of SHR and Wistar rats (control group). In addition, we investigated DNA methylation pattern of promoter region of the genes differentially expressed. We performed gene expression analysis using a PCRarray technology, which simultaneously measures the expression of 84 genes related to neurotransmission. Four genes were significantly downregulated in the PFC of SHR compared to Wistar rats (*Gad2*, *Chrb4*, *Slc5a7*, and *Qrfpr*) and none in *nucleus accumbens*. *Gad2* and *Qrfpr* have CpG islands in their promoter region. For both, the promoter region was hypomethylated in SHR group, and probably this mechanism is not related with the downregulation of these genes. In summary, we identified genes that are downregulated in the PFC of SHR, and might be related to the behavioral abnormalities exhibited by this strain.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Spontaneously hypertensive rats (SHR) were developed to study hypertension. However, the behavioral profile of SHR strain and their alteration in dopamine transmission, such as reduced release of dopamine in the PFC and *nucleus accumbens* (NAcc) (Russell, 2002), has attracted attention in psychiatric research. Firstly, SHR were investigated extensively for its utility as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), since they display hyperactivity, impulsivity and poorly sustained attention in comparison to normotensive Wistar-Kyoto (WKY) control rats (Papa et al., 1998; Russell, 2002; Sagvolden, 2000).

Moreover, SHR animals present behavioral alterations classically associated with animal models of schizophrenia when compared to Wistar, such as a deficit in pre-pulse inhibition (PPI) (a sensorimotor gating deficit also found in schizophrenia patients (Brafé et al., 2001)), reduced social interaction, hyperlocomotion, and a deficit in fear conditioning (a cognitive deficit). Furthermore, these behavioral changes were specifically reversed by antipsychotic drugs and aggravated by “pro-schizophrenic” manipulations (i.e. amphetamine administration) (Calzavara et al., 2011a; Calzavara et al., 2009; Calzavara et al., 2011b; Levin et al., 2011).

Schizophrenia is considered a neurodevelopmental disease which results from the convergence of different pathological processes leading to a final common process (Weinberger, 1995). Although alterations have been shown in several neurotransmitter pathways, such as the cholinergic and gamma aminobutyric acid (GABA)ergic systems, the dopamine system has been proposed to be this final pathway (Seeman, 1987; Stephens et al., 2009; Volk et al., 2000). It has been consistently reported that hyper dopaminergic

* Corresponding author at: Disciplina de Genética / UNIFESP, Rua Botucatu, 740, Ed. Leita da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, Sao Paulo, Brazil.
Tel.: +55 11 5576 4260x4264.

E-mail address: sinbelangero@gmail.com (S.I. Belangero).

Apêndice 14: Turecki et al. *The Lancet Psychiatry*, 2014

[THELANCETPSYCH-D-14-00334R1]

[S2215-0366(14)70360-8]

Embargo: [add date when known]

[A: We have edited your paper to avoid repetition, enhance readability, reduce length, and achieve consistency with Lancet style. Please check that all drug names are the rINNs (recommended international non-proprietary names) where possible, and please ensure that the dose, route, and frequency of administration are correct. Please note that we try to keep use of abbreviations to a minimum so I have spelt out where necessary.]

14TLP0334_Turecki

Review

EB

This version saved: 17:13, 17-Oct-14

Early life adversity, genomic plasticity, and psychopathology



Gustavo Turecki, Vanessa Kiyomi Ota, Sintia Iole Belangero, Andrea Jackowski, Joan Kaufman

Child maltreatment is associated with an increased risk of psychiatric disorders, and a range of health problems later in life. Research suggests that adverse events early in life can lead to changes in gene expression through epigenetic mechanisms that alter stress reactivity, brain function, and behaviour. Although epigenetic changes are often long lasting, they can be reversed with pharmacological and environmental manipulations. The complexity of the epigenome is not fully understood. The aim of this Review is to assess emerging data for the role of epigenetic mechanisms in stress-related psychiatric disorders with a focus on future research. We describe the epigenetic processes, key findings in this specialty, clinical implications of research, and methodological issues. Studies are needed to investigate new epigenetic processes other than methylation and assess the efficacy of interventions to reverse epigenetic processes associated with the effects of early life adversity.

Lancet Psychiatry 2014

McGill Group for Suicide Studies, Douglas Mental Health Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada (Prof G Turecki, V K Ota MSc); Department of Morphology and Genetics (V K Ota MSc) and Department of Psychiatry (S I Belangero PhD, A Jackowski PhD), Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences, Federal University of São Paulo, Brazil (V K Ota MSc, S I Belangero PhD, A Jackowski PhD); and Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA (J Kaufman PhD)

Correspondence to: Prof Gustavo Turecki, McGill Group for Suicide Studies, Douglas Mental Health Institute, McGill University, 6875 LaSalle Boulevard, Montreal, QC H4H 1R3, Canada
gustavo.turecki@mcgill.ca

Introduction

Child abuse and neglect are associated with an increased risk of depression, anxiety, post-traumatic stress disorder, and substance misuse,¹ and a range of physical health issues including obesity, diabetes, cardiovascular disease, and cancer.² Emerging data suggest epigenetic mechanisms might help to explain the association between adverse childhood experiences and adult health problems.

The same DNA is found in every cell of our body, however, cells differentiate into specialised cell types and synthesise different proteins to fulfil diverse cellular functions. The process of neuronal differentiation, which makes these cells distinct from those found in the heart and other organs, is mainly coordinated by epigenetic mechanisms contributing to the establishment and the maintenance of cell identity.³ Epigenetics refers to chemical and physical modifications of DNA and chromatin that regulate the functional activity of the genome (ie, gene expression) without making any changes to the nucleotide sequence.⁴ Although the epigenetically modulated changes in gene expression leading to cell differentiation are stable, the social environment can regulate genomic function through epigenetic processes, including DNA methylation, histone modifications, and non-coding RNA.^{5,6} Epigenetic changes in gene expression might be viewed as adaptation of the genome to environmental influences, a process referred to as genomic plasticity. Thus, the epigenome can be conceptualised as the interface through which the environment influences gene expression and protein translation, and as a result, regulates behaviour at least partly in response to environmental needs.^{5,7-9}

Three types of epigenetic mechanisms are known DNA methylation (figure 1); histone modifications (figure 2); and post-translational regulation of gene expression by non-coding RNAs. In this Review, we focused on DNA methylation and histone modifications, because these mechanisms have been mainly investigated as possible mediators of the long-term effects of early life stressors. We aimed to assess epigenetic mechanisms, highlight key findings, discuss their clinical implications, and consider future avenues of research.

Epigenetic regulation

DNA methylation

DNA methylation is the addition of a methyl group (CH₃) to the 5' carbon of a cytosine. DNA methylation occurs mostly, but not exclusively, at CpG sites (a nucleotide sequence in which a cytosine nucleotide occurs next to a guanine nucleotide in the linear sequence). Cytosine methylation in the promoter region of a gene is associated with transcriptional repression of that gene by interference with the recruitment and binding of transcription factors to the promoter region.⁶ DNA methylation can occur outside of promoter regions and in intergenic regions of the DNA, a subset of non-coding DNA located between genes with no known function. Recently, oxidation of methylated cytosines has been identified as another potential epigenetic mechanism (figure 1). 5-hydroxymethylcytosine is formed from cytosine by the addition a methyl group and then a hydroxy group, and might have a unique functional role in view of its anatomical and genomic distribution, with increased concentrations in the brain, and preferential localisation in promoter and intragenic regions of DNA,¹⁰ enhancers (short stretches of DNA that bind to transcription factors and are more distal to the gene than promoter regions), and actively transcribed regions.¹¹⁻¹³ Moreover, 5-hydroxymethylcytosine is an intermediate in DNA demethylation and its concentrations positively correlate with gene transcription.¹⁴ 5-hydroxymethylcytosine might have a role in neurodevelopment, as shown by substantial differences in its concentration along regulatory regions of the genome in the brain during development.¹⁵ Other products of the oxidation of methylcytosines are 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.¹⁶ Although these modified bases have different biochemical properties from methylcytosine and hydroxymethylcytosine, and thus could have different functional roles, their concentrations are low and almost undetectable in physiological conditions.¹⁶

Histone modifications

Histones are proteins that act as spools around which DNA winds and have a role in the regulation of gene expression through epigenetic mechanisms (figure 2).

Apêndice 15: Noto & Ota et al. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, no prelo

International Journal of Neuropsychopharmacology Advance Access published January 23, 2015



International Journal of Neuropsychopharmacology, 2015, 1–8

doi:10.1093/ijnp/psy042
Research Article

RESEARCH ARTICLE

Effects of Risperidone on Cytokine Profile in Drug-Naïve First-Episode Psychosis

Cristiano Noto,* MD; Vanessa Kiyomi Ota*, Eduardo S. Gouvea, MD; Lucas B. Rizzo; Leticia M. N. Spindola; Pedro H. S. Honda, MD; Quirino Cordeiro, MD, PhD; Sintia Iole Belangero, PhD; Rodrigo Affonseca Bressan, MD, PhD; Ary Gadelha, MD, PhD; Michael Maes, MD, PhD; Elisa Brietzke, MD, PhD

*These authors contributed equally to this work

Department of Psychiatry, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil (Drs Noto, Rizzo, Cordeiro, Bressan, Gadelha, and Brietzke); First Episode Psychosis Program, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brazil (Drs Noto, Gouveia, Honda, and Cordeiro); Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil (Drs Ota, Gouveia, Spindola, and Belangero); Department of Psychiatry, Deakin University, Geelong, Vic., Australia (Dr Maes); Department of Psychiatry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Dr Maes).

Correspondence: Elisa Brietzke, MD, Rua Pedro de Toledo, 669, 3o andar CEP 04039-032, São Paulo/SP, Brasil (elisabrietzke@hotmail.com).

Abstract

Background: There is robust evidence that schizophrenia is characterized by immune-inflammatory abnormalities, including variations on cytokine levels. The results of previous studies, however, are heterogeneous due to several confounding factors, such as the effects of antipsychotic drugs. Therefore, research on drug-naïve first-episode psychosis (FEP) patients is essential to elucidate the role of immune processes in that disorder.

Methods: The aim of this study is to compare cytokine levels (IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-17) in drug-naïve FEP patients both before and after treatment with risperidone for 10 weeks, and to investigate possible associations between cytokine levels and clinical responses to treatment and presence of depressive symptoms. In this study, we included 55 drug-naïve FEP patients who had repeated measurements of cytokine levels and 57 healthy controls.

Results: We found that FEP patients had significantly higher IL-6, IL-10 and TNF- α levels than healthy controls. After risperidone treatment, these three cytokines and additionally IL-4 decreased significantly. No significant difference was found between the post-treatment cytokine levels in FEP patients and in healthy controls, suggesting that these alterations in cytokine profiles are a state marker of FEP. No significant association was found between risperidone-induced changes in cytokines and the clinical response to treatment or the presence of depression. There was a significant inverse association between the risperidone-induced changes in IL-10 and the negative symptoms.

Received: August 4, 2014; Revised: September 5, 2014; Accepted: September 9, 2014

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

1

Apêndice 16: Noto & Ota et al. *Schizophrenia Research*, no prelo

ARTICLE IN PRESS

SCHRES-06240; No of Pages 6

Schizophrenia Research xxx (2015) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres




Effects of depression on the cytokine profile in drug naïve first-episode psychosis

Cristiano Noto^{a,b,1}, Vanessa Kiyomi Ota^{c,1}, Marcos Leite Santoro^c, Bruno B. Ortiz^a, Lucas B. Rizzo^a, Cinthia Hiroko Higuchi^a, Quirino Cordeiro^{a,b}, Sintia Iole Belangero^c, Rodrigo Affonseca Bressan^a, Ary Gadelha^a, Michael Maes^{d,e,f}, Elisa Brietzke^{a,*}

^a Department of Psychiatry, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^b First Episode Psychosis Program, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), São Paulo, Brazil

^c Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^d Department of Psychiatry, Deakin University, Geelong, VIC, Australia

^e Department of Psychiatry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^f Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina (UEL), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2014

Received in revised form 9 January 2015

Accepted 14 January 2015

Available online xxx

Keywords:

Schizophrenia

First-episode psychosis (FEP)

Drug naïve

Depression

Cytokines

ABSTRACT

Schizophrenia is accompanied by alterations in immuno-inflammatory pathways, including abnormalities in cytokine profile. The immune assessment of patients in a first episode of psychosis (FEP) and particularly in drug naïve patients is very important to further elucidate this association.

The objectives of this study are to delineate the cytokine profile (IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, IFN γ , TNF α and IL-17) in FEP patients (n = 55) versus healthy controls (n = 57) and to examine whether the presence of depressive symptoms in FEP is accompanied by a specific cytokine profile.

We found increased levels of IL-6, IL-10 and TNF α in FEP patients when compared to healthy controls. FEP patients with depression showed higher IL-4 and TNF α levels versus those without depression. Cytokine levels were not correlated to the total PANSS and the positive or negative subscale scores.

Our results suggest that FEP is accompanied by a cytokine profile indicative of monocytic and T regulatory cell (Treg) activation. Depression in FEP is accompanied by monocytic and Th-2 activation, whereas FEP without depression is characterized by Treg activation only. In conclusion, depression emerged as a key component explaining the cytokines imbalance in FEP that is responsible for a large part of the immune-inflammatory abnormalities described.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Psychosis is a core symptom of schizophrenia, a severe neurodevelopmental disorder, with large economical and social impact (Insel, 2010). Abnormal immune-inflammatory responses, including increased levels of pro-inflammatory cytokines are found in patients with schizophrenia (Potvin et al., 2008; Miller et al., 2011). In 1995, the immune-inflammatory theory of schizophrenia proposed that activated immune-inflammatory pathways, particularly activated macrophages and T-lymphocytes, may explain the higher offspring schizophrenia risk associated with gestational infections through the neurotoxic effects of pro-inflammatory cytokines and their detrimental consequences (Smith and Maes, 1995). More recently, several reviews addressed the role of activated immune-inflammatory pathways in

the neurodevelopmental pathophysiology of schizophrenia (Anderson et al., 2013a; Meyer, 2013).

Cytokines are proteins involved in the activation, coordination and suppression of immune responses. Their neuromodulatory actions appear to be critical for the regulation of neuroplasticity, cell resilience and apoptosis (Boulangier and Shatz, 2004; Golan et al., 2004; Bauer et al., 2007). Macrophages are activated during innate immune response in two functional distinct states (M1 and M2), producing different cytokines. M1 macrophages produce pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12 and tumor necrosis factor (TNF) α , stimulating cell-mediated response. M2 macrophages produce negative immunoregulatory cytokines, such as IL-10 and transforming growth factor (TGF) β (Seruga et al., 2008; Maes et al., 2012b). During the adaptive immune response, T lymphocytes differentiate into T helper (Th)1, Th17, T regulatory (Treg) and Th2 cells. Naïve cells are driven towards Th1 and Th2 phenotypes by M1 and M2 macrophages, respectively (Seruga et al., 2008; Maes et al., 2012b). A Th1-shift cytokine profile indicates immune activation, whereas a Th2-shift may indicate negative immunoregulatory effects and activated humoral immunity

* Corresponding author at: Rua Pedro de Toledo, 669, 3^o andar, CEP 04039-032, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4845.

E-mail address: elisabrietze@hotmail.com (E. Brietzke).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Apêndice 17: Gadelha et al. *Schizophrenia Research*, no prelo

ARTICLE IN PRESS

SCHRES-06258; No of Pages 6

Schizophrenia Research xxx (2015) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres



01 ACE I/D genotype-related increase in ACE plasma activity is a better
2 predictor for schizophrenia diagnosis than the genotype alone

02 Ary Gadelha^a, Camila M. Yonamine^b, Vanessa K. Ota^c, Vitor Oliveira^d, João Ricardo Sato^e, Sîntia I. Belangero^{a,c},
4 Rodrigo A. Bressan^a, Mirian A.F. Hayashi^{b,*}

5 ^a Programa de Esquizofrenia (PROESQ) — Departamento de Psiquiatria, UNIFESP, São Paulo, Brazil

6 ^b Departamento de Farmacologia, UNIFESP, São Paulo, Brazil

7 ^c Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP, São Paulo, Brazil

8 ^d Departamento de Biofísica, UNIFESP, São Paulo, Brazil

9 ^e Center of Mathematics, Computation and Cognition, Universidade Federal do ABC, Santo André, Brazil

1 0 A R T I C L E I N F O

11 *Article history:*
12 Received 6 September 2014
13 Received in revised form 27 January 2015
14 Accepted 30 January 2015
15 Available online xxxxx

16 *Keywords:*
17 Schizophrenia
18 ACE
19 Enzyme activity
20 Oligopeptidase
21 Genotype

A B S T R A C T

Background: Angiotensin-I converting enzyme (ACE) is a key component of the renin-angiotensin system (RAS). Although the several contradictory data, ACE has been associated with schizophrenia (SCZ) pathophysiology. Here the ACE activity of SCZ patients and healthy controls (HCs), and its possible correlations with the ACE polymorphism genotype and symptomatic dimensions, was investigated.
Methodology: ACE activity of 86 SCZ patients and 100 HCs paired by age, gender and educational level was measured, using the FRET peptide substrate and the specific inhibitor lisinopril. The ACE insertion/deletion (I/D) genotypes were assessed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique.
Results: Significantly higher ACE activity was observed in SCZ patients compared to HCs ($t = -5.09$; $p < 0.001$). The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve was 0.701. Mean ACE activity levels were higher for the D-allele carriers ($F = 5.570$; $p = 0.005$), but no significant difference was found among SCZ patients and HCs for genotypes frequencies (Chi-squared = 2.08; $df = 2$; $p = 0.35$). Interestingly, we found that the difference between the measured ACE activity for each SCZ patient and the expected average mean value for each respective genotype group (for control subjects) was a better predictor of SCZ than the ACE dichotomized values (high/low) or ACE I/D.
Conclusion: Our results suggest that higher levels of ACE activity are associated with SCZ with stronger impact when the genetic background of each individual is considered. This may explain the heterogeneity of the results on ACE previously reported.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

44 1. Introduction

45 The renin-angiotensin system (RAS) was classically characterized as
46 the principal regulator of the systemic blood pressure (Basso and

Terragno, 2001). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) has a central
47 role in this system by producing the angiotensin II, one of the main
48 effector of RAS. The interest in RAS, beyond its classical functions, was
49 renewed by the identification of several RAS effectors in different
50 human tissues, especially in the brain (Dupont and Brouwers, 2010;
51 Bali and Jaggi, 2013; Wright et al., 2013).

52 Brain RAS has been implicated in several functions, including regula-
53 tion of cerebral blood flow and cerebroprotection, stress, depression,
54 seizure, alcohol consumption, memory consolidation, and possible
55 roles in the etiology of Alzheimer's and Parkinson's diseases were also
56 suggested (as reviewed by Wright and Harding, 2011). Both ACE and
57 angiotensin receptors were identified in dopaminergic neurons of
58 basal ganglia (Allen et al., 1992). Significant decreased dopamine release
59 determined by ACE inhibitors was also demonstrated (Obata et al., 2008).
60 Therefore, the interaction with the dopaminergic system suggests
61 that RAS and ACE are both promising targets for schizophrenia (SCZ)
62 investigations.
63

Abbreviations: SCZ, schizophrenia; ACE, angiotensin I-converting enzyme; RAS, renin angiotensin system; RFLP, restriction fragment length polymorphism; HCs, healthy controls; ROC, receiver operating characteristic; FRET, fluorescence resonance energy transfer; BDs, bipolar disorders; EUSA, enzyme-linked immuno assay; PANSS, positive and negative syndrome scale; SCID, structured diagnostic interview; CGI, Clinical Global Impression; GAF, Global Assessment of Functioning; IPAP, International Psychopharmacological Algorithm Project; LSD, Fisher's least significant difference; TR, treatment-resistant; non-TR, non-treatment-resistant; IPAP, International Psychopharmacological Criteria; PCR, polymerase chain reaction; AUC, area under the curve; BMI, Body Mass Index; SPSS, Statistical Package for the Social Sciences; CSF, cerebrospinal fluid

* Corresponding author at: Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua 3 de Maio 100, Ed. INFAR, 3rd Floor, CEP 04044-020, São Paulo, Brazil. Tel: +55 11 5576 4447; fax: +55 11 5576 4499.

E-mail addresses: mhayashi@unifesp.br, mirianhayashi@yahoo.com (M.A.F. Hayashi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.044>
0920-9964/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Gadelha, A., et al., ACE I/D genotype-related increase in ACE plasma activity is a better predictor for schizophrenia diagnosis than the genotype alone, *Schizophr. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.044>

Apêndice 18: Giguek et al., submetido para a *Biological Psychiatry***A MOLECULAR SIGNATURE FOR AUTISM SPECTRUM DISORDERS**

Carolina O. Giguek*, Elizabeth S. Chen*, Vanessa K. Ota, Alpha B Diallo, Kathryn Vaillancourt, Juan P. Lopez, Gang G. Chen, Gilles Maussion, Carl Ernst

Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, Quebec, H4H 1R3, Canada

* equal contributing authors

ABSTRACT

Genes implicated in autism spectrum disorders (ASDs) may have convergent cell functions and several cellular pathways have been implicated, including protein translational control, chromatin modification, and synapse assembly. Here we test the convergent effects of *MBD5* and *SATB2* reduced dosage in human neural stem cells (NSCs), two genes implicated in 2q23.1 and 2q33.1 deletion syndromes (DS), respectively, where both syndromes are on the autism spectrum. We show that reduced dosage of either leads to significant overlap of gene expression patterns, microRNA patterns, and DNA methylation states with control NSCs in a differentiating state, suggesting that a unifying feature of ASDs may be a lack of regulation between proliferation and differentiation in human neural stem cells. Function of other ASD-associated genes including *MECP2*, *FMR1*, and *TSC1/2*, suggests the regulation of differentiation in neural stem cells may be a common convergence point for ASDs more generally. These findings provide a measurable molecular signature to relate iPSC-derived patient NSC characteristics to clinical phenotype, and an assay to test pharmacological therapies to treat ASDs.

Keywords: Neurodevelopmental disorders, MBD5, SATB2 cell differentiation

Apêndice 19: Santoro et al., submetido para a World Journal of Biological Psychiatry

GENE EXPRESSION ANALYSIS IN BLOOD OF SUBJECTS IN ULTRA-HIGH RISK COMPARED TO FIRST-EPISODE OF PSYCHOSIS PATIENTS AND HEALTHY CONTROLS

Marcos Leite Santoro^{1,2}, Ary Gadelha^{2,3}, Vanessa K Ota^{1,2}, Graciele R da Cunha³, Elson Asevedo³, Cristiano S Noto^{3,4}, Leticia N Spindola^{1,2}, Pedro Pan^{2,3}, Fernanda Talarico¹, Rodrigo B. Mansur^{2,3}, Patricia N Silva^{1,2}, Elisa Brietzke^{2,3}, João Ricardo Sato⁵, Quirino Cordeiro⁴, Rodrigo A Bressan^{2,3}, Sintia Iole Belangero^{1,2*}

¹ Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de Sao Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil;

² LiNC - Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences, UNIFESP, São Paulo, Brazil;

³ PRISMA- Program of Recognition and Intervention in subjects At-Risk Mental States, UNIFESP, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Psychiatry, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSp), São Paulo, Brazil

⁵ Center of Mathematics, Computation and Cognition, Universidade Federal do ABC, Santo André, Brazil.

ABSTRACT:

Prevention is an effective strategy to reduce the burden of schizophrenia, but accurate identification of individuals at-risk for psychosis is a significant limitation. This study aimed to investigate the gene expression in blood of Ultra-High-Risk (UHR) subjects compared to first-episode psychosis individuals (FEP) and healthy controls (HC). We enrolled 22 UHR, 67 FEP and 66 HC and investigated the expression of 12 genes by Taqman[®] assay. We used Univariate General Linear Model and Bonferroni correction for multiple comparisons ($p < 0.004$). We found that *UFD1L* gene was upregulated in UHR group compared to HC and FEP ($p = 1.27 \times 10^{-7}$; $p = 4.1 \times 10^{-4}$), and that *NDEL1* and *MBP* were downregulated in UHR compared to FEP ($p = 0.027$; $p = 1.67 \times 10^{-5}$). Besides, we found a positive correlation in the expression of *NDEL1* and *MBP* ($p = 2.6 \times 10^{-8}$; $r = 0.4$). These genes are directly related to neurodevelopmental processes and have been associated to schizophrenia. *MBP* and *NDEL1* seem to be involved in a common process with a positive correlation between them. *UFD1L* displayed a good potential as a biomarker for UHR group, since it showed a different pattern of expression in this group compared to HC and FEP. Several differences were found in the gene expression pattern between distinct clinical stages of schizophrenia. Further studies can improve knowledge on disease progression and putative targets to preventive strategies.

Key Words: Schizophrenia; Gene expression; *UFD1L*; *MBP*; *NDEL1*.

Apêndice 20: Spíndola et al., submetido para a World Journal of Biological Psychiatry

EXPRESSION PROFILE OF TNF-ALPHA AND ITS RECEPTORS GENES IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH MAJOR DEPRESSIVE DISORDER

Leticia M Spindola^{1,2,3,a}, Pedro M Pan^{2,3,4,a}, Patricia N Silva^{2,3,4}, Marcos L Santoro^{1,2,3}, Vanessa K Ota^{1,2,3}, Ary Gadelha^{2,3,4}, Rodrigo B. Mansur^{2,3,4}, Mateus Levandowski^{3,6,7}, Giovanni Salum^{3,8}, Gisele G. Manfro^{3,8}, Ana Soledade Graeff-Martins^{3,5}, Jair J Mari^{2,3,4}, Helena Brentani^{3,5}, Rodrigo Grassi-Oliveira^{3,6,7}, Elisa Brietzke^{2,3,4}, Eurípedes C Miguel^{3,5}, Luis A Rohde^{3,8}, João R Sato^{3,9}, Rodrigo A Bressan^{2,3,4}, Sintia I Belangero^{1,2,3,4}

¹ Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de Sao Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil;

² LiNC - Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences, UNIFESP, São Paulo, Brazil;

³ National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents (INPD), Brazil;

⁴ Department of Psychiatry, UNIFESP, São Paulo, Brazil;

⁵ Department & Institute of Psychiatry, University of São Paulo Medical School, São Paulo – Brazil;

⁶ Post-Graduation Program in Psychology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

⁷ Developmental Cognitive Neuroscience Research Group (GNCD), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

⁸ Department of Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Brazil;

⁹ Center of Mathematics, Computation and Cognition, Universidade Federal do ABC, Santo André, Brazil.

^a These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT:

Objectives: Our aims are to evaluate the gene expression of TNF, TNFR1 and TNFR2 in blood of children and adolescents with major depressive disorder (MDD) compared to controls and to correlate gene expression with global psychopathology (CBCL DSM-oriented scale for affective problems). **Methods:** This is a cross-sectional study analyzing data from the HRC Study. Peripheral blood was drawn from 18 children and adolescent with MDD diagnosis and 55 controls. The gene expression was assessed using Taqman® Low Density Array technology and analyzed using the GLM with Bonferroni's correction for multiple comparisons. **Results:** We found that TNF ($p=9.00 \times 10^{-4}$, fold regulation=-1.74) and TNFR1 ($p=6.16 \times 10^{-6}$, fold regulation=-2.04) levels were decreased in MDD group compared to controls. Moreover, Δ Crt values of TNF and TNFR1 were positively correlated with CBCL DSM-oriented score (TNF: $p=0.014$, $r=0.276$; TNFR1: $p=0.003$, $r=0.329$), whereas TNFR2 was negatively correlated ($p=0.022$, $r=-0.255$). **Conclusions:** To our knowledge, this

is the first study investigating the gene expression of TNF, TNFR1 and TNFR2 in children with MDD. The downregulation of TNF and TNFR1 may be related to a physiological feedback implicated in the disruption of inflammation pathways in childhood MDD.

Keywords: Major depressive disorder; Children; Adolescents; Genetics; Gene expression; Inflammation.

Apêndice 21: Gouvea et al., em redação**THE ROLE OF CNR1 GENE IN SCHIZOPHRENIA: NEW EVIDENCE AND A SYSTEMATIC REVIEW OF AVAILABLE DATA**

Eduardo Sauerbronn Gouvêa^{1,2,3*}, Airton Ferreira Santos Filho^{1,2*}, Vanessa Kiyomi Ota^{2,4*}, Vinicius Mrad⁴, Ary Gadelha^{1,2}, Rodrigo Affonseca Bressan^{1,2}, Quirino Cordeiro^{1,3}, Sintia Iole Belangero^{1,2,4}

1. Department of Psychiatry and Psychology - Universidade Federal de São Paulo
2. Interdisciplinary Clinical Neurosciences Laboratory (LINC) - Universidade Federal de São Paulo
3. Department of Psychiatry – Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
4. Department of Morphology and Genetics - Universidade Federal de São Paulo

* These authors contributed equally for this manuscript.

ABSTRACT:

CNR1 gene encodes cannabinoid receptors classically enrolled on schizophrenia pathophysiology, a multifactorial disorder caused by a complex interaction of genetic and environmental factors on its etiology. Currently, on genetic domain, it is known that there is a combination of multiple common alleles, each one contributing with a small to moderate effect, and possibly some rare alleles with much larger effect size. The aim of this study is to present unpublished results of an association study in a Brazilian population and to perform a systematic review of the association studies between schizophrenia (and its subphenotypes) and the *CNR1* gene. Two reviewers independently searched for eligible studies and extracted outcome data. Papers included in the systematic review were retrieved from Pubmed and ISI Web of Knowledge, using the search terms: “schizophrenia” in combination with “*CNR1*” or “*CB1*” or “cannabinoid receptor”. Twenty-one articles met our inclusion criteria. We additionally present our data comparing 182 schizophrenic patients and 244 healthy controls. In conclusion, no consistently evidence is demonstrated. Even so some “positive” association studies stress the need for further endocannabinoid genetics investigations on schizophrenia fields.

Keywords: Systematic review; *CNR1* gene; cannabinoid receptors; schizophrenia; genotyping studies; *CB1* receptor.