



## ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU

**Helena Torrell Galceran**

**Dipòsit Legal: T 1110-2014**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

# *Anàlisi de l'ADN mitocondrial en el trastorn mental greu*

*Tesi doctoral*  
Helena Torrell Galceran



Helena Torrell Galceran

# ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU

TESI DOCTORAL

dirigida per la Dra. Lourdes Martorell Bonet  
Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2014



**Departament de Medicina i Cirurgia  
Unitat de Psiquiatria i Psicologia Mèdica**

C/Sant Llorenç 21  
43201 Reus  
Tel: 977 75 93 45  
Fax: 977 75 93 22

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU" que presenta **l'Helena Torrell Galceran**, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d'aquesta universitat i apleix els requeriments necessaris per a l'obtenció del títol de Doctora.

Reus, \_\_\_\_\_

La directora de la tesi doctoral

Dra. Lourdes Martorell Bonet

*Dedicat a totes  
les dones científiques*

---

# *Agraïments*

Diuen que aquesta part de la tesi és la més difícil... però no us deixeu enredar! De fet, potser és la part més agraïda (valgui la redundància!). Al llarg de la nostra vida compartim vivències amb persones però mai trobem l'espai per dir-los quin impacte han tingut, i com de contents n'estem d'haver-los conegut. Així que m'agrada tenir un apartat específic per fer-ho. Hi ha molta gent que ha entrat en la meua vida en aquests darrers tres anys, hi ha gent que ja hi era des de fa temps i, per sort, ningú no n'ha sortit. A tots vosaltres us correspon una part d'aquesta tesi.

Primer de tot, als meus pares perquè sense ells no seria aquí. A la meua mare, per haver confiat en mi a cegues, per haver-me recolzat sense esperar res a canvi ni qüestionar cap decisió i per tota la seva ajuda en l'*sprint* final. Al meu pare, per haver-me impulsat a tirar endavant i haver-me ensenyat a fer la feina ben feta.

I sobretot a la Lourdes, per haver-me guiat sense prendre'm l'autonomia, per haver estat al meu costat incondicionalment, per haver-me deixat prendre decisions, per haver-me ensenyat el valor dels treballs realitzats amb rigor i constància, per haver cregut en les meves capacitats i per haver fet possible aquest treball en tots els seus vessants. Per haver estat una directora excepcional, per haver-me donat milers d'oportunitats per formar-me i créixer, però sobretot, per haver-me deixat aprendre d'ella com a professional i com a persona.

A la Nerea, per haver estat companya de colze a colze, per haver-me deixat gaudir del seu embaràs, per haver après juntes que el procés predoctoral et permet ser biòlogues, metgesses, psiquiàtriques, genetistes, estadistes, lingüistes tot en un! Per no haver tingut mai un "no" quan li he demanat ajuda i per l'estoneta de conversa de les 8 del matí.

A l'Elisabet, per haver-me permès l'entrada al grup i per haver-me acollit des del primer dia. Per haver-me donat el màxim d'oportunitats per al meu aprenentatge professional. Per haver-me ensenyat a fer recerca de qualitat.

A la Bàrbara, per introduir-me al grup i al treball de laboratori i haver-me facilitat l'adaptació. A la Yolanda per el seu suport i afecte sobretot en aquest últim tram de la tesi. A l'Ana per haver aconseguit que deixés d'odiar l'estadística! A tots els i les membres del GIP: el Joaquin, la Carmen, el Marcel i l'Alex per la seva calidesa i per haver-me fet sentir part d'un tot. Al David, per tots els matins de bici i agulles! A la Rosa i la Laura, per la nostra experiència austríaca.

A tots els mitos, en especial la Glòria, però també el Marc i la Cons, per haver-me acollit des del primer dia com una més, per haver-me ensenyat tots els experiments amb moltíssima paciència, pel seu afecte incondicional i sobretot, pel seu suport.

Al Gerard, per haver fet de l'aprenentatge de l'Ion Torrent, una experiència compartida i motivadora. A la Kerrie, per la professionalitat mostrada i per haver-me facilitat un munt la feina! A la Marta, per estar sempre predisposada a ensenyar-me. A l'Esther, pel curs intensiu en Western Blot. A la Lídia, pel seu bon tracte i professionalitat i per veure els errors a temps!

A la Laura, la meva germana, per haver-me fet tocar de peus a terra en moments de baixon.

A la Joana, per haver estat al meu costat dia a dia. A l'Eli, pels whatsapp que arriben al moment oportú. A la Laia, per les tardes d'anar a córrer i per haver-me pujat sempre la moral. A la Michela pels seus "respira y sonrío". A l'Albert, per les seves correccions lingüístiques d'última hora, sense dir ni piu! A la Sandra, pel curs intensiu d'*Indesign* i per la seva paciència!

I a l'Arnau, per haver vessat la seva creativitat en aquest treball, per haver dedicat temps, esforç i il·lusió en aquest projecte i per haver deixat una part d'ell en aquesta tesi i en la meva vida.

A tots vosaltres, amb tota la sinceritat del món: gràcies.

*Tot està per fer  
i tot és possible.*

*Miquel Martí i Pol*



---

# Índex

|   |              |
|---|--------------|
| <b>Justificació</b>                                     | <b>XXI</b>   |
| <b>Abreviatures</b>                                     | <b>XXIII</b> |
| <br>  |              |
| <b>Introducció</b>                                      | <b>1</b>     |
| <b>1. Els mitocondris</b>                               | <b>3</b>     |
| 1.1. Qüestions generals                                 | 3            |
| 1.2. Origen   | 4            |
| 1.3. Estructura   | 5            |
| 1.4. Funcions   | 6            |
| 1.4.1. Sistema aeròbic de producció d'energia           | 6            |
| 1.5. Biogènesi i segregació mitòtica                    | 10           |
| 1.6. El genoma mitocondrial                             | 10           |
| 1.6.1. Replicació, transcripció i traducció de l'ADNmt  | 13           |
| 1.6.2. Taxa de mutació de l'ADNmt                       | 16           |
| 1.6.3. Transmissió de l'ADNmt                           | 17           |
| 1.6.4. Inserció de l'ADNmt a l'ADNn                     | 18           |
| 1.6.5. Els haplogrups mitocondrials                     | 18           |
| 1.7. Estrès oxidatiu                                    | 20           |
| 1.7.1. Implicació de l'estrès oxidatiu en l'envelliment | 21           |
| 1.8. Malalties mitocondrials                            | 22           |
| 1.8.1. Característiques clíniques i bioquímiques        | 23           |
| 1.8.2. Característiques genètiques                      | 26           |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2. Els trastorns mentals</b>                    | <b>32</b> |
| 2.1. Qüestions generals                            | 32        |
| 2.2. Sistemes de diagnòstic                        | 33        |
| 2.3. Trastorn mental greu                          | 34        |
| 2.3.1. Trastorns psicòtics                         | 34        |
| 2.3.1.1. L'esquizofrènia                           | 35        |
| 2.3.2. Trastorns de l'estat d'ànim                 | 38        |
| 2.3.2.1. Trastorn bipolar                          | 40        |
| 2.3.2.2. Depressió major                           | 41        |
| 2.4. Genètica dels trastorns mentals               | 44        |
| 2.4.1. Visió general                               | 44        |
| 2.4.2. Resultats d'estudis d'associació            | 47        |
| 2.4.3. Resultats d'estudis de seqüenciació massiva | 49        |
| 2.4.4. Resultats d'estudis epigenètics             | 50        |
| 2.4.5. Conclusions globals                         | 50        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. Implicació dels mitocondris en el trastorn mental greu.</b>                      | <b>52</b> |
| 3.1. Visió general   | 52        |
| 3.2. Alteracions en l'estructura i funció mitocondrials                                | 53        |
| 3.2.1. Alteracions en la ultraestructura mitocondrial                                  | 53        |
| 3.2.2. Alteracions en el metabolisme energètic   | 53        |
| 3.2.3. Canvis en l'activitat de la cadena respiratòria mitocondrial                    | 54        |
| 3.2.4. Estrès oxidatiu   | 56        |
| 3.3. Evidències d'herència materna   | 57        |
| 3.4. Evidències de comorbiditat psiquiàtrica i malaltia mitocondrial                   | 58        |
| 3.5. Variants de l'ADNmt en el trastorn mental greu                                    | 59        |
| 3.5.1. Variants en la seqüència d'un sol nucleòtid (mtSNP)                             | 59        |
| 3.5.1.1. Haplogrups mitocondrials  | 65        |
| 3.5.2. Delecions en l'ADNmt  | 66        |
| 3.5.3. Contingut d'ADNmt   | 67        |
| 3.6. Alteracions en l'expressió gènica relacionada<br>amb el funcionament mitocondrial | 68        |
| 3.6.1. Gens codificats en l'ADNn   | 68        |
| 3.6.2. Gens codificats en l'ADNmt  | 70        |
| 3.7. Conclusió global  | 71        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Hipòtesis i Objectius</b>   | <b>73</b>  |
| <b>Resultats</b>   | <b>77</b>  |
| <b>RT-qPCR study on post-mortem brain samples from patients with major psychiatric disorders: Reference genes and specimen characteristics.</b>  | <b>83</b>  |
| Nerea Abasolo, Helena Torrell, Bàrbara Roig, Sílvia Moyano, Elisabet Vilella i Lourdes Martorell. Journal of Psychiatric Research, 2011  |            |
| <b>Mitochondrial DNA (mtDNA) in Brain Samples From Patients With Major Psychiatric Disorders: Gene Expression Profiles, MtDNA Content and Presence of the MtDNA common Deletion.</b>           | <b>86</b>  |
| Helena Torrell, Elena Montaña, Nerea Abasolo, Bàrbara Roig, Ana M. Gaviria, Elisabet Vilella i Lourdes Martorell. American Journal of Medical Genetics part B: Neuropsychiatric Genetics, 2013 |            |
| <b>Mitochondrial DNA (mtDNA) variants do not have a major role in schizophrenia.</b>   | <b>88</b>  |
| Helena Torrell, Antonio Salas, Nerea Abasolo, Constanza Morén, Glòria Garrabou, Joaquín Valero, Yolanda Alonso, Elisabet Vilella, Javier Costas i Lourdes Martorell. Enviat a Human Genetics   |            |
| <b>Discussió</b>   | <b>91</b>  |
| <b>Relació de publicacions</b>   | <b>109</b> |
| <b>Conclusions</b>   | <b>143</b> |
| <b>Glossari</b>  | <b>147</b> |
| <b>Referències</b>   | <b>163</b> |

# *Justificació*

No es coneix encara què causa l'esquizofrènia i altres trastorns mentals greus, però els factors genètics hi tenen un paper rellevant. La majoria d'estudis genètics han buscat mutacions o variants de risc associades a la malaltia en el genoma nuclear, però gairebé totes les cèl·lules humanes contenen un altre genoma en els mitocondris, que són els orgànuls encarregats de generar energia. Aquest altre genoma és l'ADN mitocondrial (ADNmt), una molècula que, malgrat només tenir 16.569 parelles de bases, és d'una importància cabdal per al bon funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial i, per tant, per a la generació d'energia. Aquesta molècula té la particularitat que s'hereta, solament, per via materna i és d'una rellevància especial en el teixit cerebral on es troben les alteracions que causen els trastorns mentals. Les cèl·lules del cervell requereixen una gran quantitat d'energia, i per aquest motiu tenen un gran nombre de mitocondris i, en conseqüència, un gran nombre de molècules d'ADNmt.

El grup de recerca en el qual he desenvolupat aquest treball de tesi doctoral va iniciar l'estudi de l'ADNmt arran de l'observació d'una predominant herència materna en un conjunt de famílies amb membres afectats d'esquizofrènia. Malgrat que la majoria de pacients no tenen antecedents familiars, sí que està descrit en la bibliografia que en els casos familiars predomina el patró d'herència materna. Aquest escenari assenyala que mutacions o variants de risc en l'ADNmt podrien predisposar a desenvolupar la malaltia. Un altre escenari possible és que, al llarg de la vida, l'acumulació de mutacions somàtiques en l'ADNmt podrien contribuir a la disfunció mitocondrial que s'ha observat tant en l'esquizofrènia com en altres trastorns psiquiàtrics des del punt de vista estructural, enzimàtic i metabòlic. Per tant, l'ADNmt podria contribuir al desenvolupament de l'esquizofrènia i d'altres trastorns psiquiàtrics des de dos vessants: 1) per ser portador de mutacions o de variants que confereixen risc per a la malaltia a través de l'herència materna i 2) per l'acumulació de mutacions somàtiques al llarg de la vida. En ambdós casos, la genètica mitocondrial contribuiria a la disfunció mitocondrial. Aquestes dues hipòtesis són la principal justificació d'aquest treball de tesi.

---

# Abreviatures

**ADN:** àcid desoxiribonucleic

**ADNc:** ADN complementari

**ADNmt:** ADN mitocondrial

**ADNn:** ADN nuclear

**ADP:** adenosina difosfat

**ARN:** àcid ribonucleic

**ARNm:** ARN missatger

**ARNr:** ARN ribosòmic

**ARNt:** ARN de transferència

**ATP:** adenosina trifosfat

**BDNF:** *brain derived neurotrophic factor*\*;  
factor neurotròfic derivat del cervell

**BMP5:** *bone morphogenetic protein 5*\*;  
proteïna morfogenètica òssia

**CACNA1C:** *calcium channel, voltage-dependent,  
L type, alpha 1C subunit*\*; subunitat  $\alpha$  1C  
del canal de calci dependent de voltatge

**CI:** complex I

**CII:** complex II

**CIII:** complex III

**CIV:** complex IV

**CNV:** *copy number variant*;  
variant de número de còpia

**CoA:** coenzim A

**CPEO:** *chronic progressive external  
ophthalmoplegia*; oftalmoplegia  
externa progressiva crònica

**Cq:** *quantification cycle*; cicle de quantificació

**CV:** complex V

**DGUOK:** *deoxyguanosine kinase*\*;  
cinasa desoxiguanosina

**D-loop:** *displacement loop*; bucle de desplaçament

**DMDF:** *Diabetes mellitus and deafness*;  
Diabetis mellitus amb sordesa

**dNTPs:** desoxiribonucleòtids trifosfats

**DSM:** *Diagnostic and Statistical Manual of  
Mental Disorders*; manual diagnòstic i estadístic  
dels trastorns mentals

**ENCODE:** *Encyclopedia of DNA Elements*;  
enciclopèdia d'elements d'ADN

**FADH2:** dinucleòtid de flavina-adenina

**GAPDH:** *glyceraldehyde-3-phosphate  
dehydrogenase*\*; gliceraldehid-3-fosfat  
deshidrogenasa

**GWAS:** *genome-wide association study*;  
estudi d'associació de genoma complet

**HBB:** *hemoglobin, beta*\*; hemoglobina beta

**h-mtRPOL:** *human polymerase (RNA)  
mitochondrial (DNA directed)*;  
polimerasa mitocondrial

**IC:** interval de confiança

**ICD:** *International Classification of Diseases*;  
classificació internacional de les malalties

**Ile:** isoleucina

**KSS:** *Kearns-Sayre syndrome*;  
síndrome de Kearns-Sayre

**LHON:** *Leber's hereditary optic neuropathy*;  
neuropatia òptica hereditària de Leber

**lncRNA:** *long non-coding RNA*;  
ARN llargs no codificants

**MB-COMT:** *membrane-bound catechol-O-methyltransferase*;  
catecol-O-metiltransferasa unida a membrana

**MDS:** *mitochondrial DNA depletion syndrome*;  
síndrome de depleció d'ADN mitocondrial

**MELAS:** *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*;  
encefalopatia mitocondrial amb acidosi làctica i episodis d'ictus

**MERRF:** *myoclonic epilepsy with ragged red fibres*;  
encefalopatia mioclònica amb fibres vermelles esquinçades

**MHC:** *major histocompatibility complex*;  
complex major d'histocompatibilitat

**MIR137:** microRNA 137\*

**MM:** *mitochondrial myopathy*;  
miopatia mitocondrial

**MMC:** *mitochondrial myopathy and cardiomyopathy*;  
miopatia i cardiomiopatia mitocondrials

**MPV17:** *mpV17 mitochondrial inner membrane protein*\*; proteïna de membrana interna mitocondrial MpV17

**MT-7S:** *mitochondrially encoded 7S DNA*;  
regió 7S de l'ADNmt

**MT-ATP6:** *mitochondrially encoded ATP synthase 6*\*; ATP sintasa 6 mitocondrial

**MT-ATP8:** *mitochondrially encoded ATP synthase 8*\*; ATP sintasa 8 mitocondrial

**MT-CO1:** *mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I*\*; citocrom c oxidasa 1 mitocondrial

**MT-CO2:** *mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II*\*; citocrom c oxidasa 2 mitocondrial

**MT-CO3:** *mitochondrially encoded cytochrome c oxidase III*\*; citocrom c oxidasa 3 mitocondrial

**MT-CYB:** *mitochondrially encoded cytochrome b*\*; citocrom b mitocondrial

**mtDNA:** *mitochondrial DNA*; ADN mitocondrial

**MTERF:** *mitochondrial transcription termination factor*\*; factor de terminació de la transcripció mitocondrial

**MT-ND1:** *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1*\*; subunitat 1 de l'NADH deshidrogenasa codificada a l'ADNmt

**MT-ND2:** *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2*\*; subunitat 2 de l'NADH deshidrogenasa codificada a l'ADNmt

**MT-ND3:** *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3*\*; subunitat 3 de l'NADH deshidrogenasa codificada a l'ADNmt

**MT-ND4:** *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4\**; subunitat 4 de l'NADH deshidrogenasa codificada a l'ADNmt

**MT-ND4L:** *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4L\**; subunitat 4L de l'NADH deshidrogenasa codificada a l'ADNmt

**MT-ND5:** *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5\**; subunitat 5 de l'NADH deshidrogenasa codificada a l'ADNmt

**MT-ND6:** *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6\**; subunitat 6 de l'NADH deshidrogenasa codificada a l'ADNmt

**MT-RNR1:** *mitochondrially encoded 12S RNA\**; subunitat 12S de l'ARNr codificat a l'ADNmt

**MT-RNR2:** *mitochondrially encoded 16S RNA\**; subunitat 16S de l'ARNr codificat a l'ADNmt

**mtSNP:** *mitochondrial SNP*; SNP mitocondrial

**mtTERF:** *mitochondrial transcription terminator factor*; factor de finalització de la transcripció

**mtTFA:** *mitochondrial transcription factor A*; factor A de transcripció mitocondrial

**mtTFB:** *mitochondrial transcription factor B*; factor B de transcripció mitocondrial

**NADH:** dinucleòtid de nicotinamida-adenina

**NARP:** neuropatia, atàxia i retinitis pigmentària

**NDUFV2:** *NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2\**; NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteïna

**NUMTs:** *nuclear inserts of mtDNA*; insercions d'ADNmt en l'ADNn

**OMIM:** Online Mendelian Inheritance in Man

**OMS / WHO:** Organització Mundial de la Salut / World Health Organization

**OR:** *odds ratio*; oportunitat relativa

**PANSS:** *Positive and Negative Syndrome Scale*; escala de símptomes positius i negatius

**pb:** parell de bases

**PCR:** *polymerase chain reaction*; reacció en cadena de la polimerasa

**PEM:** *Encephalomyopathy*; encefalomiopatia

**PGC:** Psychiatric Genomics Consortium; consorci de psiquiatria genòmica

**POLG:** *polymerase (DNA directed), gamma\**; polimerasa gamma (dirigida per ADN)

**POLG2:** *polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit\**; subunitat accessòria de la polimerasa gamma 2 (dirigida per ADN)

**PS:** *Pearson Syndrome*; síndrome de Pearson

**qPCR:** PCR quantitativa

**rCRS:** *revised Cambridge Reference Sequence*; seqüència de referència de Cambridge revisada

**RMN:** ressonància magnètica nuclear

**RNS:** *reactive nitrogen species*; espècies reactives d'oxigen

**ROS:** *reactive oxygen species*; espècies reactives de nitrogen



**RPL30:** *ribosomal protein L30\**;  
proteïna L30 ribosòmica

**RPLP0:** *ribosomal protein, large, P0\**;  
proteïna P0 llarga ribosòmica

**RPPH1:** *ribonuclease P RNA component H1\**;  
component H1 de la ribonucleoproteïna  
RNAasa P

**RPS17:** *ribosomal protein S17\**;  
proteïna ribosòmica S17

**RQI:** *RNA quality indicator*;  
indicador de la qualitat de l'ARN

**RRM2B:** *ribonucleotide reductase M2 B*  
(*TP53 inducible*); ribonucleòtid reductasa M2 B

**RT-qPCR:** *reverse transcription quantitative*  
*PCR*; transcripció reversa i qPCR

**SLC25A12:** *solute carrier family 25*  
(*aspartate/glutamate carrier*), *member 12*;  
12è membre del transportador d'asparat/  
glutamat de la família 25

**SLC25A19:** *solute carrier family 25*  
(*mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier*),  
*member 19*; 19è membre del transportador  
mitocondrial de tiaminapirofosfat de la família 25

**SNP:** *single nucleotide polymorphism*;  
polimorfisme d'un sol nucleòtid

**SSBP:** *single-stranded DNA binding protein*;  
proteïna d'unió a l'ADN d'una sola cadena

**SUCLA2:** *succinate-CoA ligase, ADP-forming,*  
*beta subunit*; subunitat beta formadora d'ADP  
de la succinat-CoA lligasa

**SUCLG1:** *succinate-CoA ligase, alpha subunit*;  
subunitat alfa de la succinat-CoA lligasa.

**TFRC:** *transferrin receptor*;  
receptor de transferrina

**Thr:** treonina

**TK2:** *thymidine kinase 2, mitochondrial*;  
cinasa 2 de timidina, mitocondrial

**TYMP:** *thymidine phosphorylase*;  
fosforilasa de timidina

**UTR:** *untranslated regions*;  
regions no traduïdes

\* nom oficial del gen

---

# *Introducció*

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

# 1

## *els mitocondris*

### 1.1. Qüestions generals

---

Els mitocondris (del grec antic *μίτος*, 'filament' i *χονδρίον*, diminutiu de *χόνδρος*, 'gra') són orgànuls cel·lulars que s'encarreguen, principalment, de la producció d'energia. A causa de la seva mida i densitat, poden ser observats al microscopi òptic amb una tinció específica (colorant verd Janus), fet que va facilitar la seva descoberta a finals del segle XIX pel científic Richard Altmann. Varien en forma i mida en funció de l'estat metabòlic de la cèl·lula que els conté (**figura 1**), però, en general, tenen forma ovoide, mesuren al voltant d'un micròmetre de diàmetre i estan en constant moviment (*Lodish et al., 2005*). En el cas de l'organisme humà, els trobem presents en totes les cèl·lules, excepte en els glòbuls vermells, distribuïts pel citosol en major o menor nombre en funció del tipus cel·lular i,



Cervell



Fetge



Múscul esquelètic



Nervi

Font: Vafai i Mootha, 2013

*figura 1*

**Figura 1.** Imatges de microscopia electrònica de mitocondris pertanyents a diferents teixits que mostren les diferents morfologies que aquests poden adoptar en funció de la cèl·lula que els conté.

sobretot, dels requeriments energètics del teixit. És per això que teixits amb una despesa energètica elevada, com el múscul o el teixit del sistema nerviós, poden arribar a tenir 2.000 mitocondris per cèl·lula i teixits amb cèl·lules poc actives, com l'epiteli, en tenen al voltant de 10. Aquesta heterogeneïtat pot ser explicada per diversos processos als quals els mitocondris es veuen sotmesos dins la cèl·lula: augment de la massa mitocondrial (biogènesi); divisió o unió dels mitocondris (fissió-fusió mitocondrial);

destrucció dels mitocondris existents (mitofàgia), i moviment d'aquests al llarg de la cèl·lula (*Vafai i Mootha, 2012*).

Els mitocondris els adquirim només de la mare, ja que n'heretem tots els components cel·lulars que conté l'òvul, i tot i que alguns mitocondris provinents de l'espermatozou poden entrar a l'òvul durant la fecundació, aquests estan marcats per ser destruïts (*Sutovsky et al., 2004; Sato i Sato, 2013*).

## 1.2. Origen

---

Des del moment de la descoberta dels mitocondris a finals del segle XIX, es van proposar diverses teories en relació amb el seu origen. En un primer moment, es va creure que eren organismes independents que vivien dins de les cèl·lules eucariotes, però la seva semblança amb els bacteris, tant d'estructura com de reproducció i bioquímica, va fer canviar la perspectiva. Actualment, s'accepta la teoria dels endosimbionts procariotes (*Margulis, 1975*) com a més probable, per mitjà de la qual s'explica l'origen d'aquests òrgànuls de doble membrana i per què no es traslladen per mitjà del sistema de trànsit de vesícules com fan la resta d'òrgànuls. La teoria endosimbiòtica explica que en un moment de l'evolució, fa uns 1.600 milions d'anys, es va produir una endosimbiosi entre bacteris aerobis i unes cèl·lules procariotes

o eucariotes primitives anaeròbies. D'aquesta invasió, en va resultar un equilibri, ja que la cèl·lula anaeròbia aportava nutrients al bacteri aerobi, i aquest la recompensava amb un sistema de producció energètica altament eficient. L'increment de la supervivència fruit d'aquesta endosimbiosi va fer que, actualment, els mitocondris formin part de la cèl·lula com un component més. Evidentment, cada organisme tenia el seu propi genoma, però al llarg de l'evolució molts dels gens presents en aquell bacteri primitiu van ser transferits al nucli de la cèl·lula contenidora, de tal manera que els mitocondris van deixar de ser viables fora de la cèl·lula. Ara bé, en el seu interior conserven alguns dels gens imprescindibles per al seu funcionament en una sola molècula d'ADN circular, l'anomenat genoma mitocondrial.

### 1.3. Estructura

Els mitocondris són orgànuls de dues membranes, l'externa i la interna (**figura 2**). La membrana externa és llisa i, malgrat que és permeable a molècules de fins a 10.000 daltons de pes molecular, conté uns canals proteics anomenats porines per permetre l'intercanvi de molècules grans entre el mitocondri i el citosol. Així doncs, el piruvat, que és una molècula petita, travessa lliurement la membrana externa mentre les proteïnes mitocondrials codificades al nucli de la cèl·lula entren per les porines per entrar dins l'orgànul. La membrana interna és molt més extensa que l'externa, ja que forma replècs o invaginacions

anomenades crestes mitocondrials. Només és permeable a  $O_2$ ,  $CO_2$  i  $H_2O$ , i per això disposa de diverses proteïnes de transport que permeten el pas de metabòlits, com el piruvat, cap a l'interior del mitocondri. Aquesta membrana té un contingut proteic molt elevat (75%), ja que alberga múltiples tándems de cadenes polipeptídiques. Aquestes cadenes són transportadores d'electrons i responsables de la producció d'energia. La presència d'aquestes dues membranes fa que es generin dos espais separats: l'espai intermembranós, entre la membrana interna i l'externa, i la matriu mitocondrial, que és

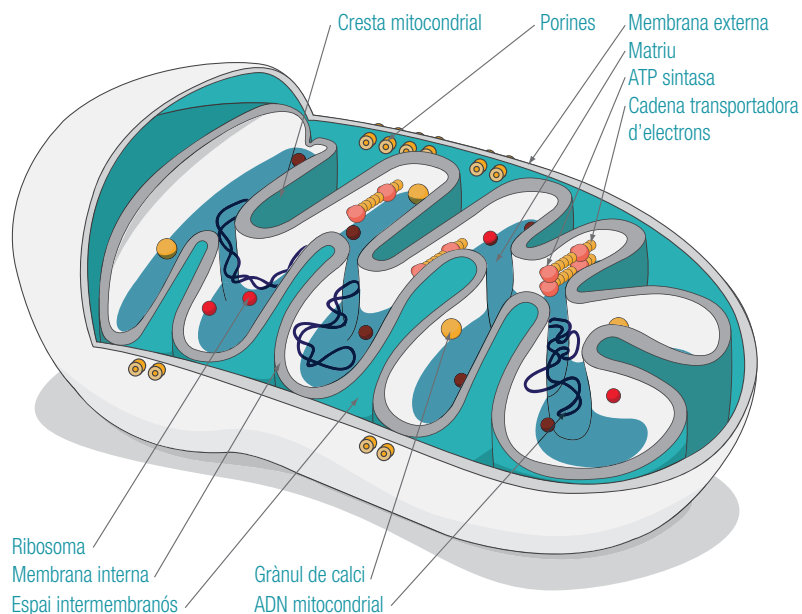


figura 2

**Figura 2.** Estructura i components dels mitocondris.

l'espai central del mitocondri. L'espai intermembranos permet l'acumulació de protons en contra del gradient electroquímic i la creació subsegüent de la força protó-motriu necessària per a la producció d'energia. Aquesta acumulació de protons es produeix gràcies a la cardiolipina, un lípid molt abundant en la membrana interna mitocondrial que conté dues càrregues negatives. La matriu mitocondrial està

composta d'un 50% d'aigua i és l'espai en el qual es produeixen diferents reaccions metabòliques. Conté enzims, metabòlits provinents del catabolisme de la glucosa i dels àcids grassos, ions com el calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ), el genoma mitocondrial i les proteïnes necessàries per a la replicació, transcripció i traducció d'aquest genoma (Alberts et al., 2002; Lodish et al., 2005).

## 1.4. Funcions

---

Els mitocondris desenvolupen funcions vitals per a la supervivència i la reproducció cel·lular, per la qual cosa esdevenen primordials per al correcte funcionament dels teixits i imprescindibles per al manteniment de la vida. Els mitocondris juguen un paper clau en l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$ , ja que tenen la possibilitat d'acumular-lo a la matriu, o bé alliberar-lo al citosol en funció dels requeriments de la cèl·lula en un moment concret, amb tot el que això comporta quant a senyalització cel·lular. A més, participen activament en el cicle de vida cel·lular, ja que desencadenen la mort programada de la cèl·lula per mitjà de la via intrínseca de l'apoptosi, i també contribueixen en la síntesi d'aminoàcids, àcids grassos i nucleòtids. De totes maneres, la funció més rellevant que duen a terme els mitocondris en condicions aeròbiques és la creació d'energia en forma de molècules d'adenosinatrifosfat (ATP) (Alberts et al., 2002).

### 1.4.1. El sistema aeròbic de producció d'energia

La producció d'energia en el mitocondri té lloc gràcies a l'acoblament de la cadena de transport d'electrons i de la fosforilació oxidativa, conjunt anomenat cadena respiratòria mitocondrial. En la cèl·lula de mamífer, i en condicions aeròbiques, és la principal forma de producció d'energia, perquè és la més rendible (Mitchell, 1979).

Per a la producció d'aquesta energia, és necessària l'oxidació de glúcids i àcids grassos provinents de la dieta en un procés que es fa, conjuntament, al citosol i a la matriu mitocondrial. Pel que fa als glúcids, aquests s'oxiden al citosol fins a obtenir piruvat, que entra a la matriu mitocondrial per ser convertit en acetilcoenzim A (acetil-CoA). D'altra banda, els àcids grassos entren directament a la matriu mi-

tocondrial, on són convertits en acetil-CoA en un procés catabòlic anomenat oxidació  $\beta$ . Aquest acetil-CoA present a la matriu mitocondrial, independentment de si prové d'àcids grassos o de glúcids, s'incorpora al cicle de Krebs, també conegut com a

cicle de l'àcid cítric o cicle dels àcids tricarbòxics. En aquest cicle es produeixen una sèrie de reaccions d'oxidació-reducció, de les quals s'obtenen coenzims reduïts, com el dinucleòtid de flavina i adenina ( $FADH_2$ ) i el dinucleòtid de nicotinamida i adenina

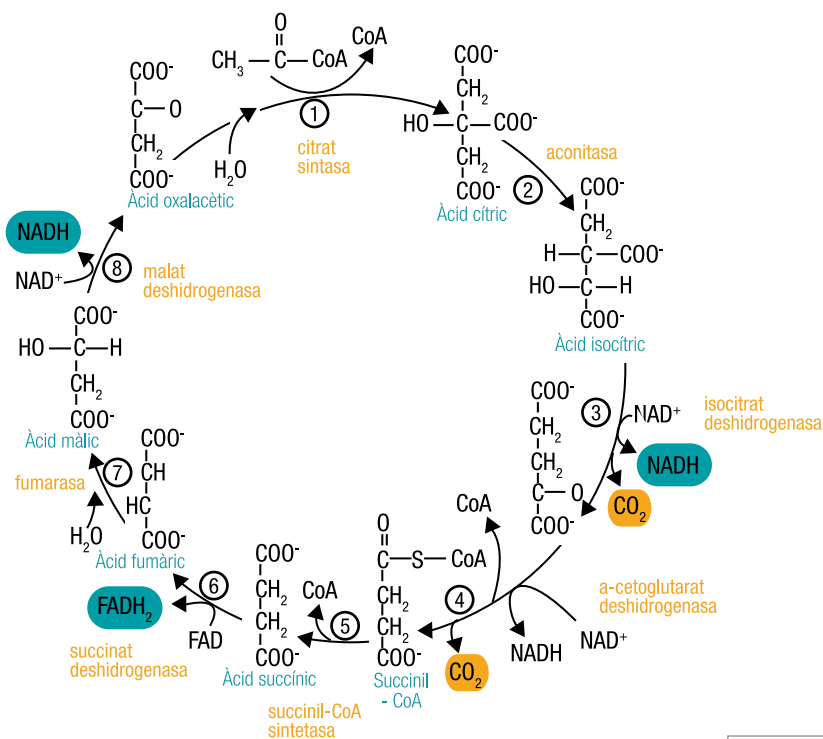


figura 3

Figura 3. Representació dels components i les reaccions presents en el cicle de Krebs.

(NADH) (figura 3). Concretament, l' $NADH$  es genera en la tercera reacció del cicle de Krebs, en la qual l'àcid isocítric es converteix en àcid  $\alpha$ -cetoglutaric, també en la quarta reacció del cicle en el pas d'àcid  $\alpha$ -cetoglutaric a succinil-CoA i, finalment, en la vuitena reacció del cicle en el pas d'àcid màlic a àcid oxalacètic. L' $FADH_2$  es produeix en la sisena reacció

del cicle de Krebs en el pas d'àcid succínic a àcid fumaric (Nelson et al., 2008). Aquests coenzims reduïts ( $NADH$  i  $FADH_2$ ) emmagatzemen l'energia potencial provinent de l'oxidació de la glucosa i dels àcids grassos que serà transferida a través del pas dels seus electrons per la cadena de transport electrònic. Durant aquesta cessió gradual dels electrons,



els protons ubicats en la matriu són bombejats en contra del gradient electroquímic cap a l'espai intermembranós i aquest bombeig fa que la membrana interna es polaritzi i es creï un potencial elèctric. La suma de l'energia present en el gradient de protons amb el potencial elèctric de la membrana és el que s'anomena força protó-motriu, que és la que permet que els protons retornin de nou a la matriu mitocondrial acoblats a la síntesi d'ATP en l'ATP sintasa.

La cadena respiratòria mitocondrial s'ubica a les crestes mitocondrials i està formada pels elements següents: quatre complexos enzimàtics de la cadena transportadora d'electrons, l'ATP sintasa, el coenzim Q (altrament anomenat ubiquinona) i el

citocrom c (**figura 4**). La transferència de protons a l'espai intermembranós mitjançant els complexos I, III i IV permet la creació de la força protó-motriu que és emprada per a la producció d'ATP en el complex V. Així doncs, trobem: el complex I (CI), anomenat NADH-ubiquinona oxidoreductasa, format per 45 subunitats; el complex II (CII), anomenat succinat-deshidrogenasa, format per 4 subunitats; el complex III (CIII), també dit ubiquinonacitocrom c-oxidoreductasa, format per 11 subunitats; el complex IV (CIV), altrament dit citocromoxidasa, format per 13 subunitats, i finalment el complex V (CV), conegut com a ATP sintasa, format per dues porcions anomenades Fo (de 5 subunitats) i F1 (de 9 subunitats) (Lodish et al., 2005).

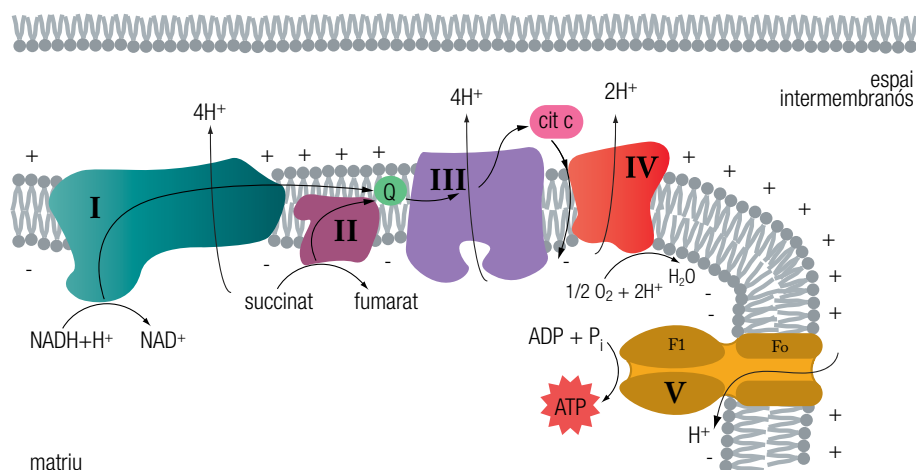


figura 4

**Figura 4.** Cadena respiratòria mitocondrial: acoblament de la cadena transportadora d'electrons amb el sistema de fosforil·lació oxidativa per a l'obtenció d'energia en forma d'ATP en condicions aeròbiques.

El CI catalitza la transferència d'electrons des de l'NADH cap al coenzim Q, i aquest flux d'electrons desencadena un bombeig de protons cap a l'espai intermembranós. El CII transfereix electrons d'FADH<sub>2</sub> també cap al coenzim Q, però en aquest pas no es genera cap bombeig de protons. El coenzim Q actua com a transportador dels electrons i els cedeix al CIII, que els transfereix al citocrom c, moment que sí que es genera un altre bombeig de protons cap a l'espai intermembranós. Finalment, el citocrom c reduït és oxidat pel CIV, i cedeix els electrons a l'O<sub>2</sub> per formar aigua; en aquest pas es genera l'últim bombeig de protons cap a l'espai intermembranós. La força protó-motriu generada, és emprada pel CV per acoblar la difusió d'aquests protons cap a la matriu mitocondrial amb la unió d'un fosfat a l'adenosinadifosfat (ADP). Aquest últim pas és el que s'anomena fosforilació oxidativa (Lodish et al., 2005).

Malgrat que la cadena de transport d'electrons s'ha considerat durant molt de temps un mecanisme lineal de complexos individuals, cada vegada hi ha més evidències que confirmen la formació de supercomplexos, en els quals els complexos s'agruparien entre si per formar una superestructura que afavorís l'estabilitat i la canalització d'electrons, i minimitzés la producció d'espècies reactives d'oxigen (Shoubridge, 2012).

Els sistema de producció d'energia és un mecanisme robust dins de la cèl·lula, ja que té la capacitat de respondre i adaptar-se a la disponibilitat de nutrients i a la demanda energètica del teixit. Està establert que un dels moduladors de la intensitat en la producció d'energia és la disponibilitat d'ADP que estimula o frena la producció d'ATP (Balaban, 1990). Un altre regulador recentment postulat és el Ca<sup>2+</sup>, atès que aquest regula moltes de les reaccions que consumeixen ATP, com la contracció dels múscul, l'exocitosi i la senyalització neuronal. Per tant, és lògic creure que el Ca<sup>2+</sup> moduli la producció d'ATP en funció de la disponibilitat al citosol (Glancy i Balaban, 2012).

En cas d'hipòxia o dèficit en la capacitat de consum d'oxigen, el piruvat no entra dins del mitocondri, sinó que roman al citosol per ser fermentat, convertit en lactat, i obtenir també energia en forma d'ATP, però en un procés de menor rendiment. Tanmateix, el lactat es produeix de forma constant a partir de l'enzim lactat-deshidrogenasa i hi ha un equilibri entre la seva síntesi i la degradació. Quan la producció és superior a la degradació, el lactat és alliberat al torrent sanguini i pot conduir al fenomen d'acidosi làctica.

## 1.5. Biogènesi i segregació mitòtica

---

Els mitocondris nous se sintetitzen per divisió dels existents, mai no se sintetitzen *de novo*, sinó que es divideixen per fissió binària en funció dels requeriments tissulars, o quan la cèl·lula que els conté ha de dividir-se. En el moment de la fissió mitocondrial, que ocorre generalment a la interfase del cicle cel·lular, els mitocondris han de doblar la massa mitocondrial abans de dividir-se i necessiten importar lípids, nucleòtids i proteïnes des del citosol. La biogènesi mitocondrial està regulada per diversos factors, com la disponibilitat de nutrients, l'exercici, la segregació d'hormones, la restricció calòrica o el ritme circadiari (Scarpulla, 2011). És per tot això que la biogènesi mitocondrial és un procés

complex i molt controlat en el qual hi ha implicats canvis en l'expressió de més de 1.000 gens, la cooperació de dos genomes i l'alteració d'un 20% de les proteïnes cel·lulars (Lopez-Lluch et al., 2008).

Quan la cèl·lula es divideix, els mitocondris es reparteixen aleatòriament entre les dues cèl·lules filles, en un procés que s'anomena segregació mitòtica. Si hi ha mitocondris amb versions diferents del genoma mitocondrial, pot ser que les cèl·lules filles n'heretin proporcions diferents, amb les implicacions que això comporta des del punt de vista clínic (Dimauro i Davidzon, 2005), com veurem en els apartats següents.

## 1.6. El genoma mitocondrial

---

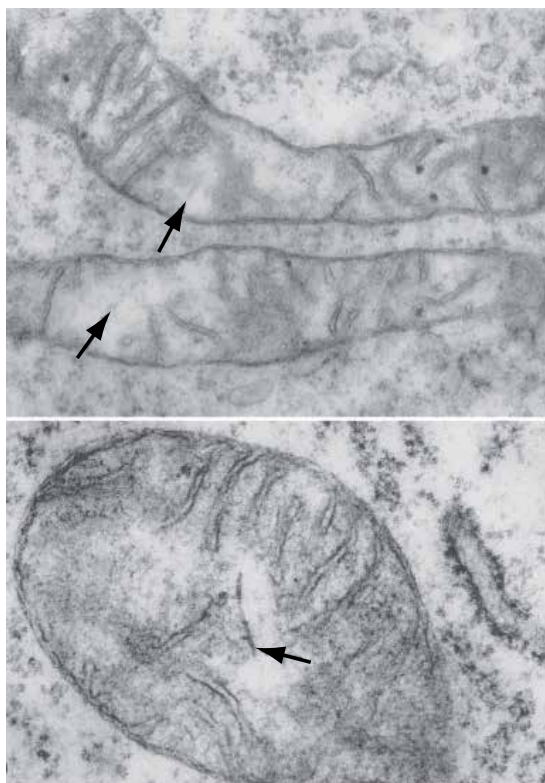
El genoma mitocondrial o ADN mitocondrial (ADNmt) és la molècula d'ADN pròpia del mitocondri. En cada mitocondri pot haver-hi, de mitjana, de 5 a 10 còpies d'aquest genoma (Satoh i Kuroiwa, 1991). Tenint en compte que en cada cèl·lula pot haver-hi de 10 a 2.000 mitocondris, el nombre de genomes mitocondrials és variable i, en determinades cèl·lules, és molt elevat, fenomen que s'anomena poliplàsmia. El nombre de molècules d'ADNmt varia entre unes 1.000 i 10.000 còpies per cèl·lula, amb uns

límits que anirien de 700 còpies en els espermatozous i 100.000 còpies en els òvuls.

El genoma mitocondrial va ser descobert per microscòpia electrònica l'any 1963 (Nass i Nass, 1963) (figura 5), però la primera seqüència completa del genoma mitocondrial humà no va ser descrita i publicada fins al 1981 (Anderson et al., 1981), tot i que, posteriorment, es va veure que contenia errors i se'n va publicar una versió revisada anomenada *revised*

*Cambridge Reference Sequence (rCRS)* (Andrews et al., 1999). Des de llavors, s'empra com a seqüència de referència a l'hora de descriure variants o mutacions en l'ADNmt, i es troba en el repositori GenBank amb la referència NC\_012920. Tota la informació referent a l'ADNmt humà es pot trobar a la base de dades en línia MITOMAP (Ruiz-Pesini et al., 2007; *mitomap.org*). S'hi recullen les variacions en la seqüència de l'ADNmt que s'han descrit i amb

quina freqüència, les mutacions que s'han descobert i si s'han associat a alguna malaltia, diverses il·lustracions, figures i taules sobre l'estructura, contingut i evolució que es coneix del genoma mitocondrial humà. A més, s'hi inclouen diverses eines d'anàlisi i de visualització de la seqüència mitocondrial. Aquesta base de dades es manté, principalment, gràcies a les subvencions del National Institutes of Health.



Font: Nass i Nass, 1963

figura 5

**Figura 5.** Imatges de microscopia electrònica que mostren la descoberta de l'ADNmt l'any 1963, per part dels investigadors Margit i Sylvan Nass.

El genoma mitocondrial és una molècula d'ADN circular de 16.569 parells de bases (pb) i de doble cadena (figura 6). Les dues cadenes no tenen la mateixa proporció de purines i pirimidines, motiu pel qual tenen pesos moleculars diferents; així trobem una cadena lleugera, o L (de l'anglès *light*), i una cadena pesada, o H (de l'anglès *heavy*). Aquest genoma és diferent del genoma nuclear (ADNn) en molts aspectes (taula 1), atès que presenta la informació molt compactada, no té introns, ni regions no traduïdes (de l'anglès *untranslated regions* o UTR), ni tampoc espais intergènics. Per aquesta raó, el percentatge de regió codificant d'ambdues cadenes és del 93% del total de la seqüència. Aquest 93% codifica per 13 polipèptids (gens MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-ND6, MT-CYB, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-ATP6 i MT-ATP8; només un d'aquests

en la cadena lleugera), 2 ARN ribosòmics (gens MT-RNR1 i MT-RNR2, tots aquests en la cadena pesada) i 22 ARN de transferència (vuit d'aquests en la cadena lleugera). El 7% restant de seqüència el forma una regió no codificant anomenada *D-loop* (de l'anglès, *displacement loop*), que és l'encarregada de regular la replicació i transcripció de l'ADNmt (Anderson et al., 1981). Tots els gens de l'ADNmt són imprescindibles per al correcte funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial. De fet, tal i com veurem en un apartat posterior, existeixen muta-

cions i variants en l'ADNmt que són causants de o bé estan associades a malalties mitocondrials.

El genoma mitocondrial es troba a la matriu mitocondrial en la seva estructura terciària i forma part de complexos nucleoproteics associats a la membrana interna anomenats nucleoides (Bogenhagen et al., 2003). La replicació de l'ADNmt, la transcripció als ARN i la traducció proteica es produeixen al mateix mitocondri en un treball conjunt de la maquinària mitocondrial i proteïnes procedents del nucli que ja formen part dels nucleoides (Garrido et al., 2003).

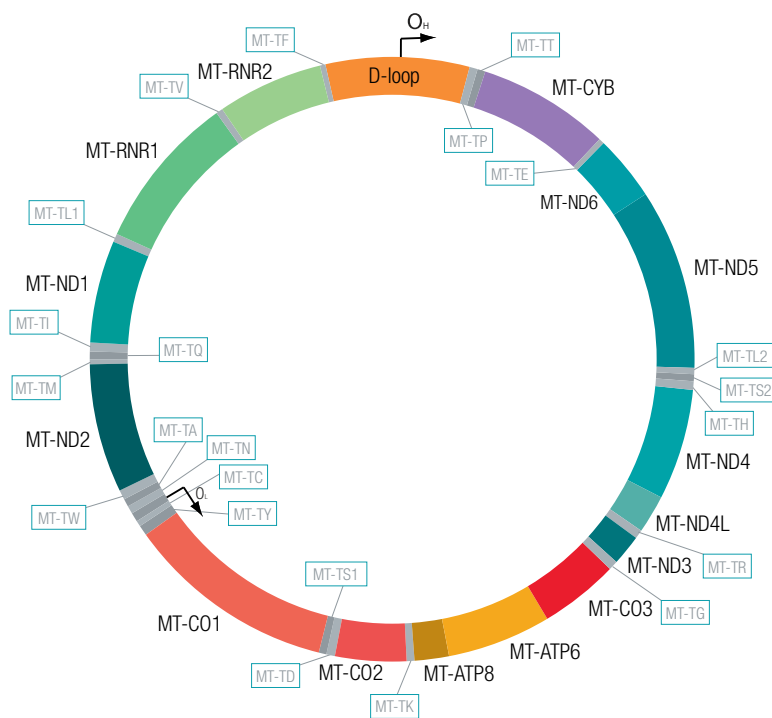


figura 6

**Figura 6.** Estructura de l'ADNmt. Els segments de color representen els 13 gens que codifiquen per proteïnes, els dos gens que codifiquen pels ARN ribosòmics i la regió no codificant D-loop; les caixes representen els 22 ARN de transferència.

### 1.6.1. Replicació, transcripció i traducció de l'ADNmt

En el genoma mitocondrial dels mamífers, la replicació i la transcripció van lligades, ja que els transcrits que se sintetitzen a partir de la cadena lleugera són emprats com a encebadors per a la replicació.

Dels 37 gens que conté l'ADNmt, només 13 són traduïts a proteïna i són imprescindibles per a la for-

mació de la cadena transportadora d'electrons. Les proteïnes ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 i ND6 corresponen a les subunitats 1, 2, 3, 4, 4L, 5 i 6 de l'NADH deshidrogenasa, que correspon al complex I de la cadena transportadora d'electrons, juntament amb proteïnes codificades al nucli; la proteïna CYB correspon al citocrom b que forma part del complex III; les proteïnes CO1, CO2 i CO3 corresponen

*Taula 1.* Principals diferències entre l'ADNn i l'ADNmt.

| Característica                         | ADNn  | ADNmt   |
|--|---|---|
| Mida                                   | ~ 3,3 x 10 <sup>9</sup> pb                                  | 16.569 pb   |
| Tipus de molècula                      | Lineal  | Circular  |
| Nombre de molècules d'ADN per cèl·lula | 23 en les cèl·lules haploides i 46 en les diploides         | 700-100.000 (poliplàsmia)                             |
| Nombre de gens pels que codifica       | Entre 20.000 i 30.000                                       | 37 (13 polipèptids, 22 ARNt i 2 ARNr)                 |
| Densitat gènica                        | 1 per cada 40.000 pb  | 1 per cada 450 pb                                     |
| Introns                                | Freqüents en tots els gens                                  | Absents   |
| Percentatge de regió codificant        | Al voltant del 3%   | 93%   |
| Percentatge de regions repetitives     | 20%   | Inexistent  |
| Codi genètic                           | Universal   | Propi (taula 2)                                       |
| Proteïnes associades al genoma         | Histones i altres proteïnes del nucleosoma                  | No histones, però sí altres proteïnes dels nucleoides |
| Mode d'herència                        | Biparental per tots els cromosomes i patern pel cromosoma X | Matern  |
| Taxa de mutació                        | Baixa<br>2.2 × 10 <sup>-8</sup> pb per generació            | Elevada (10 vegades la de l'ADNn)                     |

a les subunitats 1, 2 i 3 de la citocromoxidasa que es troben en el complex IV, i les proteïnes ATP6 i ATP8 corresponen a les subunitats 6 i 8 d'ATP sintasa Fo que formen part del complex V. Per tant, el complex II és l'únic format exclusivament per polipèptids codificats a l'ADNn.

## Replicació

La replicació del genoma mitocondrial es duu a terme a la matriu mitocondrial, tot i que està regulada pel nucli cel·lular (*Garesse i Vallejo, 2001*). Tots els enzims implicats en aquesta replicació estan codificats en l'ADNn i després de la seva síntesi són transportats cap a dins de la matriu mitocondrial. En la replicació, hi participa la polimerasa gamma (POLG) i la seva subunitat accessòria p55, les proteïnes mitocondrials d'unió a ADN d'una sola cadena (SSBP, de l'anglès *single-stranded DNA binding protein*) i l'helicasa Twinkle. Malgrat que es coneixen els components, el procés de replicació de l'ADNmt encara no està del tot establert. La teoria més acceptada és que la replicació es duu a terme de manera asimètrica i asincrònica a partir dels dos orígens de replicació: l'O<sub>H</sub>, situat en la cadena pesada, i l'O<sub>L</sub>, situat en la cadena lleugera. La síntesi comença a l'O<sub>H</sub> i, tenint la cadena lleugera com a motlle, se sintetitza la nova cadena pesada fins que arriba a l'O<sub>L</sub>, a partir del qual la cadena pesada ini-

cial actua com a motlle i la nova cadena lleugera es va sintetitzant en direcció oposada (*Shadel i Clayton, 1997*). Per a l'inici de la replicació, fa falta un encebador d'ARN que se sintetitza per un procés de transcripció a partir d'una regió del promotor de la cadena lleugera situat a la regió *D-loop*. Un cop sintetitzada la doble cadena, aquesta se separa de les cadenes inicials, els encebadors d'ARN són eliminats i els espais que queden són reomplerts amb nucleòtids. Finalment, el nou ADNmt adopta l'estructura terciària i forma nous nucleoides.

A principi dels anys 2000, es va proposar un nou model de replicació sobre la hipòtesi que les dues cadenes es repliquen de manera simètrica i simultània a partir de múltiples orígens de replicació situats prop de l'O<sub>H</sub> (*Holt et al., 2000; Bowmarker et al., 2003*). La tendència actual és pensar que els dos models coexisteixen en cada mitocondri i que certes condicions fisiològiques podrien promoure'n un o l'altre, tot i que encara no s'ha pogut comprovar.

## Transcripció

Durant la transcripció del genoma mitocondrial, les dues cadenes d'ADN es transcriuen senceres i de forma simètrica generant els ARN ribosòmics (ARNr), els ARN de transferència (ARNt) i diversos ARN poliadenilats (*Fernández-Silva et al., 2003*).

Perquè la transcripció es dugui a terme, cal l'ARN polimerasa específica del mitocondri (h-mtRPOL), dos factors de transcripció (mTFFA, mTFB) i el factor de finalització de la transcripció (mTERF), tots aquests codificats al nucli (Fernández-Silva et al., 2003). El primer que actua és l'mTFFA, que desenrotlla la cadena d'ADN de manera que indueix un canvi estructural específic a la regió del promotor situat al *D-loop*, que permet que la POLRMT iniciï la transcripció (Shadel i Clayton, 1997). Els productes de la transcripció són els 2 ARNr i un ARN precursor que conté aquests dos ARNr, els 22 ARNt i 18 ARN poliadenilats (Fernández-Silva et al., 2003, figura 1).

Quatre d'aquests ARN poliadenilats i 8 ARNt són productes de la transcripció de la cadena lleugera, la resta es transcriuen a partir de la cadena pesada. Tres dels quatre ARN poliadenilats generats a partir de la cadena lleugera es processen per davant i per darrere dels ARNt, gràcies a la configuració en forma de trèvol que aquests adquireixen, fenomen anomenat puntuació dels ARNt (Ojala et al., 1981). Dels ARN poliadenilats generats a partir de la cadena pesada, en destaquen els ARN de les subunitats ND4 i ND4L i els ARN de l'ATP6 i l'ATP8, que estan configurats per dues pautes de lectura solapades i requereixen empalmament alternatiu (més conegut en anglès com *alternative splicing*) (Attardi i Schatz, 1988).

Cal destacar el paper tan important que juguen els ARNt en la maduració dels ARN poliadenilats provinents de la cadena lleugera, ja que aquests darrers no tenen les UTR ni l'estructura CAP a l'extrem 5', com passa amb els transcrits nuclears, i la seva maduració és mitjançada per l'estructura tridimensional dels ARNt.

Cal fer esment, també, que la replicació de l'ADNmt depèn de la transcripció de la cadena lleugera, atès que es generen transcrits curts que són emprats per iniciar la replicació (Montoya et al., 1981).

### Traducció

El procés de traducció que genera les 13 proteïnes mitocondrials que formen els complexos de la cadena transportadora d'electrons encara no està del tot elucidat. No es pot fer un paral·lelisme amb la traducció dels gens nuclears, perquè els ribosomes mitocondrials tenen un contingut menor d'ARNr que els citosòlics (O'Brien, 2002) i, a més, els ARN missatgers (ARNm) no tenen l'estructura CAP a 5' ni cap regió no codificant que faciliti el reconeixement i la unió per part del ribosoma (Montoya et al., 1981). Se sap que això ocorre a la matriu mitocondrial i que, a més dels dos ARNr mitocondrials, s'empren elements de síntesi proteica que inclouen proteïnes ribosòmiques codificades en el genoma nuclear i importades del citosol cel·lular i diversos factors d'iniciació, elongació,



**Taula 2.** Codi genètic de l'ADNmt.

|                 | <b>ADNmt</b>                                    | <b>ADNn</b> |
|-----------------|---|-------------|
| <b>AUA</b>      | Codó d'inici (Met)                              | Arginina    |
| <b>AUG</b>      | Codó d'inici (Met)                              |             |
| <b>AGA, AGG</b> | Codó d'STOP                                     | Arginina    |
| <b>UGA</b>      | Triptòfan                                       | STOP        |
| <b>AUU</b>      | Isoleucina a l'elongació<br>Metionina a l'inici |             |

alliberació i reciclatge ribosòmic també codificats en l'ADNn (Spremlli *et al.*, 2004; Zhang i Spremlli, 1998). El codi genètic dels mitocondris és lleugerament diferent al codi genètic universal (**taula 2**), i també diferent entre espècies (Alberts *et al.*, 2002).

### 1.6.2. Taxa de mutació de l'ADNmt

El genoma mitocondrial té unes peculiaritats que fan que sigui considerablement diferent del genoma nuclear. Es troba en un nombre elevat de còpies i en un procés constant de replicació, transcripció i traducció, amb mecanismes de correcció d'errors poc eficients durant la replicació (Longley *et al.*, 2001). A més, es troba compartimentat dins d'un orgànu en el qual es generen nivells elevats d'espècies reactives d'oxigen amb gran capacitat mutagènica i, malgrat

que està replegat dins dels nucleoides, no té histones que el protegeixin d'aquests agents mutàgens.

Aquestes singularitats condueixen a fer que l'ADNmt presenti una elevada taxa de mutació, deu vegades més gran que la de l'ADNn. Les mutacions poden aparèixer al llarg de la vida de l'organisme i, fins i tot, en el procés d'embriogènesi, les quals originen casos d'heteroplàsmia. El terme heteroplàsmia designa l'existència de diferents versions de l'ADNmt en un individu, cèl·lula o mitocondri (Taylor i Turnbull, 2005) i és un fenomen molt freqüent (Kmiec *et al.*, 2006). En contraposició, hi ha el terme homoplàsmia per designar la presència d'una única versió de l'ADNmt en un organisme, cèl·lula o mitocondri (Taylor i Turnbull, 2005). Tot i que s'han observat delecions i insercions en el genoma mitocondrial, les variants més fre-

qüents són les que impliquen un canvi de nucleòtid, i estan presents en més d'un 1% de la població, anomenades SNP (de l'anglès *single nucleotide polymorphism*) o mtSNP, i indiquen que són polimorfismes presents en l'ADNmt.

### 1.6.3. Transmissió de l'ADNmt

El 1980 es va descobrir que l'herència de l'ADNmt és, exclusivament, materna (Giles et al., 1980), i això vol dir que una mare que sigui portadora d'una mutació en l'ADNmt dels seus oòcits, la pot transmetre a la seva descendència independentment del sexe d'aquesta, però només la descendència femenina podrà transmetre aquesta mutació a la generació següent. D'altra banda, hi ha un fenomen genètic anomenat "coll d'ampolla", que ocorre durant l'embriogènesi, en el qual el nombre de còpies d'ADNmt es redueix considerablement (Ashley et al., 1989).

A causa del fenomen de segregació mitòtica, si es produeix heteroplàsmia en l'òvul en el moment de la fecundació, pot ser que, quan es doni el fenomen de coll d'ampolla en l'embriogènesi, algunes versions d'aquest ADNmt siguin selectivament amplificades durant l'ovogènesi de la futura dona. Estudis recents en ratolins han provat que el fenomen de coll d'ampolla no es duu a terme en l'embriogènesi com es pensava, sinó en la foliculogènesi postnatal, tot i que

el tema és encara controvertit (Wai et al., 2008). És doni en el moment que es doni, el fenomen de coll d'ampolla pot originar que els òvuls que es formin tinguin versions diferents del genoma mitocondrial i que, quan aquests òvuls siguin fecundats, la descendència adquireixi nivells d'heteroplàsmia diferents al de la mare i diferents entre si (Jenuth et al., 1996).

En el supòsit que hi hagi una mutació patogènica, pot ser que alguns descendents es vegin afectats de gravetat, mentre que d'altres no presentin cap símptoma (Chinnery et al., 2000), el que explica per què el percentatge de recurrència d'una malaltia causada per una mutació en l'ADNmt, quan la mare pateix l'efecte d'aquesta mutació, només és del 4% en la descendència (Chinnery et al., 2004).

Per altra banda, aquest fenomen també es pot explicar per una distribució aleatòria entre diferents teixits de les molècules d'ADNmt mutades com a conseqüència de la segregació mitòtica. Atès que l'expressió fenotípica d'una mutació patogènica en l'ADNmt no segueix la genètica nuclear, i en canvi depèn de la proporció d'ADNmt mutat que hi hagi en un teixit concret, pot ser que entre germans els efectes de la mutació es manifestin en símptomes diferents o no es manifestin. El requeriment d'una proporció mínima de molècules d'ADNmt mutades

per tal que puguin alterar significativament la replicació, transcripció o traducció d'aquest genoma i el funcionament de la cadena transportadora d'electrons es pugui veure afectat, és el que es coneix com a efecte llinar. Aquest llinar pot variar molt en funció del teixit on hi hagi les molècules mutades, en funció del nombre de mitocondris i dels requeriments energètics (*Chinnery et al., 2006*).

#### 1.6.4. Inserció de l'ADNmt a l'ADNn

Al través de l'evolució de l'*Homo sapiens*, alguns fragments de seqüència de l'ADNmt s'han anat inserint al genoma nuclear. Aquests fragments reben el nom de NUMT (de l'anglès *nuclear inserts of mtDNA*) i s'estima que formen un 0,016% del genoma del genoma nuclear (*Woischnik i Moraes, 2002*). Encara que, generalment, aquestes NUMT no són funcionals al lloc en el qual s'insereixen, poden ocasionar interrupcions en la pauta de lectura si ho fan en una zona codificant, i també poden donar falsos positius en les tècniques d'anàlisi genètica (*Hirano et al., 1997; Wallace et al., 1997; Thalmann et al., 2004*).

#### 1.6.5. Haplogrups mitocondrials

Ja hem fet esment a l'alta capacitat mutagènica de l'ADNmt, però que una mutació s'origini en els oòcits, romangui i sigui traspasada a la descendència és el que defineix el camí evolutiu de d'aquesta

molècula. S'estima que la taxa de mutació de la regió codificant de l'ADNmt és entre el 2% i el 4% per cada milió d'anys (*Cann et al., 1987*), mentre que la regió no codificant muta amb més freqüència, per bé que és difícil definir-la. Aquesta capacitat mutagènica fa que l'ADNmt sigui essencial en la genètica de poblacions i en l'estudi de l'evolució humana, i que, per mitjà del seu arbre filogenètic, hagi aportat informació sobre l'origen de l'ésser humà i de la seva distribució al llarg del globus terrestre (*Mishmar et al., 2003; Kivisild et al., 2006*). L'arbre filogenètic del genoma mitocondrial és encara molt recent i està en constant revisió (*van Oven i Kayser, 2009*), però ha permès construir una línia evolutiva des de l'origen de l'espècie humana a l'Àfrica fins a la seva distribució migratòria al llarg de tot el globus terrestre (*Watson et al., 1997*). En el procés evolutiu de l'*Homo sapiens* s'han anat acumulant canvis en la seqüència de l'ADNmt, de manera que s'han originat seqüències que han anat divergint i han format diferents llinatges anomenats haplotips. Aquests haplotips, uns independents dels altres, es poden agrupar en haplogrups, que són seqüències relacionades entre si per la seva descendència i que pertanyen a una mateixa branca monofilètica de l'arbre filogenètic. Aquests haplogrups estan definits per variants puntuals, estables i antigues que són compartides per totes les seqüències d'aquesta branca (*Richards et al., 1998*).

Així doncs, els haplogrups mitocondrials permeten classificar els genomes mitocondrials que comparteixen les mateixes variants adquirides, al llarg del camí evolutiu de l'espècie, en grups designats per una lletra o una lletra i un nombre (Torroni *et al.*, 1993; Richards *et al.*, 1998), (**figura 7**). També es poden fer subclassificacions més acurades i establir diferents subgrups d'un haplogrup. Per tant, els haplogrups més freqüents a Europa són l'H, l'HV, el V, el J, el T, el K, l'U, el V, el W i l'X, sent molt majoritari l'H, amb totes les subclassificacions possibles.

A l'Europa occidental, l'haplogrup més freqüent també és l'H (41%), seguit de l'U (18%), el J (9%)

i el T (8%), mentre que la resta d'haplogrups es troben en proporcions menors al 5% (MITOMAP *www.mitomap.org*, 2013).

Fins fa poc, la distribució de les poblacions en haplogrups mitocondrials era especialment important en els estudis d'evolució i arqueologia. Recentment, han aparegut estudis que indiquen que determinats haplogrups mitocondrials confereixen risc a patir determinades malalties o protecció davant d'aquestes, com per exemple esquizofrènia, osteoporosi, cardiomiopatia isquèmica i obesitat mòrbida (Amar *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2012; Fernández-Caggiano *et al.*, 2013; Nardelli *et al.*, 2013).

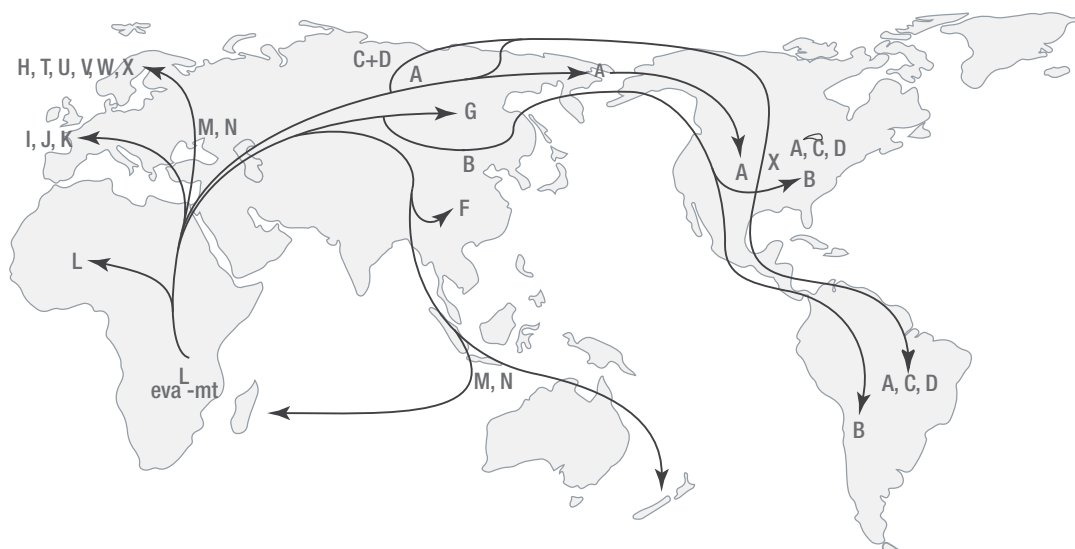


figura 7

**Figura 7.** Distribució de l'ADNmt en el globus terrestre durant el procés de l'evolució de l'espècie humana.

## 1.7. Estrès oxidatiu

---

L'estrès oxidatiu es produeix quan en la cèl·lula s'acumulen espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen species*) i espècies reactives de nitrogen (RNS, *reactive nitrogen species*) procedents de l'anió  $O^{2-}$  (superòxid). Aquest anió es produeix quan l'oxigen sobrant, que no ha estat reduït al complex IV de la cadena transportadora d'electrons, rep un electró directament dels complexos I o III.

Quan la cadena respiratòria funciona eficientment, l'oxigen sobrant significa entre un 1% i un 3% del total i la cèl·lula té mecanismes antioxidants preparats per neutralitzar les ROS i les RNS que es puguin generar. A dins del mitocondri hi ha els enzims Mn-superòxid dismutasa i Cu/Zn-superòxid dismutasa que converteixen l'anió superòxid en peròxid d'oxigen ( $H_2O_2$ ), que després es converteix en aigua gràcies als enzims catalasa i glutatió peroxidasa, i, d'aquesta manera, s'aconsegueix neutralitzar l'efecte nociu d'aquestes molècules. El peròxid d'oxigen que no es converteix en aigua pot travessar la membrana mitocondrial i arribar al citosol, on es pot convertir en l'anió hidroxil ( $OH^-$ ) per reacció amb el ferro, o pot produir espècies reactives de nitrogen (RNS) per reacció amb àcid nítric.

Si la cadena no funciona eficientment i hi ha massa oxigen sobrant, aquestes ROS i RNS s'acumulen, els mecanismes antioxidants no són capaços de neutralitzar-les totes i es produeix l'anomenat estrès oxidatiu (Sies, 2008). Les ROS i les RNS són espècies molt reactives i ataquen lípids, proteïnes i ADN, fora i dins del mitocondri, i aquest darrer efecte és més greu en l'ADNmt perquè no té histones que el protegeixin ni mecanismes de reparació prou eficients. Està descrit que les ROS activen factors de creixement, cinases i tirosina-cinases, que controlen proteïnases, que regulen factors de transcripció i modifiquen proteïnes de transport (Trachootham et al., 2008; Bartosz, 2009), generant, així, canvis en senyals intracel·lulars que poden conduir a l'envelliment i la degeneració. Aquestes conseqüències són especialment rellevants en teixit cerebral, ja que té una alta demanda energètica (més possibilitats de crear ROS i RNS), disposa de nivells elevats de molècules oxidables i té una capacitat antioxidant relativament reduïda (Sies, 1991). Tanmateix, cal destacar que les ROS i les RNS tenen un efecte fisiològic en el funcionament cel·lular, atès que s'ha descrit que participen en la senyalització intracel·lular relacionada amb la supervivència i el cicle cel·lular (Baran et al., 2004; Valko et al., 2007).

### 1.7.1. Implicació de l'estrès oxidatiu en l'envelliment

L'estrès oxidatiu ha estat considerat durant molts anys un dels pilars clau per explicar l'envelliment tissular. L'envelliment és aquell procés degeneratiu causat per l'acumulació de lesions dins les cèl·lules que acaben originant disfunció cel·lular, fallada orgànica i, finalment, la mort. Es creu que les ROS actuen com un agent nociu i tòxic que, en atacar estructures i interferir en vies de senyalització, condueix a processos degeneratius (*Harman, 1956*). Aquesta teoria se sustenta en diverses evidències, observades en un organisme al llarg del pas dels anys, directament relacionades amb el mitocondri: pèrdua d'eficiència de la cadena respiratòria mitocondrial, pèrdua d'activitat dels enzims antioxidants i acumulació de mutacions en l'ADNmt (que, alhora, duen a alteracions en les proteïnes de la cadena transportadora d'electrons, una deficiència en el funcionament d'aquesta i un consegüent augment de les ROS) (*Balaban et al., 2005*). Tanmateix, darrerament s'han posat en dubte els fonaments d'aquesta teoria, argumentant que les evidències trobades fins al moment tenen mancances metodològiques i que el coneixement del procés d'envelliment, del paper de les ROS i de l'estrès oxidatiu ha augmentat (*Bratic i Larsson, 2013; Gladyshev, 2014*). La visió actual indica que l'estrès oxidatiu contribueix a l'en-

velliment, però que no n'és la causa primera ni l'única. Alguns estudis d'intervenció fets en humans no han pogut comprovar que l'administració exògena d'antioxidants augmenti l'esperança de vida (*Walker, 2008*), i d'altres, duts a terme en models animals, atribueixen a les ROS un paper beneficiós, perquè poden actuar com a precursoros de supervivència i augmentar l'esperança de vida (*Lapointe i Hekimi, 2010; Ristow, 2011*).

També es discuteix que la implicació dels mitocondris en l'envelliment no rau, únicament, en la generació de les ROS. Arran d'uns estudis fets en ratolins transgènics amb elevada taxa de mutació mitocondrial, s'està llançant la hipòtesi que les mutacions a l'ADNmt no estarien tan relacionades amb l'estrès oxidatiu i el consegüent envelliment com es pensava. Es va observar que el fenotip d'envelliment apareixia més notablement a causa de mutacions puntuals que no pas de deleccions grans del genoma mitocondrial (*Tyynismaa et al., 2005; Edgar et al., 2009*) i que aquestes mutacions eren, majoritàriament, degudes a errors en la replicació, i no conseqüència de l'estrès oxidatiu (*Ameur et al., 2011*). A més, les mutacions de l'ADNmt durant el desenvolupament d'aquests ratolins interferien en la quantitat i la qualitat de cèl·lules mare, i afectaven el desenvolupament de certs teixits i promovien l'envelliment prematur sense canvis en la quantitat

de les ROS (Ahlqvist et al., 2012), factors que tornaven a qüestionar el paper de les ROS en l'envelliment. A més, es creu que el fenotip d'envelliment no ve només donat per una disfunció mitocondrial, sinó que és conseqüència d'alteracions en tots aquells sistemes que regulen la biogènesi mitocondrial. En models animals, s'ha comprovat que diverses vies de senyalització sensibles a nutrients com, per exemple, la de la insulina i la de la rapamicina juguen un paper clau en la biogènesi mitocondrial, de tal manera

que una alteració d'aquestes vies podria conduir a una disfunció mitocondrial i a l'envelliment (Bratic i Larsson, 2013).

Així doncs, la teoria de la implicació de les ROS en l'envelliment no pot ser descartada, tanmateix s'han de tenir en compte altres mecanismes mitocondrials en aquest procés i entendre l'envelliment com una conjugació complexa de diversos factors.

## 1.8. Malalties mitocondrials

---

Les malalties mitocondrials són aquelles que cursen amb disfunció mitocondrial i amb el consegüent dèficit metabòlic, amb una prevalença d'1 de cada 5.000 individus (Skjadal et al., 2003). Aquestes malalties poden aparèixer tant en adults com en infants, i impliquen alteracions en diversos sistemes i òrgans, entre els quals destaquen, majoritàriament, múscul, cervell, cor, fetge, retina i oïda.

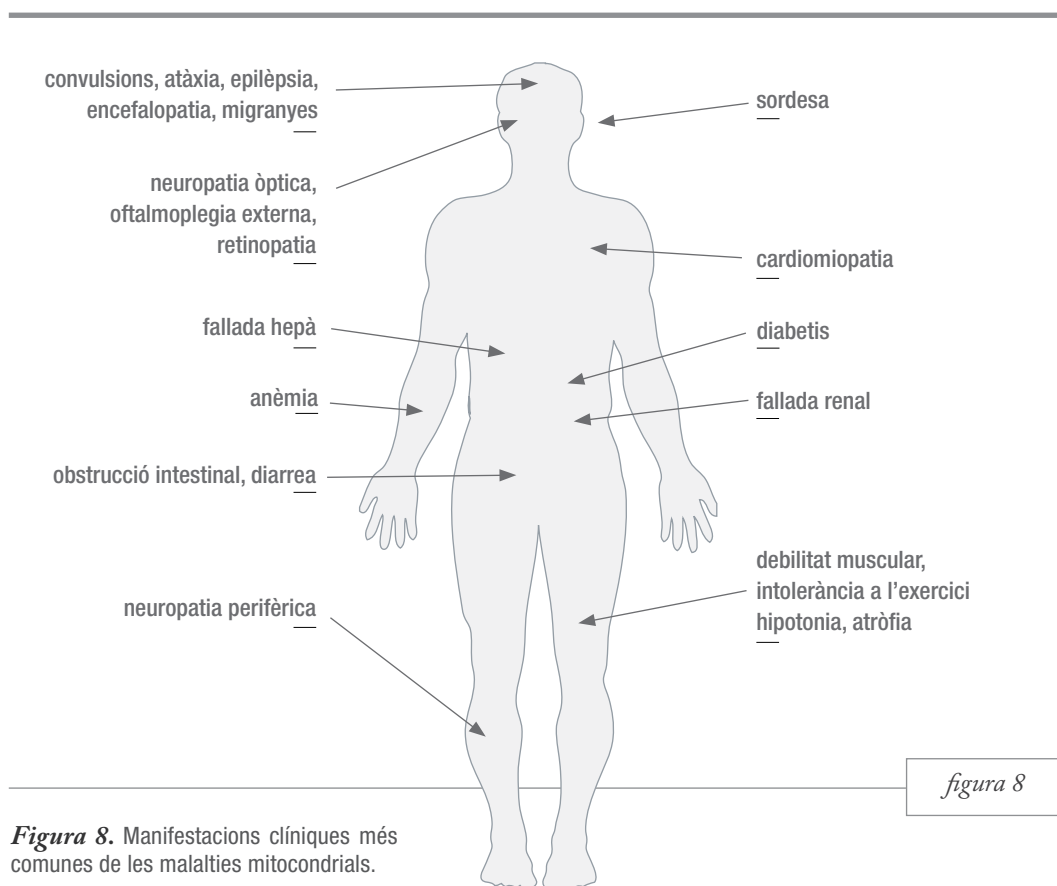
El primer cas d'un pacient de malaltia mitocondrial va ser reportat els anys seixanta (Lufz et al., 1962) i, des de llavors, s'ha fet molta recerca per elucidar-ne l'etiologia. No va ser fins a finals dels anys noranta que es va concloure que són malalties que cursen amb una implicació genètica, ja sigui una alteració de l'ADNmt, dels gens mitocondrials codificats en el nucli o una suma d'ambdues (DiMauro i Schon, 1998).

El 1988 es van descriure les primeres mutacions de l'ADNmt implicades en l'oftalmoplegia externa progressiva crònica (CPEO, de l'anglès *chronic progressive external ophthalmoplegia*) i en la síndrome de Kearns-Sayre (KSS, de l'anglès *Kearns-Sayre syndrome*) (Holt et al., 1988; Zeviani et al., 1988), i ambdues presentaven delecions grans del genoma mitocondrial. Dos anys més tard, es van descobrir mutacions puntuals en l'ADNmt causants de la neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON, de l'anglès *Leber's hereditary optic neuropathy*) i en la síndrome d'encefalomiopatia mitocondrial amb episodis d'ictus (MELAS, de l'anglès *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*) (Wallace et al., 1988; Goto et al., 1990). Des de llavors, s'han descrit més de 300 alteracions de l'ADNmt rela-

cionades amb un gran ventall de símptomes, entre els quals destaquen els relacionats amb les malalties neurodegeneratives, l'envelliment i el càncer (*Schon et al., 2012*). Actualment, el diagnòstic de les malalties mitocondrials sol requerir una biòpsia de múscul que s'analitza anatomopatològicament, bioquímica i genètica, i la conjugació d'aquests resultats amb les dades clíniques i bioquímiques (*Bernier et al., 2002; Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis et al., 2008*).

### 1.8.1. Característiques clíniques i bioquímiques

La simptomatologia d'aquestes malalties és molt diversa i inclou: ptosi, oftalmoplegia externa, miopatia proximal i intolerància a l'exercici, cardiopatia, sordesa neurosensorial, atròfia òptica, retinopatia pigmentària, diabetis *mellitus*, encefalopatia fluctuant, convulsions, demència, migranya, episodis d'ictus, atàxia i espasticitat (*Chinnery, 2010*); i, a més, els símptomes poden anar-se modificant al llarg del transcurs de la malaltia (*Finsterer, 2004*) (**figura 8**).



**Figura 8.** Manifestacions clíniques més comunes de les malalties mitocondrials.



**Taula 3.** Malalties causades per mutacions a l'ADNmt.

| Malaltia  | Mutacions en l'ADNmt   | Síntomes comuns  |
|---|--|--|
| <b>Síndrome de Kearns-Sayre, KSS</b><br>OMIM #530000  | Delecions en l'ADNmt (>150 espècies)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Paràlisi progressiva de certs músculs oculars (l'oftalmoplegia externa progressiva crònica, o CPEO)</li> <li>- Acumulació anormal de material pigmentat en la retina (retinopatia pigmentària), que condueix a una inflamació i degeneració progressiva de la retina</li> <li>- Cardiomiopatia</li> </ul>   |
| <b>Síndrome de Leigh, LS</b><br>OMIM #256000  | 10.158T>C (ND3)<br>12.706T>C (ND5)<br>13.513G>A (ND5)<br>14.459G>A (ND6)<br>9.176T>C (ATP6)<br>8.993T>C (ATP6)<br>8.993T>G (ATP6)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aparició generalment en la infància</li> <li>- Accidents vasculars</li> <li>- Hipotonia, fatiga, nistagme, reflexos pobres, dificultats per menjar i per empassar, problemes de respiració, funció motora dèbil, atàxia</li> <li>- Es caracteritza per regions necròtiques al cervell visibles per RM, especialment al mesencèfal i al tronc de l'encèfal</li> <li>- L'herència pot estar lligada al cromosoma X, pot ser autosòmica recessiva o pot ser materna. També hi ha casos esporàdics</li> </ul> |
| <b>Miopatia mitocondrial amb diabetis</b><br>OMIM #500002                                   | 14.709T>C (ARnt Glu)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Miopatia (debilitat muscular)</li> <li>- Acumulació de lípids als músculs</li> <li>- Diabetis mellitus</li> </ul>   |
| <b>Síndrome de neuropatia, atàxia i retinosi pigmentada; NARP</b><br>OMIM #551500           | 8.993T>G (ATP6)<br>8.993T>C (ATP6)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Debilitat muscular neurogènica</li> <li>- Atàxia</li> <li>- Retinopatia pigmentària</li> </ul>  |
| <b>Síndrome d'encefalomiopatia mitocondrial amb episodis d'ictus; MELAS</b><br>OMIM #540000 | 5.83G>A (ARnt Phe)<br>12.147G>A (ARnt His)<br>8.356T>C (ARnt Lys)<br>3.243A>G (ARnt Leu)<br>3.271T>C (ARnt Leu)<br>13.513G>A (ND5) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Miopatia mitocondrial (debilitat muscular)</li> <li>- Encefalopatia (malaltia del cervell i del sistema nerviós central)</li> <li>- Acidosi làctica</li> <li>- Episodis d'accidents vasculars (paràlisi parcial, pèrduaparcial de la visió o altres anormalitats neurològiques)</li> </ul>  |

---

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>Síndrome d'epilèpsia mioclònica associada a fibres vermelles esquinçades; MERRF OMIM #54500</b> | 12.147G>A (ARnt His)<br>8.344A>G (ARnt Lys)<br>8.356T>C (ARnt Lys)  | <ul style="list-style-type: none"><li>- Mioclònia (espasmes musculars breus, sobtats i fasciculars)</li><li>- Convulsions epilèptiques</li><li>- Atàxia progressiva</li><li>- Fibres vermelles esquinçades (anormalitat característica microscòpica observada en biòpsia de múscul de pacients amb la síndrome de MERRF i altres trastorns mitocondrials)</li></ul> |
| <b>Neuropatia òptica hereditària de Leber; LHON OMIM #535000</b>                                   | 3.460G>A (ND1)<br>11.778G>A (ND4)<br>14.484T>C (ND6)<br><br>Representen el ~95% dels casos<br><br>S'han descrit altres mutacions a:<br>ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, ATP6, CO3, i CYB | <ul style="list-style-type: none"><li>- Pèrdua de visió aguda o subaguda, indolora, que condueix a un escotoma central</li></ul>  |
| <b>Cardiomiopatia histiocitoide infantil OMIM # 500000</b>   | 15.498G>A (CYB)   | <ul style="list-style-type: none"><li>- Infants menors de dos anys</li><li>- Afectació en el sexe femení principalment</li><li>- Aritmia cardíaca o aturada cardíaca</li><li>- El curs clínic sol ser fulminant, de vegades simula la síndrome de mort sobtada del lactant</li></ul>  |
| <b>Degeneració estrionigral mitocondrial infantil OMIM #500003</b>                                 | 9.176T>C (ATP6)   | <ul style="list-style-type: none"><li>- Hipotonia</li><li>- Moviments coreoatetòsics i respostes plantars extensores</li></ul>  |

---

Aquestes malalties cursen amb un dèficit en la capacitat de fosforilació oxidativa que acaba generant una reducció en la producció d'ATP. Aquesta alteració té conseqüències quant al metabolisme dels carbohidrats, de l'oxidació  $\beta$  i de la creació de les ROS, i és per això que se solen detectar nivells de lactat elevats en sang i alteracions en l'estructura cel·lular.

A la clínica, es fan estudis de metabolisme energètic a partir de biòpsies de múscul en les quals s'analitza l'activitat enzimàtica de cadascun dels complexos de la cadena transportadora d'electrons per separat a fi de trobar si el dèficit es localitza en un sol complex o en més d'un. Segons la Societat de Medicina Mitocondrial (en anglès, Mitochondrial Medicine Society), si el dèficit es troba en un sol complex, es pot formular la hipòtesi que l'alteració recau en alguna de les proteïnes que formen aquell complex (codificades en el nucli o bé en l'ADNmt), o en les proteïnes responsables del seu acoblament. En canvi, si l'alteració es presenta en tots els complexos, es pot arribar a la conclusió que la mutació es troba en algun ARNt codificat en el genoma mitocondrial, o bé que es tracta d'una deleció de l'ADNmt que afecta diverses proteïnes, diversos ARNt i els ARNr.

Per confirmar els resultats dels assajos d'activitat enzimàtica, s'analitza el consum global d'oxigen de la

cadena respiratòria mitocondrial (activitat oxidativa) a partir de l'estimulació dels complexos I, II, i III mitjançant substrats específics de cada complex. En funció de la resposta en el consum d'oxigen de cada complex, es pot discriminar si la disfunció es troba en el complex I, II o III, o si, en canvi, és present en tots els complexos de la cadena (*Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis et al., 2008*).

Tanmateix, la fisiopatologia d'aquestes malalties encara no ha estat del tot establerta, ja que l'efecte directe d'algunes de les mutacions, a hores d'ara, no és previsible i no se sap de quina manera poden comprometre els sistemes de producció d'energia. A més, com que es desconeixen les interaccions proteïques i proteïna-ADNmt que es duen a terme dins del mitocondri, no estan definides quines conseqüències tenen les lesions en el sistema de producció d'energia i quines respostes cel·lulars se'n poden derivar, cosa que fa impossible en l'actualitat que hi hagi un tractament eficaç per a les malalties mitocondrials (*Pfeffer et al., 2012; Vafai i Mootha, 2012*).

### 1.8.2. Característiques genètiques

Des de principis dels anys noranta, la identificació de les alteracions genètiques ha contribuït significativament al diagnòstic de les malalties mitocondrials i a l'elucidació de la seva etiologia. Des de llavors,

diverses mutacions han estat associades a un dèficit en el sistema de producció energètica, ja es trobin en gens codificats en l'ADNmt o en l'ADNn. Les mutacions que s'han descrit són molt diverses i actuen modulant diferents nivells: alterant directament les subunitats de la cadena transportadora d'electrons, compromentent el manteniment i l'expressió de l'ADNmt, modificant els patrons de regulació de la biogènesi mitocondrial o de l'activitat fosforilativa, empitjorant el transport i la síntesi de nucleòtids, o bé canviant la composició i la dinàmica de les membranes mitocondrials (*Vafai i Mootha, 2012*). Gràcies als nombrosos descobriments genètics, actualment les malalties mitocondrials es poden classificar en funció de l'afectació genètica que les origina, això és: mutacions en l'ADNmt, delecions en l'ADNmt i mutacions en proteïnes mitocondrials codificades en el genoma nuclear (d'aquestes últimes només detallarem les que cursen amb depleció de l'ADNmt).

### Mutacions puntuals en l'ADNmt

Hi ha diverses malalties associades a mutacions puntuals de l'ADNmt, les quals presenten manifestacions clíniques molt heterogènies (**taula 3**) entre les quals hi predominen la debilitat muscular, la hipotonia, la fatiga i episodis d'atàxia (*Chinnery, 2010*). Aquesta heterogeneïtat es podria explicar per l'existència d'heteroplàsmia; és a dir, l'existència de

proporcions diferents d'ADNmt salvatge i mutat en funció del teixit. A més, la proporció d'ADNmt mutat pot variar entre individus, entre teixits del mateix individu i entre cèl·lules d'un mateix teixit. I, a més, cada teixit pot tenir un llinar diferent de molècules d'ADNmt mutat per expressar la malaltia.

Hi ha mutacions presents en les regions que corresponen als ARNt, als ARNr i a les regions codificants per proteïnes. Pel que fa a les mutacions en ARN de transferència, la primera descrita és la de l'ARNt per la leucina i és una transició A>G a la posició 3.243. Aquesta mutació és la més freqüent i causa MELAS (*Ciafaloni et al., 1992*), tot i que altres mutacions en altres ARNt també han estat associades a aquesta malaltia. De fet, hi ha descrites 11 mutacions diferents en l'ARNt per la leucina que causen síndromes diferents, el que indica la complexitat de la genètica mitocondrial i la gran variabilitat clínica associada a les mutacions de l'ADNmt (**figura 9**).

La segona mutació més freqüent és la transició A>G que es troba a la posició 8.344 de l'ARNt per la lisina, causant de la síndrome d'epilèpsia mioclònica associada a fibres vermelles esquinçades (MERRF, de l'anglès *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) (*Shoffner et al., 1990*), malgrat que també en aquest cas s'han trobat altres mutacions en altres ARNt causants d'aquesta síndrome. Un altre exemple de

mutació puntual en ARNt és la transició T>C en l'ARNt pel glutamat codificat a la posició 14.709, causant de miopatia mitocondrial amb diabetis (Hao *et al.*, 1995). S'ha descrit una mutació a l'ARNr 12S, la transició A>G a la posició 1.555, associada a sordesa neurosensorial no sindròmica sensible a aminoglu- còsids (Prezant *et al.*, 1993). Finalment, referent a les mutacions puntuals en gens de l'ADNmt que codifiquen per proteïnes, s'han descrit diverses

causants de la síndrome de Leigh, la síndrome de LHON, la cardiomiopatia histiocitoide infantil, MELAS, la degeneració estrionigral mitocondrial infantil; i associades a la síndrome de neuropatia, atàxia i retinosi pigmentada (NARP, de l'anglès *neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa*); i totes aquestes afecten o bé el gen MT-ATP6, algun dels gens MT-ND o el gen MT-CYB (Verge *et al.*, 2011).

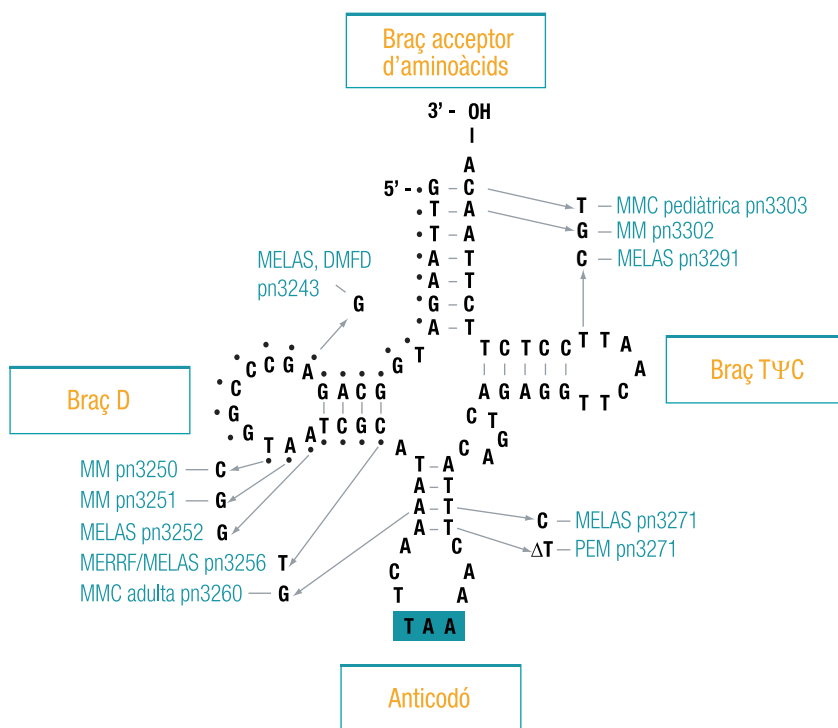


figura 9

**Figura 9.** Representació de l'ARNt per la leucina en la que s'indica les mutacions causants de diverses malalties mitocondrials. MMC: Miopatia i cardiomiopatia mitocondrials / DMFD: Diabetis mellitus i sordesa / PEM: Encefalomiopatia / MELAS: síndrome d'encefalomiopatia mitocondrial amb episodis d'ictus / MM: Miopatia mitocondrial / MERRF: síndrome d'epilèpsia mioclònica associada a fibres vermelles esquinçades.

### Delecions del genoma mitocondrial

Les delecions grans del genoma mitocondrial van ser descobertes per la tècnica del Southern blot el 1988 (Holt *et al.*, 1988), i des d'aleshores s'han publicat nombrosos articles que les relacionen amb malalties i que intenten elucidar els efectes i els mecanismes de delecio. La porció de part delecionada és variable, però la delecio més comuna, present en el 35% dels casos, és la que va des del gen MT-ATP8 fins al gen MT-ND5, englobant 4.977 kb. Aquestes delecions grans han estat associades a CPEO, a KSS i a la síndrome de Pearson (PS, de l'anglès *Pearson syndrome*), i també a gairebé totes les síndromes d'encefalopaties mitocondrials. En alguns casos, s'ha observat que molècules d'ADNmt delecionades conviuen amb altres molècules d'ADNmt duplicades o dimeritzades (Rötig *et al.*, 1995), la qual cosa permet formular la hipòtesi que algun mecanisme de replicació del genoma mitocondrial està alterat.

Els símptomes que engloben aquestes malalties són: paràlisi de la musculatura ocular (CPEO i KSS), ptosi (CPEO), acumulació de pigment a la retina (KSS), atàxia cerebel·losa i bloqueig cardíac (KSS), anèmia infantil (PS), pancitopènia (PS) i dèficit en l'activitat exocrina pancreàtica (PS), entre d'altres (Chinnery, 2010; Verge *et al.*, 2011). Totes aquestes manifestacions evidencien el paper importantíssim de

la integritat del genoma mitocondrial en el funcionament de múltiples òrgans.

### Les síndromes de depleció mitocondrial

D'altra banda, cal destacar les síndromes de depleció de l'ADNmt (MDS, de l'anglès *mitochondrial depletion syndrome*), causades per mutacions en gens mitocondrials codificats al nucli i que es caracteritzen per una reducció en el nombre de còpies de l'ADNmt respecte als rangs de normalitat esperats en cada teixit. Aquestes síndromes, que segueixen un patró d'herència autosòmica recessiva, cursen, generalment, en infants i es caracteritzen per un retard en el desenvolupament, problemes neurològics, acidosi làctica i intolerància a l'exercici, entre d'altres símptomes (El-Hattab i Scaglia, 2013).

La depleció de l'ADNmt està originada per mutacions en gens que participen en la replicació del genoma mitocondrial, com són els gens POLG, POLG2 i TWINKLE, o bé gens que s'encarreguen del transport i la síntesi de dNTPs del metabolisme nucleotídic, concretament els gens TYMP, DGUOK, TK2, SLC25A19, MPV17, SUCLA2, SUCLG1 i RRM2B (Copeland, 2008).

**Taula 4.** Síndromes de depleció mitocondrial: característiques i simptomatologia.

| Síndromes de depleció mitocondrial     | Edat d'inici        | Símptomes comuns   |
|--|---------------------|--|
| <b>Hepatocerebrals</b>                 |                     |  |
| <b>Relacionades amb el gen DGUOK</b>   | Neonatal            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disfunció hepàtica</li> <li>- Retard en el desenvolupament psicomotor</li> <li>- Hipotonia</li> <li>- Acidosi làctica</li> <li>- Hipoglucèmia</li> </ul>  |
| <b>Relacionades amb el gen MPV17</b>   | Infància            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disfunció hepàtica</li> <li>- Retard en el desenvolupament psicomotor</li> <li>- Hipotonia</li> <li>- Acidosi làctica</li> <li>- Hipoglucèmia</li> <li>- Leucoencefalopatia</li> </ul>  |
| <b>Relacionades amb el gen POLG</b>    | Infància            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disfunció hepàtica</li> <li>- Retard en el desenvolupament psicomotor</li> <li>- Epilèpsia</li> <li>- Atàxia i neuropatia</li> <li>- Hipotonia i espasmes</li> <li>- Episodis d'ictus i de mioclònia</li> <li>- Parkinsonisme</li> <li>- Nistagme</li> <li>- Somnolència i irritabilitat</li> <li>- Pèrdua de la vista i l'audició</li> <li>- Atròfia cerebral generalitzada</li> </ul> |
| <b>Relacionades amb el gen C10orf2</b> | Neonatal o infància | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disfunció hepàtica</li> <li>- Retard en el desenvolupament psicomotor</li> <li>- Epilèpsia</li> <li>- Neuropatia perifèrica</li> <li>- Hipotonia</li> <li>- Oftalmoplegia</li> <li>- Nistagme i atàxia</li> <li>- Cetosi i acidosi làctica</li> <li>- Atròfia en l'escorça cerebel·losa</li> </ul>  |

---

## Miopàtica

---

**Relacionada amb el gen TK2**

Infància

- Hipotonia i debilitat muscular
- Afectació dels músculs facials
- Disfàgia
- Disàrtria
- Nivells elevats de creatinina-fosfocinasa en sèrum

---

## Encefalomiopàtiques

---

**Relacionada amb els gens SUCLA2 i SUCLG1**

Infància

- Hipotonia i debilitat muscular
- Retard en el desenvolupament psicomotor
- Trastorns d'alteració dels moviments
- Deteriorament en l'audició
- Epilèpsia
- Retard en el creixement
- Acidosi làctica
- Atròfia cortical i del gangli basal

**Relacionada amb el gen RRM2B**

Neonatal o infància

- Hipotonia i debilitat muscular
- Retard en el desenvolupament
- Microcefàlia
- Pèrdua de la capacitat d'audició
- Acidosi làctica

---

## Neurogastrointestinal

---

**Relacionada amb el gen TYMP**

Infància tardana o adolescència

- Dismotilitat gastrointestinal
- Pèrdua de pes
- Neuropatia perifèrica
- Nivells alts de timidina i desoxiuridina en plasma
- Leucoencefalopatia

Segons la mutació que presenten els individus, aquestes síndromes es poden classificar en quatre subsíndromes: miopàtica, encefalomiopàtica, hepatocerebral i neurogastrointestinal (*El-Hattab i Scaglia, 2013*). Totes aquestes presenten manifestacions clí-

niques molt diverses (**taula 4**) que indueixen a pensar en la gran importància d'un correcte nombre de còpies d'ADN<sub>mt</sub> en teixits demandants d'energia com el fetge, el cervell i el múscul.



---

# 2

## *els trastorns mentals*

### 2.1. Qüestions generals

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) defineix la salut com un estat complet de benestar físic, mental i social, i no únicament com l'absència d'afeccions o malalties. I, en referència a la salut mental, la defineix com un estat de benestar en el qual l'individu és conscient de les seves pròpies capacitats, pot afrontar les tensions normals de la vida, pot treballar de forma productiva i fructífera i és capaç de fer una contribució a la seva comunitat. A l'hora de definir els trastorns mentals, l'OMS té en compte que comprenen una àmplia gamma de problemes amb símptomes diferents, però que, no obstant això, generalment es caracteritzen per una combinació d'alteracions en els pensaments, les emocions, el comportament i les relacions amb els altres. Aquestes alteracions tenen lloc en el cervell i, com a conseqüència, causen angoixa i/o discapacitat en les persones afectades.

La visió de la salut mental ha anat canviant al llarg dels anys i és diferent en cultures diferents. Per aquest motiu, la definició, l'avaluació i la classificació dels trastorns mentals també ha anat variant al llarg dels anys. En l'actualitat hi ha criteris estàndard per a la classificació dels trastorns mentals àmpliament utilitzats, tot i que el contínuum que es dona entre la salut mental i la malaltia mental, la comorbiditat entre diferents trastorns i la poca especificitat dels símptomes d'aquests fa que el diagnòstic sigui complex.

En la segona meitat del segle xx, i en la majoria de països occidentals desenvolupats, es van dur a terme canvis importants tant en relació amb les consideracions socials de les persones afectades per problemes greus de salut mental com amb l'organització de l'atenció que calia que rebessin. Pel que fa a l'Estat espanyol, la Llei general de sanitat del 1986 plantejà el pas d'un model tradicional, basat en hospitals psiquiàtrics monogràfics, a l'atenció comunitària i integrada en les grans estructures del Sistema Nacional de Salut.

Cal assenyalar que el desenvolupament real d'aquesta Llei ha estat diferent en funció de cada comunitat autònoma. Per tant, a principis dels anys vuitanta es va començar a fer èmfasi en la necessitat de tractar de forma adequada i integral les persones que pateixen un trastorn mental greu.

Només avançant en el coneixement de l'etiologia

dels trastorns mentals es podran realitzar diagnòstics més acurats, desenvolupar tractaments més específics i actuar de forma preventiva en els casos de risc de patir algun d'aquests trastorns. D'aquesta manera, s'aconseguirà evitar els efectes que aquestes malalties produeixen sobre els individus, les famílies i la societat.

## 2.2. Sistemes de diagnòstic

Actualment hi ha dos sistemes que permeten la classificació de les malalties psiquiàtriques en la clínica i la recerca. Aquests dos sistemes són la Classificació internacional de malalties, conegut com ICD (de l'anglès, *International Classification of Diseases*) i el Manual diagnòstic i estadístic dels trastorns mentals conegut com a DSM (de l'anglès, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*).

El sistema ICD classifica i codifica totes les malalties, està publicat per l'OMS i és emprat en tot el món per classificar les causes de morbiditat i de mortalitat, amb finalitats de política sanitària, epidemiològiques o d'aplicació clínica. Es va crear el 1945 i, des de llavors, s'ha revisat diverses vegades de tal manera que la desena versió és la utilitzada actualment.

El sistema DSM és específic per a les malalties mentals i està publicat per l'Associació Americana de Psiquiatria. El DSM es va elaborar a partir de dades empíriques i amb una metodologia descriptiva, amb l'objectiu de millorar la comunicació entre clínics i entre clínics i investigadors. És el sistema de diagnòstic més utilitzat en recerca clínica i, per aquest motiu, és el sistema de classificació emprat en la present tesi. Es va publicar per primer cop el 1952, però s'ha anat actualitzant i, recentment, s'ha editat la cinquena versió (DSM-5). En el moment de l'avaluació dels participants en aquest estudi, els criteris de diagnòstic seguien la quarta edició del DSM (DSM-IV), però cal destacar que la cinquena versió incorpora alguns canvis en la classificació i en la concepció dels trastorns mentals. El principal canvi consisteix que, malgrat que es mantenen la categorització i la subclassificació dels diversos trastorns, s'aposta per una dimensionalitat i un

contínuum de les expressions simptomatològiques. Aquests canvis impliquen l'acceptació que algunes de les característiques simptomatològiques poden

estar associades a més d'un trastorn mental, la desaparició d'algunes categories diagnòstiques i la modificació d'alguns criteris d'exclusió.

## 2.3. Trastorn mental greu

---

Els trastorns mentals greus són aquells que cursen amb afectació de diversos àmbits el bon funcionament dels quals és considerat imprescindible per gaudir de benestar i salut mental. Aquests àmbits fan referència a l'estat d'ànim i a l'expressió d'aquest, a l'organització del pensament, a les relacions familiars i interpersonals, al desenvolupament social i laboral i a l'autonomia. Són malalties que requereixen un tractament continu i un reajustament freqüent d'aquest, ja que sovint s'alternen episodis de relativa normalitat amb d'altres en els quals els símptomes són més aguts. Com a resultat d'això, les persones amb trastorn mental greu poden ser capaces de funcionar de manera independent per un període de temps, però necessiten suport en diversos àmbits en altres moments de la malaltia. Es fa servir el terme *trastorn* per designar una malaltia que compromet el normal funcionament d'un ésser humà, però de la qual no es coneix l'etiologia ni la fisiopatologia. L'esquizofrènia, el trastorn bipolar i el trastorn depressiu major són tres trastorns mentals greus que s'han estudiat en el present treball.

### 2.3.1. Trastorns psicòtics

Segons el DSM-IV, els trastorns psicòtics són trastorns mentals greus que causen alteracions del pensament i de la percepció, i fan que les persones amb psicosis perdin el contacte amb la realitat. Dos dels símptomes principals són les al·lucinacions i els deliris. Les al·lucinacions són percepcions falses, sense que hi hagi un estímul real, sent les auditives les més freqüents. Els deliris són pensaments il·lògics sense base real, no fonamentats en cap creença cultural compartida i que no es poden rebatre amb argumentació lògica, sent les idees de persecució les més freqüents. Aquesta simptomatologia pot ser pròpia d'un trastorn psiquiàtric o bé pot estar causada per substàncies o per una altra malaltia somàtica.

Els símptomes psicòtics poden estar presents en diversos trastorns psiquiàtrics, com el trastorn bipolar, la depressió major i alguns trastorns greus de la personalitat, però es reserva el terme de trastorn psicòtic per a aquells casos en els quals els símptomes psicòtics són els més prominents i més característics.

L'esquizofrènia i els trastorns esquizofreniforme, delirant, esquizoafectiu, psicòtic breu, psicòtic compartit, psicòtic causat per una malaltia mèdica, psicòtic induït per substàncies i psicòtic no especificat s'inclouen en aquesta categoria. D'entre tots aquests, l'esquizofrènia és el diagnòstic més prevalent.

### 2.3.1.1. L'esquizofrènia

L'esquizofrènia és un trastorn psicòtic generalment crònic que té una prevalença del 0,5% i una incidència anual del 0,16% (McGrath *et al.*, 2008). Segons l'OMS, l'esquizofrènia és la cinquena causa d'incapacitat mundial (WHO, 2008) i s'associa a un augment de la incidència de malalties mèdiques generals i de mortalitat, especialment per suïcidi (Balhara i Verma, 2012; Martens *et al.*, 2013). De manera general, s'inicia durant l'adolescència o a l'inici de l'edat adulta; la mitjana d'edat d'inici per als homes és als 18 anys, mentre que per a les dones ho és als 25 (Sham *et al.*, 1994), i s'ha observat que és 1,4 vegades més freqüent en homes que en dones (McGrath, 2006).

Es caracteritza per una sèrie de símptomes, com són les alteracions en les percepcions, manifestades en forma d'al·lucinacions, i les alteracions del contingut del pensament, manifestades en forma de deliris. També són freqüents la desorganització del llenguatge i del comportament, i els símptomes

negatius que es manifesten com a dèficits en la resposta emocional i social i en alteracions de l'activitat diària. La combinació d'aquests símptomes pot ser molt variable entre els pacients i en un mateix pacient pot variar al llarg del temps, però compromet enormement el funcionament normal de les persones que els pateixen. A més, poden aparèixer problemes de disminució en la capacitat neurocognitiva; és a dir, reducció o deteriorament de funcions psicològiques bàsiques tals com la memòria, l'atenció, la resolució de problemes i la cognició social (Sadock i Sadock, 2009).

Per facilitar el maneig dels símptomes a la pràctica clínica i també a la recerca, aquests es poden classificar en símptomes positius (deliris, al·lucinacions, pensament desorganitzat, hiperactivitat), símptomes negatius (dificultats en la parla, incoherència emocional, pèrdua de motivació) i símptomes generals (angoixa, sentiments de culpa, desorientació, manierismes, preocupació i dificultat en el control d'impulsos). Aquests símptomes poden ser avaluats i quantificats mitjançant diverses escales com la PANSS (de l'anglès, *Positive and Negative Syndrome Scale*), formulada per Kay i col·laboradors (Kay *et al.*, 1987), i traduïda i adaptada al castellà (Peralta i Cuesta, 1994), molt emprada en clínica i recerca.

## Diagnòstic

El diagnòstic d'esquizofrènia, segons el DSM-IV, s'efectua a partir de l'avaluació de la simptomatologia present en el moment de l'avaluació i anterior (taula 5), es descarta que no s'expliqui millor per un altre trastorn, s'exclou la presència d'altres malalties no psiquiàtriques o l'ús de substàncies que puguin desencadenar aquests símptomes i, posteriorment, es classifica en un dels cinc subtipus de l'esquizofrènia: paranoide, catatònic, desorganitzat, indiferenciat i residual. La recent versió DSM-5 ha eliminat la classificació en subtipus perquè aquests es definien en funció de quins símptomes eren presents de forma predominant en el moment de l'avaluació. Tanmateix, els símptomes que un pacient presenta sovint canvien d'un subtipus a un altre i, fins i tot, es poden solapar símptomes característics de dos subtipus en un mateix pacient. Per tant, es va considerar que les diferències entre els subtipus quedaven difuminades i que aquests no tenien validesa ni utilitat per als clínics.

## Etiologia

L'etiologia de l'esquizofrènia és complexa i al llarg de la història s'han desenvolupat diverses hipòtesis per explicar-la implicant mecanismes diversos tals com: neurotransmissió dopaminèrgica entre d'altres sistemes de neurotransmissió (Lau et al., 2013); canvis anatomopatològics en diverses regions del

cervell (Iritani, 2013); alteracions del metabolisme cerebral (Buchsbau et al., 2007); disfunció en el sistema endocrí i en l'immunitari (Kulkarni et al., 2012; Fineberg i Ellman, 2013) i factors que actuen durant el neurodesenvolupament (Piper et al., 2012). A més, els factors psicosocials fruit de diverses formes d'adversitat social també estan implicats en el desenvolupament i l'aparició de les psicosis (Lim et al., 2009).

Es creu que hi ha diversos factors de risc que podrien interaccionar i contribuir a l'aparició de l'esquizofrènia. Molts d'aquests factors actuarien durant el desenvolupament primerenc del cervell; és a dir, durant el període de gestació, el part i en els primers anys de vida (McGrath et al., 2010), o durant el desenvolupament tardà, a l'adolescència i el principi de l'edat adulta. Per exemple, es coneix que haver nascut en un àmbit urbà confereix risc a patir la malaltia, així com haver estat exposat a malalties infeccioses durant la gestació (Brown i Derkits, 2010), o haver abusat de substàncies durant l'adolescència (Arendt et al., 2008).

Un metaanàlisi dels factors de risc que poden intervenir en el desenvolupament de l'esquizofrènia ha revelat associacions amb l'etapa del neurodesenvolupament, adversitats socials en la infància i en l'edat adulta, l'ús de drogues psicoactives, el gènere masculí i el fet de ser emigrant (van Os et al., 2010). En qualsevol cas, de tots els factors que s'han estudiat, el factor

**Taula 5.** Criteris DSM-IV per al diagnòstic de l'esquizofrènia.

---

### **A. Síntomes característics.**

Dos (o més) dels següents, cadascun d'aquests present durant una part significativa d'un període d'un mes (o menys, si han estat tractats amb èxit).

1. Deliris.
2. Al·lucinacions.
3. Discurs desorganitzat (p. ex. incoherència).
4. Comportament catatònic o greument desorganitzat.
5. Síntomes negatius, p. ex. aplanament afectiu (falta o disminució de resposta emocional), alògia (falta o disminució de la parla) o abúlia (falta o disminució de la motivació).

Nota: Només es requereix un símptoma del criteri A si els deliris són estranys, o si els deliris consisteixen en una veu que comenta contínuament els pensaments o el comportament del subjecte, o si dos o més veus conversen entre si.

---

### **B. Disfunció social/ocupacional.**

Durant una part significativa del temps des de l'inici de l'alteració, una o diverses àrees importants d'activitat, com són el treball, les relacions interpersonals o la cura d'un mateix, estan clarament per sota el nivell previ a l'inici del trastorn (o, quan l'inici és en la infància o adolescència, fracàs quant a aconseguir el nivell esperable de rendiment interpersonal, acadèmic o laboral).

---

### **C. Durada.**

Persisteixen signes continus de l'alteració durant, almenys, 6 mesos. Aquest període de 6 mesos ha d'incloure, com a mínim, un mes de símptomes (o menys, si s'ha tractat amb èxit) que compleixin el criteri A, i pot incloure els períodes prodròmics o residuals. Durant aquests períodes prodròmics o residuals, els signes de l'alteració poden manifestar-se només per símptomes negatius o per dos o més símptomes de la llista del criteri A, presents de forma atenuada (p. ex., creences rares, experiències perceptives no habituals).

---

### **D. Exclusió dels trastorns esquizoafectius i de l'estat d'ànim.**

El trastorn esquizoafectiu i el trastorn de l'estat d'ànim amb símptomes psicòtics s'han descartat per la causa següent:

**esta be aixi això?**

1. No hi ha hagut cap episodi depressiu major, maníac o mixt concurrent amb els símptomes de la fase activa, o
2. Si els episodis de l'alteració anímica han aparegut durant la fase activa, la seva durada total ha estat breu amb relació a la durada dels períodes actiu i residual.

---

### **E. Exclusió de consum de substàncies i de malaltia mèdica.**

El trastorn no és causat pels efectes fisiològics directes d'alguna substància (per exemple, un medicament, ús d'una droga) o d'una malaltia mèdica.

---

### **F. Relació amb un trastorn generalitzat del desenvolupament.**

Si hi ha història de trastorn autista o d'algun altre trastorn generalitzat del desenvolupament, el diagnòstic addicional d'esquizofrènia només es produirà si les idees delirants o les al·lucinacions també es mantenen durant almenys un mes (o menys si s'han tractat amb èxit).

de risc més important per desenvolupar esquizofrènia és tenir un familiar amb la malaltia (Sullivan et al., 2005), i això, sumat a l'elevada heretabilitat (Sullivan et al., 2003), indica que les alteracions genètiques són una causa etiològica de pes considerable. Des de fa temps, es considera com a hipòtesi més plausible que l'esquizofrènia és una malaltia complexa promoguda per la interacció de factors genètics i ambientals (van Os i Kapur, 2009).

### 2.3.2. Trastorns de l'estat d'ànim

Els trastorns de l'estat d'ànim són aquells que cursen amb una alteració de l'estat d'ànim, del control de l'estat d'ànim i de l'expressió d'aquest. L'estat d'ànim és un to vital intern i mantingut que influeix en el comportament de cada persona i en com aquesta percep l'entorn que l'envolta. L'estat d'ànim pot ser normal, elevat o deprimit, i pot ser expressat externament de diferents maneres. Aquest procés s'anomena expressió afectiva o afectivitat. Les persones mentalment sanes controlen quin és el seu estat d'ànim i com l'expressen, mentre que les persones afectades d'un trastorn de l'estat d'ànim perden aquest control i tenen una sensació de malestar constant. Els trastorns de l'estat d'ànim són el trastorn bipolar, el ciclotímic, la depressió major, la distímia i el trastorn depressiu no especificat. Els trastorns més incapacitants són el trastorn bipolar i la depressió major, que seran estudiats en la present

tesi. El trastorn bipolar es caracteritza per la presència d'un o més episodis d'ànim elevat, generalment combinats amb episodis d'estat d'ànim deprimit. La depressió major es caracteritza per la presència d'un o més episodis d'estat d'ànim deprimit sense la presència d'episodis d'estat d'ànim elevat.

### Diagnòstic

Per efectuar el diagnòstic de trastorn bipolar o bé de depressió major segons el DSM-IV, s'avalua la simptomatologia present en el moment de l'avaluació i anterior i s'encaixa dins d'un episodi, es descarta que no s'expliqui millor per un altre trastorn, s'exclou la presència d'altres malalties no psiquiàtriques o l'ús de substàncies que puguin desencadenar aquests símptomes i, finalment, s'especifica de quin trastorn es tracta, la seva intensitat i el seu curs.

En el DSM-5 també hi ha canvis que afecten el diagnòstic d'aquests dos trastorns de l'estat d'ànim. Pel que fa al trastorn bipolar, i amb la finalitat de millorar el diagnòstic i poder detectar-ne primers episodis, es fa èmfasi en la presència de canvis en l'activitat i en l'energia, a més dels de l'estat d'ànim. També s'elimina la definició d'episodi mixt per considerar-lo massa estricte i en el seu lloc s'incorpora el terme "característiques mixtes", que poden estar associades tant a l'episodi maníac com al d'ànim deprimit. A més, en el trastorn depressiu major, s'ha

decidit ometre el dol per la pèrdua d'un ésser estimat com a criteri d'exclusió, ja que es considera que no hi ha prou evidències que indiquin que la pèrdua d'un ésser estimat no sigui un factor de risc per desenvolupar un episodi depressiu.

### Etiologia

L'etiologia dels trastorns de l'estat d'ànim és complexa i inclou factors genètics i psicosocials. Malgrat que es coneixen alguns dels factors que estarien implicats en els episodis depressius, en els episodis maníacs i en el viratge d'un episodi depressiu a un de maníac i viceversa, com per exemple els canvis estacionals (*Schaffer et al., 2003*), l'etiologia dels trastorns de l'estat d'ànim tampoc no està del tot establerta.

Hi ha diverses hipòtesis que al llarg de la història han intentat explicar l'etiologia dels trastorns de l'estat d'ànim. Aquestes hipòtesis impliquen un paper cabdal dels neurotransmissors (*Cousins et al., 2009; Werner i Coveñas, 2010*), de l'eix hipotalàmic-pituitàri-adrenal (*Holsboer et al., 2001*), una possible desregulació hormonal (*Kraus et al., 1997; Khemka et al., 2011; Lin i Sibille, 2013*), alteracions del sistema immunitari (*Dantzer et al., 2008; Söderlund et al., 2011*), anomalies anatomopatològiques en diverses regions cerebrals (*Sheline, 2003*) i factors psicosocials (*Carr et al., 2013*).

En els trastorns de l'estat d'ànim, tenir un familiar amb la malaltia també és un factor de risc per desenvolupar-la, tal com succeeix en els trastorns psicòtics, i per tant la genètica juga un paper cabdal en aquestes malalties (*Jones et al., 2004*).

Tanmateix, l'heretabilitat d'aquestes dues malalties és diferent, 40% per a la depressió major enfront del 75% en el trastorn bipolar, i està globalment acceptat que ambdós trastorns s'expliquen per una interacció de genètica i ambient (*Klengel i Binder, 2013*).

També està acceptat que alguns dels factors que estan implicats en el desenvolupament dels trastorns de l'estat d'ànim són compartits amb els implicats en el desenvolupament de l'esquizofrènia. Aquestes evidències reforcen la teoria del contínuum, en la qual es formula la hipòtesi que la simptomatologia present en aquests tres trastorns pot estar compartida entre si. Així, es planteja l'existència d'una continuïtat simptomàtica, de manera que cada un d'aquest trastorns es trobaria en un punt entre mig variable d'aquesta continuïtat lineal. Per tant, es proposen factors genètics que condicionen, específicament, algunes d'aquestes característiques simptomatològiques, i que la combinació d'aquests amb altres factors genètics i amb factors ambientals conduirien a l'aparició d'un trastorn o d'un altre. Hi hauria, doncs, factors genètics de risc presents en tots els trastorns i factors genètics específics de cada trastorn (*Burmeister et al., 2008*).



### 2.3.2.1. El trastorn bipolar

El trastorn bipolar, abans conegut com a psicosi maniacodepressiva, és un trastorn mental greu que es caracteritza per fluctuacions més o menys intenses de l'estat d'ànim de la persona afectada. Així, el malalt bipolar oscil·la entre els episodis d'eufòria o estat hipertímic i els de depressió. El trastorn bipolar té una prevalença d'1,3% (*Smith et al., 2013*), una incidència anual de l'1%, sense diferències de gènere, i és considerada la sisena causa d'incapacitat segons l'OMS (*WHO, 2008*). Pot aparèixer des de la infantesa i fins als 50 anys, tot i que apareix amb més freqüència en l'adolescència o a l'inici de l'edat adulta (*Leboyer et al., 2005*).

El trastorn bipolar es caracteritza per l'aparició d'un o més episodis corresponents a un estat d'ànim elevat, que pot ser maníac, hipomaniac o mixt, que habitualment s'alternen amb episodis de depressió. El DSM-IV estableix els criteris que defineixen cadascun d'aquests episodis per poder fer-ne el diagnòstic (**taules 6, 7 i 8**). En els episodis d'ànim maníac són freqüents els símptomes següents: efusió, augment desmesurat de l'autoestima, fuga d'idees, pèrdua de la capacitat de concentració, disminució del son i idees delirants de grandesa. Com a expressió d'aquest estat d'ànim, apareixen actituds

desinhibides, impulsives, temeràries i extravagants.

Els episodis hipomaniacs es caracteritzen per un estat ànim elevat, però els símptomes no són suficientment greus per ocasionar deteriorament laboral i social, i no compleixen tots els criteris per definir un episodi maníac. En casos greus, pot aparèixer ideació delirant. En l'episodi mixt, conviuen, simultàniament, característiques d'ànim deprimat amb d'altres d'ànim elevat, de tal manera que les persones pateixen canvis d'estat d'ànim que passen de la tristesa a l'eufòria, irritabilitat, agitació, insomni o hipersòmia, alteració de la gana, símptomes psicòtics i ideació de mort o suïcida.

En combinació amb aquests símptomes, poden aparèixer canvis en el nivell d'activitat i en les funcions cognitives, la parla i les funcions vegetatives, i originar un deteriorament en les relacions interpersonals, socials i laborals (*Sadock i Sadock, 2009*).

En funció del tipus d'episodi de l'estat d'ànim que presentin, s'estableixen dos subtipus del trastorn bipolar. El diagnòstic de trastorn bipolar de tipus I és per a aquells casos que presenten episodis d'estat d'ànim maníac o bé mixt en combinació (o no) amb episodis d'estat d'ànim deprimat. El diagnòstic de trastorn bipolar de tipus II és per a aquells casos que

experimenten episodis hipomaniacs en combinació amb un o més episodis depressius. També hi ha pacients que experimenten episodis alternats d'estat d'ànim depressiu i d'ànim eufòric, però aquests episodis no són suficients en nombre, importància, gravetat o durada com per complir els criteris per a un episodi depressiu o maníac, i aquests pacients són diagnosticats de trastorn ciclotímic. La present tesi es focalitzarà en el trastorn bipolar de tipus I (que a partir d'ara serà anomenat trastorn bipolar).

### 2.3.2.2. La depressió major

El trastorn depressiu major, també anomenat depressió unipolar o depressió major, és un trastorn mental greu que es caracteritza per l'aparició d'un o més períodes d'estat d'ànim deprimat, de major o menor durada, sense presència d'episodis maníacs, mixtos o hipomaniacs.

La depressió major té una prevalença del 19% (*Smith et al., 2013*), sent la malaltia psiquiàtrica més prevalent i que, segons l'OMS, el 2020 esdevindrà la segona causa d'incapacitat (*WHO, 2008*), darrere de les malalties cardiovasculars. Té una incidència anual de l'1,5%, apareix, generalment, entre els 20 i els 50 anys, i és més freqüent en dones que en homes.

Els criteris per diagnosticar un episodi depressiu major estan descrits en la **taula 6**. En els episodis d'estat d'ànim deprimat apareixen símptomes com, per exemple, pèrdua d'interès per les coses, pèrdua d'energia, sentiments de culpa, dificultats de concentració, pèrdua de gana, idees de mort i sensació de tristesa, de desesperació i d'inutilitat. Cal destacar, però, que l'estat d'ànim depressiu no és exclusiu de la depressió major ni del trastorn bipolar, ja que també apareix en pacients afectats de distímia, que l'experimenten de manera crònica i sense períodes de normalitat i, tot i que els símptomes són menys greus, no impedeixen el funcionament social i laboral i la seva manifestació no compleix tots els criteris d'episodi depressiu del DSM-IV. La present tesi es centrarà en el trastorn depressiu major.

**Taula 6.** Criteris DSM-IV per al diagnòstic de l'episodi depressiu major.

---

**A. Presència de cinc (o més) dels símptomes següents durant un període de 2 setmanes**

que representen un canvi respecte a l'activitat prèvia; un dels símptomes ha de ser:

1. estat d'ànim depressiu o 2. pèrdua d'interès o de la capacitat per al plaer.

Nota: No s'inclouen els símptomes que són clarament deguts a malaltia mèdica o les idees delirants o al·lucinacions no congruents amb l'estat d'ànim.

1. Estat d'ànim depressiu la major part del dia, gairebé cada dia segons indica la pròpia persona (p. ex., se sent trist o buit) o l'observació d'altres (p. ex., plor).
2. Disminució acusada de l'interès o de la capacitat per al plaer en totes o pràcticament totes les activitats, la major part del dia, gairebé cada dia (segons refereix la pròpia persona o observen els altres). Pèrdua important de pes sense fer règim o augment de pes (p. ex., un canvi de més del 5% del pes corporal en 1 mes), o pèrdua o augment de la gana gairebé cada dia.
3. Insomni o hipersòmia gairebé cada dia.
4. Agitació o alentiment psicomotors pràcticament cada dia (observable pels altres, no tan sols sensacions d'inquietud o d'estar alentit).
5. Fatiga o pèrdua d'energia gairebé cada dia.
6. Sentiments d'inutilitat o de culpa excessius o inapropiats (que poden ser delirants) pràcticament cada dia no només autoretretos o culpabilitat pel sol fet d'estar malalt).
7. Disminució de la capacitat per pensar o concentrar-se, o indecisió, gairebé cada dia (ja sigui una atribució subjectiva o una observació d'altres).
8. Pensaments recurrents de mort (no tan sols la por a la mort), ideació suïcida recurrent sense un pla específic o un intent de suïcidi, o un pla específic per suïcidar-se.

---

**B. Els símptomes no compleixen els criteris per a un episodi mixt.**

---

**C. Els símptomes provoquen malestar clínicament significatiu**

o deteriorament social, laboral o d'altres àrees importants de l'activitat de l'individu.

---

**D. Els símptomes no són deguts als efectes fisiològics directes d'una substància**

(p. ex., una droga, un medicament) o una malaltia mèdica (p. ex., hipotiroidisme).

---

**E. Els símptomes no s'expliquen millor per la presència d'un dol**

(p. ex., després de la pèrdua d'un ésser estimat), sinó que persisteixen durant més de 2 mesos, o es caracteritzen per una acusada incapacitat funcional, preocupacions mòrbides d'inutilitat, ideació suïcida, símptomes psicòtics o alentiment psicomotor.

---

**Taula 7.** Criteris DSM-IV per al diagnòstic de l'episodi maníac.

**A. Un període diferenciat d'un estat d'ànim anormal** i persistentment elevat, expansiu o irritable, que dura almenys una setmana (o qualsevol durada si es necessària l'hospitalització).

**B. Durant el període d'alteració de l'estat d'ànim, han persistit tres (o més) dels símptomes següents** (quatre si l'estat d'ànim és només irritable) i han estat presents en un grau significatiu:

1. Autoestima exagerada o grandiositat.
2. Disminució de la necessitat de dormir (p. ex., se sent descansat després de només 3 hores de son).
3. Més parlador de l'habitual o verborreic.
4. Fuga d'idees o experiència subjectiva que el pensament està accelerat.
5. Distractibilitat (p. ex., l'atenció es desvia massa fàcilment cap a estímuls externs banals).
6. Increment de l'activitat intencionada (socialment, en el treball o en els estudis, o sexualment) o agitació psicomotora.
7. Implicació excessiva en activitats plaents que tenen un alt potencial per produir conseqüències greus (p. ex., fer compres irrefrenables, indiscrecions sexuals o inversions econòmiques irracionals).

**C. Els símptomes no compleixen criteris per a l'episodi mixt.**

**D. L'alteració de l'estat d'ànim és suficientment greu** per provocar deteriorament del funcionament laboral o de les activitats socials habituals, o de les relacions amb els altres, o per necessitar hospitalització a fi de prevenir els danys a un mateix o a d'altres, o hi ha símptomes psicòtics.

**E. Els símptomes no són deguts als efectes fisiològics directes d'una substància** (p. ex., una droga, un medicament o altres tractaments) ni a una malaltia mèdica (p. ex., hipertiroidisme)

**Taula 8.** Criteris DSM-IV per al diagnòstic de l'episodi mixt.

**A. Es compleixen els criteris, tant per a un episodi maníac com per a un episodi depressiu major** (excepte en la durada), gairebé cada dia durant, almenys, un període d'una setmana.

**B. L'alteració de l'estat d'ànim és suficientment greu** per provocar deteriorament laboral o de les activitats socials habituals, o de les relacions amb els altres, o per necessitar hospitalització a fi de prevenir els danys a un mateix o a d'altres, o hi ha símptomes psicòtics.

**C. Els símptomes no són deguts als efectes fisiològics directes d'una substància**

**D. L'alteració de l'estat d'ànim és suficientment greu** (p. ex., una droga, un medicament o un altre tractament) ni a una malaltia mèdica (p. ex., hipertiroidisme).

Nota: Els episodis semblants a la mania que són clarament causats per un tractament somàtic antidepressiu (p. ex., un medicament, teràpia electroconvulsiva, teràpia lumínica) no han de ser diagnosticats com a trastorn bipolar.

## 2.4. Genètica dels trastorns mentals

---

### 2.4.1. Visió general

La base hereditària de les malalties psiquiàtriques es va reconèixer a meitat del segle passat, atès que gràcies a estudis d'epidemiologia genètica de risc familiar, de bessons i d'adopció es va comprovar que la genètica influenciava considerablement en l'aparició de la majoria de malalties psiquiàtriques (Plomin, 1994). Per tant, una vegada es va conèixer que els factors genètics tenien un paper rellevant en el desenvolupament dels trastorns mentals, se'n va promoure l'abordament genètic creient que seria l'eina clau per elucidar-ne l'etiologia i la fisiopatologia. Projectes com el del Genoma Humà, el HapMap, el dels 1000 Genomes, l'ENCODE (de l'anglès, *Encyclopedia of DNA Elements*), juntament amb el Psychiatric Genomics Consortium (PGC), han facilitat avançar en el coneixement de la base genètica de diverses malalties mentals a partir de la integració de grans quantitats de dades.

A partir de la dècada dels noranta, es van començar a emprar tècniques d'anàlisi genètica per a dur a terme diversos abordaments i trobar factors genètics concrets associats a les malalties psiquiàtriques. Les principals tècniques emprades per generar informació genètica han estat i són els estudis de lligament

i els d'associació. Els estudis de lligament permeten localitzar un al·lel associat a una característica de la malaltia o a la pròpia malaltia a partir de l'estudi de l'ADN de famílies amb membres afectats i no afectats mitjançant l'observació de cosegregació d'aquest al·lel amb uns marcadors genètics coneguts. Aquests estudis es van dur a terme, majoritàriament, a la dècada dels noranta i a principis del 2000. Els estudis d'associació cerquen variants de l'ADN ja descrites, variants comunes en la població que puguin estar associades a una determinada malaltia, comparant la seva freqüència entre un grup de pacients i un grup de controls. Els dos abordaments tenen limitacions: els estudis de lligament tenen poca potència per detectar al·lells de baix risc, i els estudis d'associació només tenen potència si l'al·lel és comú, o si s'analitzen grans nombres de mostres. Tanmateix, han aportat evidències que impulsen a continuar investigant el vessant genètic de les malalties psiquiàtriques. Amb l'aparició de tècniques d'alt rendiment, s'ha pogut analitzar tot el genoma o gran part d'aquest en un nombre de mostres cada vegada més gran de tal manera que s'han pogut obtenir moltes dades de cop. Aquestes han estat especialment rellevants en estudis d'associació en els que s'han pogut detectar nombrosos *loci* que estan implicats en

el desenvolupament dels trastorns mentals. Aquests estudis d'associació de tot el genoma, anomenats GWAS (de l'anglès, *genome-wide association studies*) han permès analitzar un gran nombre de variants (al voltant de 500.000) en grans grups d'individus i obtenir informació sobre la implicació de determinades variants comunes en aquestes malalties, ja siguin variacions d'un nucleòtid (SNPs, de l'anglès *single nucleotide polymorphisms*) o variants estructurals (CNV, de l'anglès *Copy Number Variants*) ja siguin insercions o delecions.

Darrerament s'estan emprant i s'empraran en el futur, les tècniques de seqüenciació massiva també coneguda com a seqüenciació de nova generació, que permeten l'estudi massiu i simultani de milions de fragments d'ADN en un únic experiment de tal manera que es pot seqüenciar tot el genoma, tot el conjunt de regions codificants (exoma), o una regió gènica escollida de manera ràpida, econòmica i de moltes mostres alhora. El fet de conèixer tota la seqüència, permet trobar variants rares, és a dir, no descrites anteriorment i per tant poc freqüents, i ampliar el coneixement de la base genètica dels trastorns psiquiàtrics. Un altre camp abordat és el de l'epigenètica i del paper de les regions no codificants com a mecanisme regulador del genoma amb moltes possibilitats d'estar implicat en l'aparició de malalties.

De totes maneres, durant molt de temps expressions del tipus “la genètica ha fallat en l'estudi de les malalties psiquiàtriques” o “no hi ha cap gen per les malalties psiquiàtriques” han estat habituals dins la comunitat científica. Això ha estat així perquè es tracta de malalties complexes que presenten una herència multifactorial i a més de l'herència poligènica, hi estaran involucrats factors tant diversos com l'heterogeneïtat dels loci, la penetrància incompleta, la interacció genètica i la interacció genètico-ambiental, entre d'altres. Els principals obstacles són l'heterogeneïtat tant genètica com fenotípica i la possibilitat que les categories clíniques no siguin homòlogues als patrons genètics (*Newton-Cheh i Hirschhorn, 2005; Chanoek et al., 2007*).

Malgrat totes aquestes dificultats, ara ens trobem en un punt d'inflexió. Hi ha un gruix d'evidències sòlides en aquests darrers quatre anys que comencen a consolidar la identificació de factors genètics que estan implicats en l'etiologia dels trastorns mentals greus. S'han identificat i posteriorment confirmat determinades variants comunes que tenen un petit efecte sobre el fenotip però que estan implicades en les malalties psiquiàtriques (*Schizophrenia Psychiatric GWAS Consortium, 2011; Cross-Disorder Group of PGC, 2013*). I d'altra banda, s'han identificat variants estructurals poc freqüents que tenen un gran efecte

sobre el fenotip (**taula 9**) i que s'ha vist que també estan implicades en altres malalties psiquiàtriques (*Mowry i Gratten, 2012*). Així doncs, podríem dir que estem al començament d'una nova era en la psiquiatria genètica en la que els descobriments de nous factors genètics no han fet més que començar (*Kendler, 2013*).

Focalitzant en els trastorns d'estudi en aquest treball de tesi, cal destacar dos blocs d'evidències genètiques. El primer bloc fa referència a esquizofrènia i trastorn bipolar, trastorns en els quals l'heretabilitat és elevada, 81% per a l'esquizofrènia i 75% per al trastorn bipolar, i els estudis genètics han estat relativament reeixits a l'hora de trobar-hi elements

**Taula 9.** Principals resultats confirmats en esquizofrènia i trastorn bipolar.

| <b>Variants estructurals en esquizofrènia</b> |              |                        |  |
|---|--------------|------------------------|--|
| <b>Localització</b>                           | <b>Tipus</b> | <b>OR (95% IC)</b>     |  |
| <b>1q21.1</b>                                 | Deleció      | OR = 8,3 (3,7 - 19,9)  |  |
| <b>2p16.3</b>                                 | Deleció      | OR = 8,2 (3,8 - 19,4)  |  |
| <b>3p29</b>                                   | Deleció      | OR = 17 (1,4 - 1198,4) |  |
| <b>3p29</b>                                   | Duplicació   | OR = ∞ (1,6 - ∞)       |  |
| <b>7q36.3</b>                                 | Duplicació   | OR = 4 (1,5 - 11,9)    |  |
| <b>15q11.2</b>                                | Deleció      | OR = 2,7 (1,5 - 4,9)   |  |
| <b>15q13.3</b>                                | Deleció      | OR = 9,9 (4,3 - 24,4)  |  |
| <b>15q11.2-13.1</b>                           | Duplicació   | OR = 7,3 (1,2 - 50)    |  |
| <b>16p11.2</b>                                | Duplicació   | OR = 11,6 (5,6 - 29,3) |  |
| <b>16p13.1</b>                                | Duplicació   | OR = 3,3 (1,3 - 7,9)   |  |
| <b>17q12</b>                                  | Deleció      | OR = 9,9 (3,4 - 28,5)  |  |
| <b>22q11.21</b>                               | Deleció      | OR = ∞ (35,9 - ∞)      |  |

| <b>Variants d'un sol nucleòtid</b> |                    |                         |                    |
|------------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| <b>Esquizofrènia</b>               |                    | <b>Trastorn bipolar</b> |                    |
| <b>Localització</b>                | <b>OR (95% IC)</b> | <b>Localització</b>     | <b>OR (95% IC)</b> |
| <b>CACN1C</b>                      | 1,07 (1,05 - 1,10) | <b>CACN1C</b>           | 1,07 (1,05 - 1,10) |
| <b>MHC</b>                         | 1,22 (1,16 - 1,29) | <b>ODZ4a</b>            | 1,14 (1,11 - 1,25) |
| <b>MIR137</b>                      | 1.12 (1.09 - 1.16) |                         |                    |

genètics associats. D'altra banda, el segon bloc fa referència a la depressió major, un trastorn amb una heretabilitat mitjana del 37% i amb menys estudis d'èxit que atribueixin una associació entre un factor genètic i aquest trastorn.

### 2.4.2. Resultats d'estudis d'associació

En les tres malalties, el primer que es va descartar va ser una herència de tipus mendelià, perquè no s'ha trobat cap gen que, de manera única i inqüestionable, estigui directament associat a poder desenvolupar cap dels tres trastorns. Des d'aleshores, s'ha analitzat la presència de variants puntuals (d'un sol nucleòtid) o bé estructurals que poguessin conferir risc a patir alguna d'aquestes malalties.

Pel que fa a variants estructurals, s'ha trobat que pacients amb trastorn bipolar i esquizofrènia tenen més càrrega de variants estructurals que els controls (*International Schizophrenia Consortium, 2008; Zhang et al., 2009*), però no se n'han pogut identificar en depressió major. Recentment, s'han descrit nou variants estructurals en malalts d'esquizofrènia que podrien estar associades a la malaltia: dues al cromosoma 1 i una en cadascun dels cromosomes següents 2, 3, 7, 15, 16, 17 i 22 (*Levinson et al., 2011*). Aquestes variants estructurals tenen valors d'opunitat relativa (OR) elevats (més conegut en anglès com *odds ratio*), valor que indica la força de l'asso-

ciació estadística entre ser portador d'una variant i presentar la malaltia. Tanmateix, estan presents en una proporció petita de casos i tenen poca penetrància i, a més, semblen poc específiques, perquè, per exemple, algunes variants associades a l'esquizofrènia també han estat associades a l'autisme i a la discapacitat intel·lectual, entre d'altres (*Mowry i Gratten, 2012; Sullivan et al., 2012*). Dit d'una altra manera, serien variacions que estarien implicades en el desenvolupament de diversos trastorns mentals. En aquest sentit, un estudi recent ha investigat la relació entre la presència d'aquestes variants estructurals i dèficits en processos cognitius a partir de l'anàlisi del funcionament cognitiu en tres grups d'individus: sense malaltia mental i sense presentar aquestes variants, sense malaltia mental però presentant alguna d'aquestes variants i pacients d'esquizofrènia amb presència d'alguna d'aquestes variants. L'estudi conclou que els individus sans, però portadors de les variants, presenten un funcionament cognitiu entremig dels individus sans sense les variants i els pacients d'esquizofrènia portadors d'aquestes variants (*Stefansson et al., 2014*).

Pel que fa a variants puntuals comunes, una recent metanàlisi elaborada a partir de GWAS promoguts, majoritàriament, pel Psychiatric Genomics Consortium, i que suma més de 17.000 pacients d'esquizofrènia, més d'11.000 pacients amb trastorn bipolar i



fins a 50.000 controls, ha detectat 17 variants comunes associades a esquizofrènia i 3 variants comunes associades al trastorn bipolar (Sullivan et al., 2012). Aquestes variants es troben en gens molt diversos i l'associació més forta, pel que fa a l'esquizofrènia, s'ha localitzat en una regió del complex major d'histocompatibilitat (abreujat en anglès, MHC), amb una oportunitat relativa d'1,22 (Schizophrenia Psychiatric GWAS Consortium, 2011).

En canvi, per a trastorn bipolar, l'associació més forta es troba en una variant al gen CACNA1C (canal de calci depenent de voltatge) amb una oportunitat relativa d'1,14 (Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011). En paral·lel a aquesta metanàlisi, un recent GWAS en pacients d'esquizofrènia i la metanàlisi subsegüent han replicat la implicació de la regió MHC en l'esquizofrènia, han reportat implicació del gen CACNA1C també en el risc de patir esquizofrènia i han descrit 22 variants comunes associades a aquesta malaltia, entre les quals hi ha 13 de noves (Ripke et al., 2013a). D'aquestes 22 variants, 13 estan implicades en ARN llargs no codificants (lncRNAs, de l'anglès *long-non-coding RNA*), i una està relacionada amb el microARN 137 (MIR137), anteriorment ja implicat en l'esquizofrènia (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011). A més, d'aquestes 22 variants, n'hi ha dues que podrien estar implicades en la senyalització del calci. Aquest

resultat, sumat al fet que s'han trobat variants comunes en els gens implicats en la senyalització de calci en esquizofrènia, trastorn bipolar, depressió major i autisme entre d'altres (Splawski et al., 2004; Cross-Disorder Group of PGC, 2013), ha fet que els canals de calci s'estiguin convertint en un punt de mira per a l'estudi de les malalties psiquiàtriques.

Els estudis genètics referents a la depressió major no han estat del tot fructífers, atès que cap GWAS ha trobat evidències sòlides (Sullivan et al., 2012) i la meganàlisi promoguda pel Psychiatric Genomic Consortium, que incloïa 9.240 pacients de depressió major i 9.519 controls, i 1,2 milions d'SNP en la primera fase i 6.783 pacients, 50.695 controls i 554 SNP en la fase de confirmació, no va poder identificar associació amb la malaltia en cap dels SNP analitzats (Ripke et al., 2013b). Es tracta d'una malaltia molt heterogènia en la qual els factors ambientals probablement juguen un paper molt important (Kendler et al., 2004). A més, com que l'heretabilitat és més baixa, en comparació amb la de l'esquizofrènia i el trastorn bipolar, els estudis d'associació requeririen nombres de mostra molt més grans per aconseguir la mateixa potència estadística.

Malgrat que els resultats són diversos i els estudis d'associació identifiquen variants que confereixen un risc molt baix per desenvolupar la malaltia, as-

senyalen gens que estan implicats en diversos trastorns mentals (*Cross-Disorder Group of PGC, 2013*). A més, a partir dels resultats dels GWAS que han analitzat SNP i CNV, s'han proposat diversos mecanismes etiològics que poden estar implicats en el desenvolupament d'aquests trastorns (*Fromer et al., 2014; Yu et al., 2014*).

Resumint, es pot afirmar que hi ha suficients dades que evidencien que l'esquizofrènia i el trastorn bipolar són malalties poligèniques i que la vulnerabilitat a patir-les està influenciada per variants genètiques localitzades en centenars de *loci* (*Giusti-Rodríguez i Sullivan, 2013*), però aquests resultats no expliquen el 100% de l'heretabilitat observada.

### 2.4.3. Resultats d'estudis de seqüenciació massiva

La seqüenciació massiva és un camp molt prometedor i malgrat recentment s'han desenvolupat diverses tecnologies que molt probablement contribuiran a ampliar el coneixement de la base genètica dels trastorns mentals, els estudis desenvolupats fins ara són molt preliminars. En relació amb l'esquizofrènia, els estudis són molt recents i inclouen poques mostres (*revisat a Réthelyi et al., 2013*). Alguns han analitzat tot el genoma (*Need et al., 2012; Kong et al., 2012*), d'altres han seqüenciat tot l'exoma (*Girard et*

*al., 2011; Xu et al., 2011; Xu et al., 2012*) i un ha analitzat els exons i altres regions no codificants relacionades amb gens candidats anteriorment descrits (*Crowley et al., 2013*). Els resultats més rellevants són més freqüència d'SNP rars en pacients que en controls i més presència de mutacions no sinònimes per cada mutació sinònima en pacients d'esquizofrènia en comparació amb individus sans. Pel que fa al trastorn bipolar, els estudis de seqüenciació massiva són molt limitats. Un estudi recent, en el qual s'ha analitzat tot l'exoma de famílies amb diversos membres afectats de trastorn bipolar que presentaven bona resposta al liti, reporta una elevada presència d'SNP rars i de variants estructurals rares, és a dir, presents en menys d'un 1% de la població (*Cruceanu et al., 2013*). Finalment, en relació amb la depressió major, hi ha un únic estudi que ha comparat l'exoma de pacients en funció de la resposta al tractament, i han identificat que l'al·lel menys freqüent de l'SNP rs41271330 del gen BMP5 (de l'anglès, *bone morphogenetic protein 5*) està associat a una pitjor resposta al tractament, cosa que suggereix un paper d'aquest gen en la farmacogenètica dels fàrmacs antidepressius (*Tammiste et al., 2013*). Tot i que són estudis molt inicials, permeten formular la hipòtesi que la combinació de variants comunes de baix risc amb variants rares d'alt risc jugaran un paper rellevant en el desenvolupament d'aquestes dues malalties.

#### 2.4.4. Resultats d'estudis epigenètics

L'epigenètica també és un camp d'estudi prometedor en les malalties psiquiàtriques. Els fenòmens epigenètics són aquells que influeixen sobre l'expressió dels gens, tot i que no es troben en la seqüència de l'ADN. Actuen mitjançant la modificació de les histones que empaqueten l'ADN o bé la metilació de les citosines de les illes CpG que es troben en les regions reguladores dels gens (Tchurikov, 2009). El paper de l'epigenètica en les malalties psiquiàtriques ha anat lligat a la teoria del neurodesenvolupament, que afirma que canvis en el desenvolupament cerebral podrien condicionar l'aparició d'un trastorn psiquiàtric (Kofink et al., 2013). En un estudi amb teixit cerebral *post mortem* de pacients d'esquizofrènia i trastorn bipolar es va veure que el promotor del gen de l'MB-COMT (de l'anglès, membrane-bound catechol-O-methyltransferase) estava hipometilat en pacients d'esquizofrènia i trastorn bipolar en comparació amb els controls (Abdolmaleky et al., 2006). Un altre estudi també en teixit cerebral va trobar una alteració del patró de metilació en molts gens involucrats en el sistema gabaèrgic i glutamatèrgic, en el desenvolupament cerebral i en la funció mitocondrial (Mill et al., 2008). Un estudi recent en teixit cerebral *post mortem* va analitzar el patró de metilació de 485.000 regions CpG de 24 pacients d'esquizofrènia en comparació amb 24 individus control.

Va trobar 2.929 gens en els quals el patró de metilació era diferent després d'ajustar per diverses variables intrínseques de la mostra, alguns d'aquests ja reportats com a gens associats a la malaltia (Wockner et al., 2014). En la depressió major, el gen més estudiat és el BDNF (de l'anglès, *brain derived neurotrophic factor*), que es relaciona tant amb la tardança en la resposta al tractament farmacològic com amb la susceptibilitat a desenvolupar un trastorn depressiu com a conseqüència de situacions vitals estressants. Aquest gen codifica per una proteïna que actua com a factor de creixement i de diferenciació neuronal durant el desenvolupament, i s'hi ha descrit un augment de metilació d'histones (revisat a Mahgoub i Monteggia, 2013). Els estudis epigenètics indiquen que aquest gen pot estar associat al trastorn depressiu, però cal indicar que la majoria de resultats s'han identificat en models animals.

#### 2.4.5. Conclusions globals

A partir dels estudis genètics duts a terme en els trastorns mentals es poden extreure tres conclusions. La primera és que cal explorar altres vessants genètics encara poc abordats com són: les regions no codificants; els mecanismes reguladors del genoma com els microARN, els ARN llargs no codificants i els mecanismes epigenètics, i les variacions exòniques no comunes. La segona conclusió és que cal abordar

les implicacions biològiques de les variants genètiques que ja s'ha identificat que estan associades als trastorns mentals. I la tercera conclusió és que cal avançar en l'anàlisi conjunta de dades genòmiques, transcriptòmiques, proteòmiques, metabolòmiques, clíniques i de neuroimatge en global per intentar desxifrar la complexitat present en aquestes malalties per tal que aquestes anàlisis conduïxin a canvis en el tractament, la prevenció i el consell genètic (*Hosak, 2013*).

En aquest anàlisi global, cal destacar la importància d'incloure-hi una molècula d'ADN habitualment oblidada en la recerca genètica: l'ADNmt. Les implicacions de l'ADNmt i del mitocondri en l'esquizofrènia, el trastorn bipolar i la depressió major es descriuen al següent apartat.

---

# 3

## *implicació dels mitocondris en el trastorn mental greu*

### **3.1. Visió general**

---

S'han fet nombrosos estudis que han buscat variants genètiques en els cromosomes nuclears que poguessin estar implicades en l'esquizofrènia, el trastorn bipolar i la depressió major. Tanmateix, els resultats obtinguts no poden donar una explicació de la fisiopatologia d'aquests trastorns. Per aquest motiu i altres motius, com són l'observació d'alteracions en l'estructura i funció mitocondrial en pacients amb un trastorn mental greu, el mitocondri i el seu genoma es proposen com a elements que participarien en el seu desenvolupament. Hi ha diverses evidències que indiquen que l'ADNmt pot estar implicat en el desenvolupament del trastorn mental greu. D'una banda, els mitocondris tenen una rellevància important en el cervell per l'elevada demanda energètica de les seves cèl·lules. De l'altra banda, la replicació constant del genoma mitocondrial, la desprotecció per manca d'histones, l'exposició a molècules molt reactives com les ROS i la manca de sistemes de reparació fan pensar que es podrien acumular mutacions implicades en l'aparició d'aquestes malalties. I, per últim, sobretot en l'esquizofrènia i també en el trastorn bipolar i depressió major, hi ha diversos estudis que indiquen un excés d'herència materna en aquesta malaltia, i en aquest cas sorgeix la hipòtesi que mutacions o variants heretades a través de la mare podrien contribuir al desenvolupament o a l'expressió fenotípica d'aquestes malalties.

Així doncs, hi ha un lligam que uneix les malalties psiquiàtriques i la biologia mitocondrial. En aquest sentit, les evidències de la implicació mitocondrial en l'etiologia de l'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major han anat en augment.

## 3.2. Alteracions en l'estructura i funció mitocondrials

---

Hi ha diverses evidències de disfunció mitocondrial en el trastorn mental greu relacionades, per una banda, amb canvis en l'estructura i la densitat mitocondrial, i d'altra banda, amb el metabolisme energètic, el sistema de producció d'energia i la presència d'estrès oxidatiu.

### 3.2.1. Canvis en la ultraestructura mitocondrial

Hi ha diversos estudis que reporten canvis en la ultraestructura mitocondrial, però hi ha certa controvèrsia perquè es creu que aquests canvis poden ser fruit de la medicació. En cèl·lules sanguínies de pacients d'esquizofrènia, s'han vist mitocondris inflamats (*Naneishvili i Zurabashvili, 1976; Inurwa et al., 2005*) o menys proporció de mitocondris (*Inurwa et al., 2005*) en pacients quan es comparen amb individus control. En oligodendròcits de pacients d'esquizofrènia també s'han vist menys nombre de mitocondris que en individus sans (*Uranova et al., 1996; Kung i Roberts, 1999; Uranova et al., 2001*) i hiperplàsia d'aquests (*Kolomeets i Uranova, 1999*). Tanmateix, a diferència del que s'havia reportat prèviament, estudis més recents i exhaustius duts a terme en teixit cerebral de pacients d'esquizofrènia i controls no han trobar cap resultat conclouent (*Somerville et al., 2011*). En referència al trastorn bipolar, s'han trobat mitocondris més petits

en còrtex prefrontal i agregacions d'aquests en cèl·lules sanguínies (*Cataldo et al., 2010*). No hi ha estudis fets en pacients amb depressió major.

### 3.2.2. Alteracions en el metabolisme energètic

S'han realitzat diversos estudis per avaluar el metabolisme energètic en esquizofrènia i trastorn bipolar, però aquests estudis no han estat desenvolupats en depressió major. Un bloc dels estudis ha estat realitzat *in vivo* per tal d'avaluar el metabolisme energètic mitjançant espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN). Altres estudis han estat *in vitro* i han avaluat nivells d'expressió gènica de gens relacionats amb el metabolisme energètic en teixit cerebral i en cèl·lules sanguínies.

### Esquizofrènia

En relació amb l'esquizofrènia, un estudi transcripcional, proteòmic i metabolòmic dut a terme en teixit cerebral va reportar que l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme energètic i l'estrès oxidatiu diferenciava, en un 90%, els pacients d'esquizofrènia dels individus sans (*Prabakaran et al., 2004*) i un any més tard, un altre estudi en teixit cerebral *post mortem* també va identificar un descens en l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme oxidatiu

mitocondrial (Altar *et al.*, 2005). Tanmateix, els resultats d'aquests estudis van ser posteriorment qüestionats atès que no tenien en compte la influència del pH del bioespècimen en els resultats d'expressió gènica, fet que, tal i com veurem més endavant, pot ser determinant en les anàlisis d'expressió.

D'altra banda, els estudis d'RMN que han estudiat el metabolisme energètic cerebral mitjançant la detecció de l'isòtop 31 del fòsfor incorporat a les molècules d'ATP i d'altres fosfodièsters del metabolisme energètic, han trobat nivells més baixos d'aquestes molècules en lòbul frontal, lòbul temporal i ganglis basals en pacients d'esquizofrènia en comparació amb individus control (Fujimoto *et al.*, 1992; Kegeles *et al.*, 1998; Volz *et al.*, 2000). Tanmateix, un estudi posterior que emprava la mateixa tècnica, no va trobar diferències entre pacients i controls quant als nivells d'ATP i altres fosfodièsters en còrtex prefrontal (Shirayama *et al.*, 2004).

### Trastorn bipolar

Pel que fa al trastorn bipolar, també un estudi d'RMN amb l'ús de l'isòtop 31 del fòsfor va observar una reducció del metabolisme dels fosfolípids i de l'energia cel·lular en còrtex dorsolateral frontal dels pacients en comparació amb individus sans (Frey *et al.*, 2007). A més, un estudi en limfòcits en cultiu va mostrar una capacitat reduïda d'aquests per adaptar l'expressió gènica en resposta a un medi amb poca

glucosa en comparació amb la resposta dels limfòcits d'individus sans (Naydenov *et al.*, 2007).

### **3.2.3. Canvis en l'activitat de a cadena respiratòria mitocondrial**



L'activitat enzimàtica dels complexos mitocondrials, la capacitat de consumir oxigen de la cadena respiratòria mitocondrial (activitat oxidativa) i la producció d'ATP han estat analitzades *in vitro* en cèl·lules sanguínies i en còrtex prefrontal en les tres malalties, però sobretot en esquizofrènia (**taula 10**). Els estudis elaborats amb teixit cerebral tenen diverses limitacions: sovint només analitzen una regió, no consideren l'efecte de la medicació i tampoc característiques de la mostra rellevants com, per exemple, l'interval *post mortem*.

### Esquizofrènia

L'any 2001, en un estudi amb pacients d'esquizofrènia i individus control que analitzava el complex I, es va proposar que l'activitat d'aquest complex I en plaquetes era un marcador fiable de l'estat del pacient, atès que correlacionava positivament amb la severitat dels símptomes (Dror *et al.*, 2002). Aquest resultat estava precedit d'un altre estudi en plaquetes de pacients d'esquizofrènia, que va analitzar l'activitat enzimàtica dels complexos I i IV i va detectar un increment de l'activitat del complex I (Ben-Shachar *et al.*, 1999).

Tanmateix, no hi ha hagut estudis posteriors que

**Taula 10.** Principals resultats dels anàlisis d'activitat enzimàtica en pacients d'esquizofrènia i de trastorn bipolar.

|                   |  <b>teixit cerebral</b>   |  <b>cèl·lules sanguínies</b>  |
|-------------------|--|---|
| <b>complex I</b>  | = còrtex prefrontal <b>ESQ</b> Andreazza et al., 2010<br>▲ còrtex prefrontal <b>TB</b> Andreazza et al., 2010<br>▼ CI + CIII còrtex temporal <b>ESQ</b> Maurer et al., 2001<br>▼ CI + CIII gangli basal <b>ESQ</b> Maurer et al., 2001                 | ▲ <b>ESQ</b> Drop et al., 2002<br>▲ <b>ESQ</b> Ben-Shachar et al., 1999<br>= <b>TB</b> Ben-Shachar et al., 1999 |
| <b>complex II</b> | ▲ putamen <b>ESQ</b> Prince et al., 2001<br>▲ nucli acumbents <b>ESQ</b> Prince et al., 2001   |   |
| <b>complex IV</b> | = còrtex frontal <b>ESQ</b> Whatley et al., 2010<br>▲ putamen <b>ESQ</b> Prince et al., 2010<br>▲ nucli acumbents <b>ESQ</b> Prince et al., 2001<br>▼ nucli caudat <b>ESQ</b> Caveller et al., 2001<br>▼ còrtex frontal <b>ESQ</b> Maurer et al., 2001 | = <b>TB</b> Ben-Shachar et al., 1999  |

ESQ esquizofrènia / TB trastorn bipolar

hagin confirmat aquesta relació. De fet, un estudi en còrtex prefrontal no va trobar diferències en l'activitat enzimàtica del complex I de pacients d'esquizofrènia en comparació amb individus sense malaltia psiquiàtrica (Andreazza et al., 2010). En altres regions i altres complexos, hi ha molta controvèrsia en els resultats reportats. Per exemple, no s'havien trobat diferències en l'activitat del complex IV en plaquetes (Ben-Shachar et al., 1999), però sí que se'n van apreciar en teixit cerebral: en nucli caudat i còrtex frontal i temporal es va trobar una reducció de l'activitat enzimàtica, mentre que en putamen i nucli acumbents se'n va trobar un augment (Cavelier et al.,

1995; Prince et al., 1999; Maurer et al., 2001). Tanmateix, aquest resultat no estava en concordança amb un altre estudi similar en còrtex frontal que no va apreciar cap diferència (Whatley et al., 1996). D'altra banda, s'ha descrit un descens en l'activitat del complex I + complex III en còrtex temporal i gangli basal de pacients (Maurer et al., 2001) i un augment de l'activitat del complex II en putamen i nucli acumbents de pacients (Prince et al., 1999).

El gran repte d'aquests resultats és discriminar quin és el paper de la medicació en el canvi en les activitats enzimàtiques de la cadena respiratòria mito-



condrial (Casademont et al., 2007). En relació amb això, un estudi de línies de limfòcits transformats de pacients amb esquizofrènia va reportar una capacitat de consumir oxigen reduïda, per part de la cadena respiratòria mitocondrial quan el complex I era estimulat en cultius *in vitro* d'aquestes cèl·lules lliures de la influència de medicaments (Rosenfeld et al., 2011).

### Trastorn bipolar

Tant en el trastorn bipolar com en la depressió major hi ha menys estudis que explorin l'activitat enzimàtica dels complexos mitocondrials. En estudis que comparaven pacients amb trastorn bipolar i controls s'ha reportat que els pacients presentaven menys activitat del complex I en teixit del còrtex prefrontal (Andreazza et al., 2010), però, en canvi, no es produïa cap alteració en plaquetes (Ben-Shachar et al., 1999) ni en la capacitat de consumir oxigen de la cadena respiratòria mitocondrial de limfòcits transformats (Rosenfeld et al., 2011).

### Depressió major

En la depressió major no s'han trobat alteracions de l'activitat enzimàtica del complex I en plaquetes (Ben-Shachar et al., 1999), ni tampoc en còrtex prefrontal (Andreazza et al., 2010). Tanmateix, en un estudi dut a terme a partir de biòpsies musculars sí que es va descriure que pacients amb diagnòstic de

depressió major i, a més, amb presència de símptomes típics de les malalties mitocondrials presentaven menor producció d'ATP i valors menors en els quocients enzimàtics en comparació amb individus sans (Gardner et al., 2003).

### **3.2.4. Estrès oxidatiu**

Un mal funcionament de la cadena transportadora d'electrons porta associada una acumulació d'espècies reactives d'oxigen i, consegüentment, un estrès oxidatiu (Andreazza, 2012). En teixit cerebral *post mortem* de pacients amb trastorn bipolar, s'han vist alteracions proteiques fruit de l'estrès oxidatiu (Andreazza et al., 2010), però no s'han reportat en teixit de pacients d'esquizofrènia ni depressió major. Sí que s'ha reportat excés de productes de la peroxidació lipídica fruit de l'estrès oxidatiu en còrtex cingulat de pacients amb esquizofrènia i trastorn bipolar (Wang et al., 2009) i nivells baixos de l'enzim antioxidant glutatió en còrtex prefrontal d'individus amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major (Gawryluk et al., 2011). També s'han reportat nivells alts de superòxid dismutasa i de substàncies reactives de l'àcid tiobarbitúric, indicadores d'estrès oxidatiu en sèrum de pacients amb esquizofrènia i trastorn bipolar en comparació amb individus sans (Andreazza et al., 2008; Kunz et al., 2008).

### 3.3. Evidències d'herència materna

Les evidències d'herència materna en l'esquizofrènia i en trastorn bipolar es van començar a descriure a principis dels anys noranta, fet que va originar la hipòtesi de la implicació del genoma mitocondrial i de la funcionalitat mitocondrial en aquests trastorns.

#### Esquizofrènia

Hi ha diversos estudis que han mostrat un major risc de patir esquizofrènia si es té un familiar afectat en la línia materna que si el familiar malalt és de la línia paterna (*Shimizu et al., 1987; Goldstein et al., 1992; Wolyniec et al., 1992; Maier et al., 1993; Swerdlow et al., 1999*). Un estudi que es va fer amb fills de germans bessons, en els quals un bessó tenia un fill malalt d'esquizofrènia i l'altre bessó no, es va veure que els fills que desenvolupaven la malaltia tenien, amb més freqüència, la mare afectada que el pare (*Gottesmann i Bertelsen, 1989*). Un estudi posterior no va trobar excés d'herència materna en 439 famílies, però sí una tendència molt propera a la significació (*DeLisi et al., 2000*). Recentment, el nostre grup de recerca ha descrit un increment del risc de patir esquizofrènia en els familiars que comparteixen l'ADNmt amb un malalt d'esquizofrènia respecte als familiars que no comparteixen aquest material genètic. A més, en les dones, compartir l'ADNmt amb un pacient d'esquizofrènia també

conferia un elevat risc per desenvolupar un trastorn d'ansietat i depressió major (*Verge et al., 2012*).

#### Trastorn bipolar

En el trastorn bipolar s'ha observat més presència de mares afectades que de pares afectats i major risc de patir la malaltia si és té la mare afectada de trastorn bipolar (*McMahon et al., 1995*). Un any més tard, també es va reportar un excés d'herència materna en un estudi que analitzava 57 famílies (*Gershon et al., 1996*). D'altra banda, hi ha altres estudis que no han pogut demostrar que hi hagi aquest component matern en la transmissió del trastorn bipolar (*Kato et al., 1996; Grigoroiu-Serbanescu, 1998*).

#### Depressió major

En la depressió major, la presència d'herència materna només ha estat explorada en un estudi. Aquest estudi va analitzar 672 famílies amb casos de depressió major i va trobar que els familiars que segueixen la línia materna, i per tant comparteixen l'ADNmt, tenien un risc més elevat de desenvolupar la malaltia que els familiars que no comparteixen l'ADNmt (*Bergemann i Boles, 2010*). Hi ha un altre estudi que no va explorar la depressió major de manera directa, tot i que va trobar que les mares de fills amb malaltia

mitocondrial tenien més predisposició a tenir depressió o angoixa en comparació amb mares de fills sense trastorns mitocondrials però amb malalties de gravetat comparable (Boles et al., 2005).

Una de les explicacions de l'excés d'herència materna observat en l'esquizofrènia, en el trastorn bipolar i en la depressió major pot ser la implicació de l'ADNmt en aquests trastorns a través de l'herència de variants de risc presents en aquesta molècula, si bé la depressió major té una heretabilitat més baixa que l'esquizofrènia i el trastorn bipolar i, suposadament, els factors genètics tenen un paper menys rellevant. Tot i això, hi ha altres factors que podrien contri-

buir a aquesta aparent herència materna observada, com, per exemple, l'edat d'inici de la malaltia. És ben conegut que l'edat d'inici de l'esquizofrènia en les dones és més tardana, i per tant és més probable tenir parella i descendència en les dones que en els homes. Relacionat amb els dos trastorns, se sap també que el fet de tenir un progenitor afectat té conseqüències psicosocials en els fills (Zahn-Waxler et al., 1984; Weissman et al., 2006), i s'argumenta que com que, generalment, les mares efectuen un treball de criança més directe i present que els pares, aquestes conseqüències psicosocials podrien ser transmises amb més intensitat per part de les mares malaltes que dels pares (McMahon et al., 1995).

### 3.4. Evidències de comorbiditat psiquiàtrica i malaltia mitocondrial

---

Els primers estudis que es van publicar associant la implicació de la biologia mitocondrial i les malalties psiquiàtriques descrivien casos de pacients que tenien un diagnòstic de malaltia mitocondrial i presentaven simptomatologia psiquiàtrica.

Així, el 1990 es va publicar el cas d'un pacient amb malaltia mitocondrial i psicosi maniacodepressiva (Stewart i Naylor, 1990), i aquell mateix any es va publicar un altre cas d'un pacient amb diagnòstic de MELAS i simptomatologia psicòtica (Suzuki et

al., 1990). Posteriorment, es va descriure el cas d'un pacient amb PEO familiar, que presentava depressió severa i en el qual s'havien trobat múltiples delecions en l'ADNmt (Suomalainen et al., 1992) i, una mica més endavant, es va descriure un cas de MELAS amb simptomatologia psiquiàtrica relacionada amb l'esquizofrènia (Thomeer et al., 1998). A partir d'aquestes evidències es van publicar dos estudis en els quals es recopilaven els símptomes psiquiàtrics que eren presents en pacients amb diagnòstic de malaltia mitocondrial (Fattal et al., 2006; Fattal et al., 2007)

i van descriure que els principals símptomes que es trobaven en conjunció amb els psiquiàtrics eren fatiga, debilitat muscular i pèrdua d'audició. D'aquest estudi, es coneix que la incidència de depressió major és més gran en adults que presenten una alteració de la fosforilació oxidativa; tanmateix, no totes les persones que tenen una mateixa mutació acaben desenvolupant una depressió major. En aquest sentit, en un estudi dut a terme en 35 adolescents amb un trastorn mitocondrial confirmat genèticament i bioquímica es va identificar que cinc d'ells presentaven una depressió major (Koene et al., 2009).

Recentment, en una revisió que analitzava els articles publicats des de la dècada dels vuitanta, s'ha conclòs que existeix comorbiditat entre malaltia mitocondrial i psiquiàtrica, i que segons el que hi ha descrit, la simptomatologia psiquiàtrica precedeix la mitocondrial (Anglin et al., 2012b), sent els trastorns de l'estat d'ànim, el deteriorament cognitiu, la psicosi i l'angoixa les manifestacions psiquiàtriques més freqüents.

### 3.5. Variants de l'ADNmt en el trastorn mental greu

#### 3.5.1. Variants en la seqüència d'un sol nucleòtid (mtSNPs)

S'han publicat diversos articles que han descrit variacions d'un sol nucleòtid en la seqüència de l'ADNmt de pacients amb trastorn bipolar, depressió major i esquizofrènia quan s'han comparat amb la seqüència de l'ADNmt en individus sans o la seqüència de referència (rCRS), recollits en la **figura 10**. Aquestes variacions poden ser presents en la població general i s'anomenen variants comunes o mtSNP, o bé poden ser variacions no descrites anteriorment o poc freqüents i s'anomenen variants noves o rares. Alguns d'aquests estudis parteixen de la seqüència-

ció de tot l'ADNmt d'un grup reduït de pacients a fi d'identificar variants per analitzar-les en un posterior estudi de casos i controls. Altres estudis cerquen en un grup de pacients la presència de variants ja conegudes per confirmar la seva implicació, o bé per determinar la seva freqüència en un estudi d'associació. La majoria d'estudis estan fets en mostra sanguínia i només quatre s'han dut a terme en teixit cerebral *post mortem*. En els diferents trastorns mentals greus, s'han identificat variants tant homoplàsmiques com heteroplàsmiques, però cap d'aquestes aporta evidències sòlides per assegurar que estan implicades en el risc de desenvolupar

aquestes malalties. També és cert que tant el nombre d'estudis que s'han fet com el de mostres analitzades en cadascun d'aquests sempre ha estat molt discret. Per tant, molts d'aquests estudis no tenen la potència estadística adequada per identificar si una determinada variant està implicada en la malaltia, ni per descartar que no ho està.

### Esquizofrènia

En relació amb l'esquizofrènia, hi ha 12 estudis que cerquen la implicació de variants en l'ADNmt en l'esquizofrènia, 7 seqüencien l'ADNmt, 2 són estudis d'associació i 3 són estudis descriptius (**figura 10**).

En el primer estudi de seqüenciació de tot el genoma mitocondrial es van analitzar mostres sanguínies de 2 pacients d'esquizofrènia i, malgrat que es van trobar 5 variants noves, aquestes no van resultar associades a la malaltia en un posterior estudi d'associació fet pels mateixos investigadors, que incloïa 81 pacients d'esquizofrènia i cinc grups control (*Lindholm et al., 1997*). L'estudi següent de seqüenciació que es va publicar va ser dut a terme pel nostre grup de recerca i es va seqüenciar l'ADNmt a partir de leucòcits de 6 pacients d'esquizofrènia amb aparent herència materna. Es van identificar sis variants noves, tres d'aquestes no sinònimes (*Martorell et al., 2006*) i, tot i que no es va fer un posterior estudi de

casos i controls, aquestes variants no es van detectar en 95 individus control. Un estudi que va seqüenciar l'ADNmt a partir de mostres sanguínies de 166 pacients d'esquizofrènia i 174 controls va trobar dues mutacions del gen MT-ND5 associades a la malaltia, però aquest resultat no es va poder replicar en un segon estudi amb 244 pacients i 508 controls (*Bamne et al., 2008*). Més tard, es va seqüenciar tot l'ADNmt a partir de mostres de sang de 93 pacients d'esquizofrènia en comparació amb l'ADNmt de 784 controls i es van identificar tres variants homoplàsmiques no sinònimes presents al gen MT-ATP6 només en pacients i tres variants rares heteroplàsmiques susceptibles d'estar associades a la malaltia (*Ueno et al., 2009*). Només tres estudis han seqüenciat tot l'ADNmt en mostres de cervell. El primer incloïa 14 pacients d'esquizofrènia i 36 controls i, malgrat no trobar cap variant associada a la malaltia, sí que va descriure que hi havia un 22% més de substitucions sinònimes a la regió codificant de l'ADNmt en pacients que en controls (*Rollins et al., 2009*). El segon estudi, més recent, va analitzar la seqüència de l'ADNmt d'11 regions cerebrals diferents de 4 pacients d'esquizofrènia i 10 controls (*Sequeira et al., 2012*). En aquest estudi, els autors indicaven que havien identificat una variant nova en pacients d'esquizofrènia al gen MT-CO2, a la posició 7.934A>G, però aquesta variant avui ja

està descrita en la base de dades MITOMAP com a predictora de l'haplogrup L0. Un altre estudi recent va analitzar la seqüència d'una regió de l'ADNmt que inclou 5 gens en mostra de teixit cerebral de 28 pacients d'esquizofrènia i en mostra sanguínia de 114 pacients. Van trobar 6 variants noves en teixit cerebral (dues amb canvi d'aminoàcid) i 11 en cèl·lules sanguínies (dues amb canvi d'aminoàcid), totes aquestes només presents en pacients (Ichikawa *et al.*, 2012).

Hi ha tres estudis d'associació que cerquen la freqüència de variants ja descrites en comparació amb controls. Un d'aquests va trobar més presència de la variant 12027T>C en una mostra de 181 pacients enfront de 184 controls en cèl·lules sanguínies, i en una mostra de 5 pacients i 9 controls en teixit cerebral (Marchbanks *et al.*, 2003), si bé aquests resultats probablement eren fruit d'errors metodològics (Bandelt *et al.*, 2005). El segon estudi no va trobar diferències en les freqüències de 3 variants quan es van comparar pacients i controls (Gentry i Nimgaonkar 2000). El nostre grup de recerca ha participat en el darrer estudi que va comparar la freqüència de 25 variants definidores dels principals haplogrups europeus a partir de cèl·lules sanguínies entre 942 pacients i 1.231 controls, sense trobar cap diferència significativa (Mosquera-Miguel *et al.*, 2012).

Hi ha dos estudis que interroguen posicions concretes. El primer d'aquests, que partia de cèl·lules sanguínies, no va trobar que cap dels 300 pacients analitzats presentés la variant 3.243A>G associada a MELAS (Odarwara *et al.*, 1998), mentre que el segon sí que va trobar aquesta mutació en teixit cerebral *post mortem* d'un pacient d'esquizofrènia dels 13 analitzats (Munakata *et al.*, 2005).

### Trastorn bipolar

En relació amb el trastorn bipolar, s'han fet quatre estudis de seqüenciació de tot l'ADNmt i quatre que cerquen mutacions concretes, alguns a partir de mostra sanguínia i d'altres a partir de teixit cerebral (figura 10).

Un d'aquests va avaluar les variants detectades per seqüenciació en 25 pacients amb aparent herència materna en cèl·lules sanguínies de 94 pacients i 94 controls, però no va trobar cap associació d'aquestes amb la malaltia (Kirk *et al.*, 1999). Un altre estudi molt similar va avaluar 15 variants detectades també per seqüenciació en 9 pacients amb aparent herència materna en mostra sanguínia de 93 pacients amb trastorn bipolar i 63 controls, sense trobar, tampoc, cap resultat significatiu (McMahon *et al.*, 2000). El tercer estudi va avaluar les variants detectades per seqüenciació de l'ADNmt de 9 pacients amb tras-

# Esquizofrènia

1

## Lindholm et al. 1997

**Mostra:** Estudi 1: 5 ESQ, Estudi 2: 81 ESQ i cinc grups C

**Resultats:** 5 variants noves identificades en ESQ en l'estudi 1, no confirmades en l'estudi 2.



2

## Odawara et al. 1998

**Mostra:** 300 ESQ

**Resultats:** cap pacient amb la variant 3.243 A>G.



3

## Gentry i Nimgaonkar 2000

**Mostra:** 144 ESQ i 194 C.  
Cap resultat positiu



4

## Marchbanks et al. 2003

**Mostra:** Estudi 1: 181 ESQ i 184 C; Estudi 2: 15 ESQ i 9 C

**Resultats:** variant 12.027T>C més present en ESQ en ambdós estudis.



5

## Munakata et al. 2005

**Mostra:** 13 ESQ i 15 C.

**Resultats:** variant 3.243 A>G en 1 ESQ



6

## Marchbanks et al. 2003

**Mostra:** Estudi 1: 181 ESQ i 184 C; Estudi 2: 15 ESQ i 9 C

**Resultats:** variant 12.027T>C més present en ESQ en ambdós estudis.



7

## Bamne et al. 2008

**Mostra:** Estudi 1: 166 ESQ i 174 C, Estudi 2: 244 ESQ i 508C

**Resultats:** en l'estudi 1 troben dues variants al gen MT-ND5 associades a l'ESQ (13.368 G>A 13.708G>A), però aquest resultats no es confirmen en l'estudi 2.



8

## Ueno et al. 2009

**Mostra:** 93 ESQ i 784 C

**Resultats:** 6 variants noves: 3 homoplàsmiques no-sinònimes només presents en ESQ (8.843T>C; 8.902G>A; 8.945T>C) i 3 heteroplàsmiques (12.27G>A; 5.578T>C; 13.418G>A).



9

## Marchbanks et al. 2003

**Mostra:** 181 ESQ i 184 C

**Resultats:** variant 12.027T>C més present en ESQ.



10

## Sequeira et al. 2012

**Mostra:** 4 ESQ i 10 C

**Resultats:** variant nova 7.934A>G al gen MT-CO2



11

## Ichikawa et al. 2012

**Mostra:** Estudi 1: 28 ESQ, Estudi 2: 114 ESQ i 117 C

**Resultats:** 17 variants rares només presents en pacients: 6 en teixit cerebral i 11 en cèl·lules sanguínies



12

## Mosquera-Miguel et al 2012

**Mostra:** 942 ESQ i 1231 C

Cap resultat positiu.



seqüenciació de l'ADNmt complet



posicions concretes en l'ADNmt



cèl·lules sanguínies



teixit cerebral post mortem

## Trastorn Bipolar

- Kirk et al. 1999 i McMahon et al. 200**  
**Mostra:** 94 TB i 94 C  
Cap resultat significatiu.
- McMahon et al. 2000**  
**Mostra:** 93 TB i 63 C  
Cap resultat significatiu.
- Munakata et al. 2004**  
**Mostra:** Estudi 1: 630 TP i 734C,  
Estudi 2: 199 TB i 258 C.  
**Resultats:** variant 3.644T>C  
associada a TB.

- Kato et al. 2000 i Kato et al. 2001**  
**Mostra:** Estudi 1: 145 TB i 184 C,  
Estudi 2: 134 TB i 187 C  
**Resultats:** variant 5.178C i haplotip  
5.178C/10.398A associats a TB
- Munakata et al. 2005**  
**Mostra:** 15 TB i 14 C  
**Resultats:** variant 3.243 A>G en 2 TB.
- Rollins et al. 2009**  
**Mostra:** 12 TB i 36 C.  
Cap resultat significatiu.
- Kazuno et al. 2009**  
**Mostra:** Estudi 1: 201 TB i 255 C;  
Estudi 2: 230 TB i 240 C.  
**Resultats:** variant 12.358A>G  
associada a TB en l'estudi 1,  
però no es confirma en l'estudi 2.

## Depressió major

- Munakata et al. 2005  
i Rollins et al. 2009**
- Mostra:** 15 DM / 14 DM i 36 C.  
Cap resultat significatiu.

- Rollins et al. 2009**  
**Mostra:** 14 DM i 36 C.  
Cap resultat significatiu
- Munakata et al. 2007**  
**Mostra:** 1 DM  
**Resultats:** 34 variants en la seqüència.  
Dues d'elles (3.394T>C, 9.115A>G)  
van ser analitzades en relació a la  
funcionalitat mitocondrial sense cap  
resultat significatiu.

ESQ esquizofrènia / DM depressió major / TB trastorn bipolar / C control

figura 10

**Figura 10.** Estudis de variants d'un sol nucleòtid en l'ADNmt en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major



torn bipolar en cèl·lules sanguínies en dos sets de 630 i 199 pacients respectivament i va trobar la variant 3.644T>C associada a la malaltia (Munakata et al., 2004). En teixit cerebral s'ha fet un estudi de seqüenciació de tot l'ADNmt, sense trobar cap variant associada al trastorn bipolar (Rollins et al., 2009).

Altres estudis que comparen la freqüència de variants concretes en pacients i controls han trobat que, en la posició 5.178, la variant més freqüent en la població general encara era més freqüent en 145 pacients amb aparent herència materna que en 184 controls, així com també ho era l'haplotip 5.178C/10.398A (Kato et al., 2000; Kato et al., 2001). Seguidament, es va trobar que la variant 10.398A estava associada a millor resposta al tractament amb lití en un estudi amb 21 pacients (Washizuka et al., 2003a), i també estava relacionada amb la dinàmica del  $Ca^{2+}$  en una mostra de 35 línies cel·lulars de cíbrids obtingudes de pacients amb trastorn bipolar (Kazuno et al., 2006). En un altre estudi amb 201 pacients amb trastorn bipolar i 255 controls, es va trobar la variant 12.358A>G associada a la malaltia, però els mateixos autors no van poder confirmar aquesta associació en una mostra independent (Kazuno et al., 2009).

Per últim, en el mateix estudi descriptiu en teixit cerebral mencionat anteriorment, es va identificar

la mutació 3243A>G causant de MELAS en 2 pacients amb trastorn bipolar (Munakata et al., 2005).

### Depressió major

Pel que fa a la depressió major, s'han dut a terme dos estudis en teixit cerebral *post mortem* i un en cèl·lules sanguínies (figura 10).

Un dels estudis fets en teixit cerebral va cercar la presència de la mutació 3.243A>G causant de MELAS, però no la va trobar en cap dels de 15 pacients amb depressió major analitzats (Munakata et al., 2005). El segon estudi va seqüenciar l'ADNmt de 14 pacients i 36 individus control i no va identificar cap variant que fos present en pacients i no en controls (Rollins et al., 2009). El darrer estudi va seqüenciar tot l'ADNmt d'un pacient amb depressió major i una història clínica familiar de malalties psiquiàtriques i va identificar 34 substitucions en la seqüència de les cèl·lules sanguínies. Dues d'aquestes (3.394T>C i 9.115A>G) van ser analitzades per tal de relacionar-les amb la funcionalitat mitocondrial (mitjançant l'anàlisi del potencial de membrana mitocondrial i de l'activitat de l'ATP sintasa en cíbrids), però no va ser així (Munakata et al., 2007). Les altres substitucions no van ser posteriorment analitzades.

Els resultats de mutacions puntuals en el genoma

mitocondrial en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major són molt heterogenis, inclouen mides de mostra molt diferents i tècniques de seqüenciació i de genotipat també diferents. A més, també han analitzat teixits diferents, i els estudis en cervell *post mortem* han estat fets en diverses zones cerebrals. La majoria dels resultats no aporten cap variant associada a cap dels tres trastorns i, en el cas dels que sí que ho fan, no hi ha estudis posteriors que els hagin confirmat.

### 3.5.1.1. Haplogrups mitocondrials

Diversos estudis han analitzat si la pertinença a un haplogrup mitocondrial concret està relacionada amb el risc de desenvolupar un dels tres trastorns. La determinació de l'haplogrup mitocondrial es fa mitjançant la detecció de les variants mitocondrials associades a aquell llinatge.

#### Esquizofrènia

Pel que fa a l'esquizofrènia, s'han obtingut resultats diversos a partir d'estudis desenvolupats amb mostres sanguínies. Un d'aquests, fet en una mostra israeliana-àrab, va analitzar 202 malalts d'esquizofrènia i els seus pares (entenent només el progenitor patern) com a controls. Aquest estudi va trobar més freqüència de l'haplogrup HV en pacients que en

controls (*Amar et al., 2007*). Un altre estudi amb població italiana que analitzava 142 pacients va trobar que aquells en els quals la malaltia havia aparegut en una edat precoç presentaven l'haplogrup JT amb més freqüència que la resta de pacients, però no va trobar cap diferència significativa entre els pacients i els 190 controls analitzats (*Magri et al., 2007*).

D'altra banda, en un estudi posterior amb mostra de 93 pacients japonesos no es va trobar cap associació entre pertànyer a un determinat haplogrup i el risc de desenvolupar la malaltia (*Ueno et al., 2009*), ni tampoc es va trobar cap associació en un estudi en el qual el nostre grup de recerca ha participat, que analitzava 942 individus d'esquizofrènia i 1.231 controls (*Mosquera-Miguel et al., 2012*).

#### Trastorn bipolar

La possible implicació dels haplogrups mitocondrials en relació amb el trastorn bipolar ha estat molt menys estudiada que en l'esquizofrènia. El primer estudi dut a terme en 93 pacients i 63 controls d'origen europeu va identificar que les freqüències dels haplogrups eren similars en els dos grups i també similars a les freqüències reportades en la població europea (*McMahon et al., 2000*). Posteriorment, un estudi amb 195 pacients i 255 controls va trobar més representació de l'haplogrup N9a en el grup de pacients (*Kazuno et al., 2009*).

## Depressió major

En aquest cas no trobem en la bibliografia cap estudi que hagi explorat les variants que formen els diferents haplogrups i n'hagi comparat les freqüències entre pacients i controls.

Per últim, hem de citar un estudi que es va fer amb mostres de cervell *post mortem* de pacients amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major en el qual els autors formulaven la hipòtesi que variacions específiques en l'ADNmt podrien estar relacionades amb l'acoblament més o menys efectiu de la cadena respiratòria i amb la generació de les ROS. Van descriure una associació entre el pH del cervell i el superhaplogrup que inclou els haplogrups U, K i UK. És a dir, els pacients que pertanyien a aquests haplogrups tenien un pH més alt i, per tant, una disminució de la concentració de protons en comparació amb els individus dels altres haplogrups (*Rollins et al., 2009*).

Cal assenyalar que en aquests estudis d'associació hi ha diverses qüestions metodològiques que sovint no s'han tingut en compte. La primera qüestió fa referència a la realització de múltiples tests pel fet d'haver comparat múltiples variants sense ajustar els valors de probabilitat. La segona qüestió fa referència a l'estratificació de la població que poden tenir alguns estudis que analitzen poblacions amb orígens filogenètics diferents (*Mosquera-Miguel et al., 2012*).

## **3.5.2. Delecions en l'ADNmt**

A més de variacions puntuals de canvis d'un nucleòtid, en l'ADNmt poden aparèixer altres tipus de variacions com, per exemple, insercions o delecions. Les més reportades són les delecions i es creu que estan relacionades amb el procés d'envel·liment (OMIM #50200). Per a l'estudi de delecions de l'ADNmt, s'analitza o bé la presència de l'anomenada "deleció comuna", que té una extensió de 4.977 kb i va des del gen MT-ATP8 fins al gen MT-ND5, generalment mitjançant la PCR quantitativa (qPCR), o bé, per PCR visualitzant en un gel d'electroforesi, la presència d'altres bandes més curtes de la de 16.569 pb. La presència de delecions s'ha analitzat en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major, però amb metodologia molt diversa i sense cap resultat conclouent. Els estudis, majoritàriament, han analitzat teixit cerebral *post mortem*, atès que les delecions acostumen a ser somàtiques (no heretades), tot i que també s'han explorat altres teixits.

## Esquizofrènia

Cap dels cinc estudis fets en còrtex prefrontal que incloïen 13, 27, 45, 50 i 15 pacients d'esquizofrènia i individus control va trobar més freqüència de delecions en l'ADNmt en el grup de pacients (*Cavelier et al., 1995; Kakiuchi et al., 2005; Sabunciyani et al., 2007; Fuke et al., 2008; Shao et al., 2008*).

### Trastorn bipolar

En relació amb el trastorn bipolar, un estudi en mostres sanguínies de 35 pacients va trobar la deleció comuna en 2 pacients i en cap dels 29 controls (Kato i Takahashi, 1996). Un altre estudi fet amb els mateixos individus, però amb mostra de còrtex prefrontal, va trobar més presència de deleció comuna en els 7 pacients que en els 9 controls (Kato et al., 1997). S'han trobat resultats similars en un altre estudi amb teixit de còrtex prefrontal (Shao et al., 2008) que incloïa 12 individus amb la malaltia. Tanmateix, hi ha un gruix significatiu d'altres estudis fets en un nombre similar de pacients, 7, 27, 40 i 49 respectivament, que no han estat capaços d'identificar molècules delecionades d'ADNmt (Stine et al., 1993) ni la deleció comuna (Kakiuchi et al., 2005; Sabunciyani et al., 2007; Fuke et al., 2008).

### Depressió major

Pel que fa a la depressió major, un estudi en mostres de múscul de 28 pacients va detectar gran presència de deleccions en l'ADNmt quan el comparaven amb els individus control (Gardner et al., 2003), però no s'han trobat resultats similars en teixit cerebral en estudis fets en 15 individus amb la malaltia (Sabunciyani et al., 2007; Shao et al., 2008).

Malgrat s'han fet nombrosos estudis, és difícil extreure'n alguna conclusió, ja que la metodologia emprada és molt diversa i la comparació entre treballs és complicada. Tanmateix, la divergència en els estudis fa pensar que hi poden haver hagut errors tècnics en algunes de les metodologies emprades i que caldria establir tècniques validades que incloguin controls positius i negatius per als futurs estudis.

### **3.5.3. Contingut d'ADNmt**

L'anàlisi del contingut d'ADNmt fa referència a la quantificació del nombre de còpies d'ADNmt per cada cèl·lula del teixit que s'està analitzant i, generalment, a la posterior comparació entre individus sans i malalts. En la bibliografia, es parla tant de contingut d'ADNmt (en anglès, *mtDNA content*) com de nombre de còpies. En aquest cas, però, en anglès es parla de *copy number variant*, i aquesta terminologia es pot confondre amb les CNV nuclears, per la qual cosa és més apropiat parlar de contingut. Dos estudis han analitzat el contingut d'ADNmt en teixit de còrtex prefrontal en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major sense trobar cap resultat concloent (Kakiuchi et al., 2005; Varwter et al., 2006). Tanmateix, és important destacar un estudi que avaluava 142 pacients geriàtriques amb depressió major, en el que es va detectar un contingut d'ADNmt

significativament reduït en leucòcits de les pacients en comparació amb les individus sanes (Kim et al., 2011). Aquest estudi segueix uns passos metodològics clars i ben definits i el nombre de mostres és relativament gran, per tant, es tracta d'un resultat sòlid de la implicació del contingut d'ADNmt en la depressió major. Recentment, s'ha avaluat el contingut mitocondrial a partir de mostra sanguínia de 23 pacients amb trastorn bipolar i 24 controls i no s'ha observat

cap diferència significativa quant a nombre de còpies de l'ADNmt entre els grups (Sousa et al., 2013).

Els estudis que analitzen el contingut d'ADNmt són escassos, i els resultats que s'han reportat no permeten afirmar si el nombre de còpies de genoma mitocondrial té rellevància en el risc de patir algun d'aquests trastorns.

### 3.6. Alteracions en l'expressió gènica relacionada amb el funcionament mitocondrial

---

La majoria d'estudis que han analitzat l'expressió de gens que estan relacionats amb el funcionament mitocondrial han avaluat gens nuclears que codifiquen per proteïnes que es troben en el mitocondri. La majoria són estudis de bioxips d'ADN (en anglès, *microarray*) que permeten analitzar l'expressió gènica de diversos gens alhora, de manera ràpida i amb poca quantitat de mostra. Pocs estudis s'han centrat a analitzar, específicament, els nivells d'expressió dels transcrits provinents de l'ADNmt. La majoria dels estudis d'expressió han estat fets a partir de teixit cerebral *post mortem*, tot i que també n'hi ha que s'han fet a partir de cèl·lules sanguínies.

#### 3.6.1. Gens codificats en l'ADNn

##### Esquizofrènia

La majoria d'estudis d'expressió fets en teixit cerebral *post mortem* en esquizofrènia han trobat alteracions significatives en els patrons d'expressió de runes relacionades amb el funcionament mitocondrial. Per exemple, s'ha descrit un patró d'expressió alterat dels gens relacionats amb la llançadora malat aspartat mitocondrial i el cicle de Krebs (Middleton et al., 2002), i un estudi posterior va trobar una disminució de l'expressió dels gens relacionats amb la cadena transportadora d'electrons (Iwamoto et al., 2005).

Un altre estudi va trobar que, en còrtex prefrontal, els nivells d'ARNm corresponents a les proteïnes del complex I eren menors en pacients d'esquizofrènia que en controls (*Karry et al., 2004*) i, més específicament, es va detectar una disminució en l'expressió de tres subunitats del complex I codificades al genoma nuclear en còrtex prefrontal (*Ben-Shachar i Karry, 2008*). Hi ha un altre estudi dut a terme en teixit cerebral que ha mostrat una reducció en l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme oxidatiu mitocondrial (*Altar et al., 2005*). D'altra banda, en estudis en mostra sanguínia, es va trobar increment de l'expressió d'una subunitat del complex I codificada en el genoma nuclear en pacients d'esquizofrènia en comparació amb els controls (*Mehler-Wex et al., 2006; Taurines et al., 2010*). Malgrat aquests resultats positius, hi ha altres estudis que no han pogut aportar evidències d'una alteració en el patró d'expressió relacionada amb la funció mitocondrial (*Konradi et al., 2004; Munakata et al., 2005; Washizuka et al., 2009*).

### Trastorn bipolar

Els resultats relacionats amb el trastorn bipolar són similars als observats en esquizofrènia i alguns són producte dels mateixos treballs. Alguns estudis troben diferències en el patró d'expressió relacionada amb el funcionament mitocondrial en mos-

tra de teixit cerebral, per exemple una disminució de l'expressió de totes les proteïnes mitocondrials codificades al genoma nuclear (*Konradi et al., 2004*) i, més concretament, una disminució en l'expressió dels gens relacionats amb la cadena transportadora d'electrons (*Iwamoto et al., 2005; Sun et al., 2006*). Un altre estudi va trobar una alteració en l'expressió de tres subunitats del complex I codificades al genoma nuclear en teixit cerebral (*Ben-Shachar i Karry, 2008*) i una alteració de l'expressió d'una d'aquestes subunitats en línies limfoblàstoides procedents de pacients amb trastorn bipolar (*Washizuka et al., 2009*). Tanmateix, hi ha altres estudis que no han trobat cap diferència en el patró d'expressió gènica relacionada amb la funcionalitat mitocondrial (*Altar et al., 2005; Munakata et al., 2005; Vawter et al., 2006*).

### Depressió major

En el trastorn depressiu major s'han dut a terme menys estudis de comparació de patrons d'expressió. Dos estudis descriuen una alteració de l'expressió dels gens que codifiquen per les proteïnes que formen el complex I (*Karry et al., 2004; Ben-Shachar i Karry, 2008*) i d'altres no han trobat cap canvi destacable en el patró d'expressió en teixit cerebral (*Whatley et al., 1996; Altar et al., 2005; Munakata et al., 2005; Vawter et al., 2006*).

### 3.6.2. Gens codificats en l'ADNmt

En relació amb l'esquizofrènia, hi ha pocs estudis que troben alteració en el patró d'expressió d'aquests gens en còrtex prefrontal, tot i que les metodologies són molt diverses i els estudis són difícils de comparar entre si. Un d'aquests, fets en l'època dels anys noranta, va trobar alterada l'expressió dels gens MT-RNR1, MT-RNR2 i MT-CO2 (Mulcrone et al., 1995), i un any més tard es van reportar alteracions en l'expressió dels mateixos gens ribosòmics (Whatley et al., 1996).

Hi ha un altre estudi que va comparar l'expressió dels gens MT-ATP6, MT-CO1, MT-ND1, MT-ND2 i MT-ND3 entre pacients amb trastorn bipolar i controls i entre pacients amb depressió major i controls, en còrtex dorsolateral prefrontal i en còrtex cingulat anterior. Van trobar que els individus amb trastorn bipolar mostraven menys expressió de MT-ATP6 i MT-CO1 que els controls mentre que els pacients amb depressió major presentaven menys expressió de MT-ATP6 que els individus sans (Vawter et al., 2006).

Un quart estudi més recent que avaluava l'expressió de tots els gens mitocondrials codificats en l'ADNmt en còrtex dorsolateral prefrontal d'individus amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major, en comparació amb individus sans, va trobar un descens significatiu de l'expressió en pacients d'esquizofrènia i de depressió major en comparació amb els controls, però no en trastorn bipolar (Shao et al., 2008).

Malgrat que hi ha pocs estudis duts a terme, i els resultats no són del tot consistents, aquests suggereixen que el perfil d'expressió gènica observada en teixit cerebral podria estar relacionat amb la disfunció mitocondrial present en els tres trastorns. Quant a l'expressió gènica de tots els gens codificats a l'ADNmt, remarcar que només hi ha reportat un únic estudi i que analitza una única regió cerebral (Shao et al., 2008).

### 3.7. Conclusió global

---

Hi ha múltiples línies d'evidències que sostenen la hipòtesi de la implicació de la disfunció mitocondrial i de la genètica mitocondrial en el trastorn mental greu. En els darrers deu anys, aquestes evidències s'han recollit en diverses revisions bibliogràfiques d'investigadors d'arreu del món (*Andreazza, 2012; Anglin et al., 2012b; Manji et al., 2012; Scaglia, 2010; Verge et al., 2011*). Totes han fet palès que el mitocondri pot tenir un paper important en l'etiologia del trastorn mental greu però, també, totes han conclòs que calen estudis addicionals i metodològicament rigorosos per a assolir conclusions definitives. Aquesta tesi presenta dos treballs amb l'objectiu d'engruixir el conjunt de dades sobre la implicació de l'ADNmt en el trastorn mental greu.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

# *Hipòtesis i Objectius*

---

## *hipòtesis*

Com s'ha descrit en la introducció, hi ha diverses evidències de disfunció mitocondrial i d'una possible implicació de l'ADNmt en el trastorn mental greu. Aquestes evidències es poden resumir en: alteració de l'estructura i funció dels mitocondris, presència d'herència materna i comorbiditat entre malaltia mitocondrial i els trastorns mentals d'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major. Aquestes evidències i el paper cabdal de l'ADNmt per al correcte funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial en el cervell condueixen a plantejar dues hipòtesis:

- 1) La disfunció mitocondrial observada en l'esquizofrènia, el trastorn bipolar i la depressió major pot ser explicada per la presència de delecions en l'ADNmt, el nombre de còpies d'aquest, i/o el nivell d'expressió dels seus transcrits.
- 2) Variacions en la seqüència de l'ADNmt poden explicar l'herència materna observada en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major i poden contribuir al risc de patir un trastorn mental greu i a l'expressió clínica d'aquest.

## *objectius*

Els objectius proposats per contrastar aquestes hipòtesis són:

- 1) Determinar els gens de referència idonis per emprar-los en estudis d'expressió gènica en teixit cerebral post mortem, i establir les característiques associades a la mostra que cal tenir en compte en aquests estudis.
  
- 2) Comparar el nivell d'expressió gènica dels transcrits mitocondrials, el contingut d'ADNmt i la presència de delecions en aquest en mostres de teixit cerebral post mortem, entre individus amb un trastorn mental greu (esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major) i individus control.
  
- 3) Analitzar la seqüència sencera de l'ADNmt de pacients amb aparent herència materna de l'esquizofrènia per cercar:
  - a. Variants patogèniques.
  - b. Variants associades a la malaltia, fent un estudi d'associació de casos i controls.
  - c. Variants associades a:
    - i. Les característiques psicopatològiques i neuropsicològiques dels pacients.
    - ii. La funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

# *Resultats*

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

## *Resultats*

Aquesta secció resumeix els resultats dels articles científics que s'han publicat a partir de la recerca duta a terme durant el període d'investigació predoctoral. El primer bloc dels resultats fa referència a la primera hipòtesi, que relaciona la disfunció mitocondrial observada en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major amb la possible alteració de l'ADNmt en teixit cerebral *post mortem*. S'ha analitzat el nivell d'expressió dels transcrits mitocondrials, el nombre de còpies d'ADNmt i la presència de delecions en individus amb aquestes malalties en comparació amb individus sense malaltia mental. En aquesta anàlisi, vam considerar necessari establir uns criteris metodològics per a quan es treballa amb ARN extret a partir de cervell i per a la tècnica de la PCR quantitativa amb pas previ de retrotranscripció de l'ARN (RT-qPCR, de l'anglès, *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*). Aquests criteris havien de garantir fiabilitat a l'hora d'obtenir els resultats. L'últim bloc dels resultats se centra en la segona hipòtesi, ja que se cerquen variants en la seqüència de l'ADNmt presents en cèl·lules sanguínies de pacients d'esquizofrènia, que, per una banda, puguin explicar l'herència materna observada en aquesta malaltia i, per l'altra, puguin ser-ne factors de risc i/o contribuir a la seva expressió fenotípica.



## Tècnica RT-qPCR i bioespècimens

Previ a l'estudi del perfil genètic de l'ADNmt en cervell, es van fer una sèrie d'anàlisis per detectar els gens de referència més idonis per a dur a terme l'anàlisi d'expressió gènica de l'ADNmt, així com establir quines característiques intrínseques dels bioespècimens de teixit cerebral s'havien de tenir en compte per a aquesta anàlisi. Els principals resultats, recollits en Nerea Abasolo, Helena Torrell et al., *Journal of Psychiatric Research* 2011; 45(11):1411-18, van ser:

1) En les mostres analitzades, els gens GAPDH, RPS17, RPL30, RPLP0 i TFRC són els millors gens de referència d'una sèrie de 32 gens candidats analitzats. La idoneïtat d'aquests gens es basa en el fet que la seva expressió és poc variable en teixit cerebral *post mortem* d'individus amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major, i en teixit cerebral d'individus sense malaltia mental, segons els algorismes de predicció GeNorm i NormFinder

2) La qualitat de l'ARN extret d'aquestes mostres de teixit cerebral correlaciona amb els valors d'expressió gènica i, per tant, s'ha d'incorporar com a variable de confusió a l'hora d'analitzar els resultats d'expressió gènica.

## Perfil genètic de l'ADNmt en trastorn mental greu

---

L'estudi del perfil genètic de l'ADNmt en teixit cerebral *post mortem* de pacients amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major va incloure l'anàlisi dels nivells d'expressió dels transcrits mitocondrials, del nombre de còpies d'ADNmt i de la presència de delecions en aquesta molècula i la comparació d'aquest perfil amb el d'individus sense malaltia mental.

Aquesta anàlisi i comparació es va dur a terme en mostres de teixit cerebral *post mortem* de 15 individus amb esquizofrènia, 15 individus amb trastorn bipolar, 15 individus amb depressió major i 15 individus sense malaltia mental; i es van iniciar un cop establerts els gens de referència idonis per a l'estudi d'expressió (*Abasolo et al., 2011*). Els principals resultats, recollits en Helena Torrell, Elena Montaña et al., *Am J Med Genet Part B* 2013; 162B:213–223, van ser:

- 1) Els individus amb trastorn bipolar tenen uns nivells d'expressió del gen MT-ND1 significativament més elevats que els individus control.
- 2) Els pacients amb esquizofrènia i els pacients amb depressió major presenten un patró d'expressió dels gens mitocondrials similar entre ells i diferent del que presenten els pacients amb trastorn bipolar. Tanmateix, no es van identificar diferències estadísticament significatives.
- 3) No s'han apreciat diferències estadísticament significatives en el contingut d'ADNmt entre individus amb diferent malaltia ni entre cada grup diagnòstic i el grup de controls.
- 4) Els pacients amb esquizofrènia i els pacients amb depressió major mostren una tendència a tenir més proporció d'ADNmt delecionat que els individus amb trastorn bipolar i que els controls.

## Variacions de la seqüència de l'ADNmt en esquizofrènia

Per a aquest estudi, es va seqüenciar l'ADNmt complet de 14 pacients amb diagnòstic d'esquizofrènia i aparent herència de la malaltia amb l'objectiu de detectar: 1) variacions de l'ADNmt que poguessin ser causants de la malaltia, o 2) variants que poguéssim detectar associades a la malaltia en un estudi de casos i controls. Els resultats, recollits en Helena Torrell, Antonio Salas et al., 2014 (en revisió), van ser:

1) No es va identificar cap variant nova ni cap variant patogènica coneguda en la seqüència de l'ADNmt dels 14 pacients d'esquizofrènia amb aparent herència materna.

De les variants identificades a partir de la comparació amb la seqüència de referència, se'n van seleccionar 23 que, posteriorment, es van analitzar en un estudi d'associació amb 495 pacients d'esquizofrènia i 615 controls. Dues variants van resultar significativament associades a la malaltia i, més tard, es va analitzar si tenien alguna implicació amb l'expressió clínica de la malaltia o amb la funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial. Així doncs:

2) Les variants 9.110T>C p.Ile195Thr i 1.811A>G van resultar significativament més freqüents en els individus amb diagnòstic d'esquizofrènia que en el grup d'individus control.

3) No hem identificat cap relació entre la variant MT-RNR2 1.811A>G i les característiques psicopatològiques o neuropsicològiques dels pacients amb diagnòstic d'esquizofrènia.

4) No hem identificat cap relació entre la variant MT-ATP6 9.110T>C p.Ile195Thr i la funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial.

## *RT-qPCR study on post-mortem brain samples from patients with major psychiatric disorders: Reference genes and specimen characteristics*

*Nerea Abasolo, Helena Torrell, Bàrbara Roig, Sílvia Moyano, Elisabet Vilella i Lourdes Martorell*

*Journal of Psychiatric Research, 2011*

Els estudis d'expressió gènica en teixit cerebral *post mortem* obtingut de pacients que presentaven un trastorn mental han aportat i aporten informació rellevant per desxifrar l'etiologia i l'expressió fenotípica de les malalties psiquiàtriques. Tanmateix, hi ha dificultats a l'hora de treure conclusions dels resultats publicats, ja que la metodologia varia entre estudis, i en alguns casos, o bé hi ha hagut errors metodològics que han conduït a falsos positius o no s'han descrit els passos metodològics perquè altres investigadors hagin pogut repetir les anàlisis i confirmar els resultats.

La manca d'informació tècnica essencial en els estudis de RT-qPCR és ben coneguda i reclamada per la comunitat d'investigadors (*Bustin et al., 2010*). En aquest article es posa de manifest la importància d'establir els gens de referència adequats per a cada tipus de mostra i la importància de definir quines

característiques pròpies del bioespècimen influeixen en els resultats d'expressió gènica a fi d'evitar, al màxim, mancances metodològiques.

La tècnica de l'RT-qPCR ha estat fins ara una de les millors opcions a l'hora de mesurar els nivells d'expressió dels gens. Aquesta tècnica parteix de l'extracció d'ARNm total d'una mostra, continua amb la conversió d'aquest ARNm a ADN complementari (ADNc) i finalitza amb l'amplificació de l'ADNc corresponent als gens diana. Aquesta amplificació va lligada a un increment de fluorescència que detecten equips amb capacitat d'excitació i de detecció de llum i que es converteix en una dada numèrica anomenada Cq (de l'anglès, *quantitative cycle*). Si bé es pot fer el que es coneix com a quantificació absoluta, generalment el que es practica és una quantificació relativa.

La quantificació absoluta consisteix a determinar el nombre de còpies d'ADNc d'un determinat gen a partir de la realització d'una corba estàndard.

En canvi, la quantificació relativa consisteix a conèixer el nombre de còpies d'un determinat gen respecte d'un altre. El gen que ens interessa s'acostuma a dir gen diana i el gen que s'utilitza per a la comparació s'anomena gen de referència o gen constitutiu. Els gens de referència se seleccionen perquè la seva expressió no varia en el teixit que s'analitza i no varia entre els diferents grups d'anàlisi, en el nostre cas entre pacients i controls. En la quantificació relativa s'analitzen els dos gens a la vegada i el que es fa és normalitzar la Cq del gen diana amb la del/dels gen/gens de referència.

Per tant, per assegurar la fiabilitat dels resultats, cal determinar quins són aquests gens que mantenen una expressió estable en la mostra en la qual es vol dur a terme l'estudi d'expressió. Així doncs, vam dissenyar un experiment amb les mostres que disposàvem de teixit de còrtex occipital de 15 individus amb esquizofrènia, 15 individus amb trastorn bipolar, 15 individus amb depressió major i 15 individus sense malaltia mental (cedides pel Neuropathology Consortium of the Stanley Brain Collection, Torrey et al., 2000) per tal de cercar els gens més estables

d'entre un conjunt de 32 gens candidats. Mitjançant la retrotranscripció i amplificació (RT-qPCR) d'aquests gens en individus seleccionats a l'atzar de cadascun dels grups diagnòstics, i mitjançant dos algorismes d'estabilitat prèviament descrits, el GeNorm i el NormFinder, vam determinar que els gens de referència idonis per a aquesta mostra eren GAPDH, RPS17, RPL30, RPLP0 i TFRC.

D'altra banda, i en relació amb l'objectiu d'assegurar la fiabilitat dels resultats, vam reavaluar l'expressió d'aquests gens en cadascuna de les 60 mostres i els algorismes de predicció van confirmar l'estabilitat dels gens seleccionats com a gens de referència. A més, també era important conèixer si hi havia correlació entre els nivells d'expressió obtinguts i les variables intrínseques de la mostra: el pH del teixit, la qualitat de l'ARNm extret, l'interval *post mortem*, l'hemisferi d'extracció, la massa cerebral i la medicació, entre d'altres.

De totes aquestes variables, va resultar que el pH del teixit i la qualitat de l'ARNm de la mostra, expressada amb l'índex RQI (de l'anglès, *RNA quality indicator*), correlacionaven positivament i significativa amb els nivells d'expressió dels gens. També vam veure que el pH correlacionava amb la qualitat de l'ARNm i, per tant, vam escollir la qualitat de l'AR-

Nm com la variable que s'havia de tenir en compte a l'hora de dur a terme estudis les anàlisis estadístiques dels estudis d'expressió gènica, entenent que l'efecte del pH quedava inclòs en aquesta variable.

Les conclusions d'aquest estudi van ser:

En aquest conjunt de mostres de còrtex occipital de pacients amb esquizofrènia, trastorn bipolar, depressió major i d'individus sense malaltia mental cedides per la Fundació Stanley, els gens de referència més idonis per utilitzar en la quantificació relativa de l'expressió gènica són GAPDH, RPS17, RPL30, RPLP0 i TFRC. A més, en aquesta col·lecció, cal tenir en compte la qualitat de l'ARNm, expressada amb la variable numèrica RQI, com a variable de confusió en l'anàlisi estadística de l'expressió gènica.

## *Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion*

*Helena Torrell, Elena Montaña, Nerea Abasolo, Bàrbara Roig, Ana M. Gaviria,*

*Elisabet Vilella i Lourdes Martorell*

*American Journal of Medical Genetics part B: Neuropsychiatric Genetics, 2013*

En aquest article, es parteix de la hipòtesi que el perfil genètic de l'ADNmt es troba alterat en teixit cerebral *post mortem* de pacients d'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major quan es compara amb el d'individus sense malaltia mental.

Per contrastar aquesta hipòtesi, es van determinar els nivells d'expressió gènica de cadascun dels gens codificats en l'ADNmt, el nombre de còpies de genoma mitocondrial per cèl·lula (anomenat contingut d'ADNmt) i la presència de delecions en l'ADNmt en mostres de teixit cerebral *post mortem* de 15 pacients amb diagnòstic d'esquizofrènia, 15 amb trastorn bipolar, 15 amb depressió major i 15 individus control.

Per a la determinació dels tres factors genètics, es va emprar la tècnica de la qPCR i l'RT-qPCR. Per a l'avaluació del contingut d'ADNmt, es va determinar el nombre de còpies de tres gens de l'ADNmt i el d'un gen codificat en l'ADNn, el gen RPPH1 corresponent a la ribonucleasa P, del qual es coneix que hi ha una única còpia al genoma i, per tant, dues còpies per cèl·lula. Els tres gens mitocondrials escollits van ser: l'MT-7S (ubicat al D-loop), pel seu paper regulador de la replicació i transcripció de l'ADNmt; l'MT-ND1, per trobar-se en una regió del genoma amb poques probabilitats de ser delecionada, i l'MT-ND4, per trobar-se a l'arc major de l'ADNmt, lloc en el qual es produeixen el 95% de les delecions descrites de l'ADNmt (He et al., 2000). Amb l'objectiu d'avaluar la presència de dele-

cions, es va calcular la proporció entre el contingut d'MT-ND1 i el d'MT-ND4. Si aquesta proporció resultava superior a 1, s'establí que en haver-hi més MT-ND1 que MT-ND4, hi havia una deleció de l'ADNmt. Per a l'anàlisi d'expressió gènica, es van determinar els nivells d'ARNm dels 13 gens de l'ADNmt que codifiquen per proteïna, els nivells d'ARN de la regió 7S del D-loop (MT-7S) i els dels dos gens corresponents als ARNr. Com a gens de referència, es van utilitzar GAPDH, RPL30, RPLP0 i RPS17, atès que eren els millors gens de referència, descrits en *Abasolo et al., 2011*, i els valors de quantificació relativa dels gens mitocondrials es van expressar respecte de la mitjana geomètrica d'aquests quatre gens de referència.

La principal diferència observada va ser que els individus amb trastorn bipolar van mostrar uns nivells d'expressió del gen MT-ND1 significativament superiors als nivells dels individus control; però aquest increment no es va veure reflectit en un augment dels nivells de proteïna quantificats amb la tècnica del Western Blot. Tot i que no es van observar diferències significatives en els nivells d'expressió entre els diferents grups diagnòstics, sí que es va apreciar que els nivells d'expressió dels individus d'esquizofrènia i dels de depressió major seguien un patró similar entre si i diferent dels pacients de trastorn bipolar i

dels individus control. No es van trobar diferències significatives entre grups quant al contingut d'ADNmt, ni tampoc quant a la presència de delecions. Tanmateix, el grup d'individus amb esquizofrènia i depressió major va mostrar més freqüència de delecions que no pas el grup d'individus amb trastorn bipolar i el grup control, malgrat que, el fet de tenir aquest gen delecionat, no correlacionava amb la seva expressió gènica.

#### Les conclusions d'aquest estudi van ser:

En aquesta col·lecció de mostres, els pacients amb trastorn bipolar presenten nivells d'expressió del gen MT-ND1 més alts que els individus control. No es van trobar altres diferències relacionades amb l'ADNmt en aquesta mostra de còrtex occipital de pacients d'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major en comparació amb els individus control. Si més no, es van observar algunes tendències que es podrien convertir en canvis significatius si s'ampliés la mida mostral. Així doncs, la implicació de l'ADNmt no es pot descartar en aquestes malalties sense fer un estudi amb més individus i analitzar altres regions cerebrals.



## *Mitochondrial DNA (mtDNA) variants do not play a major role in schizophrenia*

*Helena Torrell, Antonio Salas, Nerea Abasolo, Constanza Morén, Glòria Garrabou,  
Joaquín Valero, Yolanda Alonso, Elisabet Vilella, Javier Costas i Lourdes Martorell  
En revisió a American Journal of Medical Genetics part B*

Aquest article presenta els resultats de l'anàlisi de l'ADNmt en pacients d'esquizofrènia. L'objectiu era cercar variants genètiques, localitzades en l'ADNmt d'individus amb aparent herència materna de l'esquizofrènia, que 1) poguessin ser patogèniques, 2) estiguessin associades a la malaltia en un estudi de casos i controls posterior i 3) estiguessin associades a les característiques psicopatològiques o neuropsicològiques dels pacients i/o a la funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial.

Amb la tècnica de seqüenciació automàtica de Sanger, es va obtenir la seqüència consens de l'ADNmt de 14 pacients d'esquizofrènia amb aparent herència materna de la malaltia; és a dir, les seves mares també presentaven un diagnòstic d'esquizofrènia segons els criteris DSM-IV. Aquest estudi, a diferència dels anteriors, es va dur a terme a partir ADN provinent de cèl·lules sanguínies, i no de teixit cerebral *post mortem*. La seqüència consens d'ADNmt obtinguda

de cada pacient es va comparar amb la seqüència de referència rCRS. Les variants que s'hi van detectar es van explorar en la base de dades MITOMAP per conèixer si ja estaven descrites i quina n'era la freqüència i la possible patogenicitat. No es va detectar cap variant nova que pogués haver estat heretada de la mare i, *a priori*, pogués tenir un efecte patogènic en el desenvolupament de la malaltia. De les variants detectades, se'n van seleccionar 23 per ser analitzades en un estudi d'associació de casos i controls amb 495 pacients d'esquizofrènia i 615 individus control. Es van seleccionar variants que originaven un canvi d'aminoàcid en les proteïnes codificades, variants presents en els dos ARNr i variants presents en quatre ARNt. L'anàlisi estadística va identificar que dues de les 23 variants eren significativament més freqüents en pacients que en controls: la variant 1.811A>G, present en la subunitat 16S de l'ARNr mitocondrial, i la variant 9.110T>C, present en la proteïna ATP6 del complex ATP sintasa i que com-

porta un canvi d'aminoàcid de isoleucina a treonina. Posteriorment, vam voler conèixer si aquestes variants tenien algun tipus de relació amb les característiques clíniques de l'esquizofrènia i amb la funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial. La variant 1.811A>G, que presentava una freqüència del 13,4% en el grup de pacients i del 8,3% en controls ( $\chi^2 = 7.404$  ( $p = 0.007$ ); OR = 1.7, IC (1.2 - 2.5)), es va analitzar per conèixer si estava relacionada amb l'expressió fenotípica de la malaltia, tant psicopatològicament com neuropsicològica. Així, es va analitzar si els pacients que presentaven la variant de risc i els que presentaven la variant de referència diferien quant a 1) la puntuació de l'escala de símptomes positius, negatius i generals de l'esquizofrènia (PANSS) i 2) la puntuació de diversos tests que avaluen funcions neuropsicològiques. El resultat va ser que la presència de la variant de risc no comportava diferències significatives en les diverses puntuacions analitzades.

La variant 9.110T>C, que es va identificar en 5 pacients, però en cap dels 615 individus control, es va analitzar per conèixer si estava implicada en la funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial, concretament en la capacitat de consumir oxigen i en l'activitat enzimàtica de l'ATP sintasa. Les mesures es van fer en limfòcits de quatre dels pacients

amb la variant de risc 9.110C, i es van comparar amb 4 pacients amb la variant de referència 9.110T, de la mateixa edat, sexe i medicació. També es van analitzar 13 individus sans sense antecedents personals o familiars de malaltia mental que presentaven la variant de referència. No es van trobar diferències significatives en cap dels dos aspectes valorats. Sí que es va identificar que els pacients d'esquizofrènia, independentment que fossin portadors o no de la variant de risc 9.110C, presentaven uns valors que tendien a ser inferiors que els dels individus control, tant en la capacitat de consumir oxigen de la cadena respiratòria mitocondrial com en l'activitat enzimàtica de l'ATP sintasa.

#### Les conclusions d'aquests resultats van ser:

No es va identificar cap variant patogènica en els individus amb aparent herència materna de l'esquizofrènia. Malgrat es van identificar dues variants presents amb més freqüència en pacients que en controls en l'estudi d'associació, aquestes no es van poder relacionar amb les característiques psicopatològiques o neuropsicològiques dels pacients ni amb el funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial. Per tant, el nostre estudi no ha identificat que variants en la seqüència de l'ADNmt puguin tenir un paper rellevant en el desenvolupament de l'esquizofrènia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

# *Discussió*

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

## *Discussió*

La implicació de l'ADNmt en l'etiologia dels trastorns mentals greus en general, i de l'esquizofrènia en particular, ha estat àmpliament proposada. Tanmateix, hi ha pocs estudis que hagin avaluat el paper d'aquesta molècula des de diferents aproximacions i, en alguns casos, els diversos resultats publicats són difícils de comparar entre si a causa de mancances metodològiques.

La present tesi aporta més dades a la literatura científica per valorar la possible implicació de l'ADNmt en aquests trastorns mentals.

## Tècnica RT-qPCR i bioespècimens

---

La tècnica de l'RT-qPCR és una de les més emprades per quantificar els nivells d'expressió, ja que és específica i precisa (*Vandesompele et al., 2002*). Tanmateix, no hi ha prou consens quant a la seva utilització en els diversos estudis publicats, i això dificulta la interpretació dels resultats i poder extreure'n conclusions, malgrat que la importància d'emprar una metodologia rigorosa hagi estat extensament publicada (*Bustin et al., 2010*).

El primer objectiu d'aquest estudi va ser determinar els gens de referència més idonis per a estudis d'expressió gènica en teixit de còrtex occipital d'individus amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major en comparació amb individus control. Els gens identificats com més estables van ser GAPDH, RPS17, RPL30, RPLP0 i TFRC; i aquests resultats estaven en parcial concordança amb els reportats per dos estudis similars, però d'una altra regió cerebral (*Silberberg et al., 2009; Weickert et al., 2010*). Del contrast d'aquests dos estudis amb el nostre, en vam poder concloure que els gens de referència més estables per utilitzar en estudis d'expressió gènica en teixit cerebral d'individus amb esquizofrènia, en comparació amb individus controls, eren TFRC, RPLP0 i GAPDH.

El segon objectiu va ser detectar aquelles característiques pròpies de la mostra que podrien influir en els resultats. D'entre les diverses característiques dels bioespècimens que vam explorar, la qualitat de l'ARNm, mesurada amb l'RQI, i el pH van resultar, significativament, associats als nivells d'expressió. Vam comprovar que el pH del bioespècimen correlacionava amb la qualitat de l'ARNm, atribuint al pH la responsabilitat d'aquests canvis en l'expressió, tal com s'ha descrit anteriorment (*Tomita et al., 2004; Mexal et al., 2006; Chevyreva et al., 2008*). Nosaltres vam comprovar que la relació entre els nivells d'expressió i l'RQI era més forta que amb el pH, convertint aquest índex de qualitat en una variable que s'havia de tenir en compte en els posteriors estudis d'expressió gènica. Previ a aquest treball, un estudi va descriure que hi havia associació entre els nivells d'expressió gènica i l'interval de temps entre la mort del donant i la conservació de l'espècimen (*Birdsill et al., 2010*), però en les mostres analitzades en aquest estudi no hem identificat aquesta relació.

## Perfil genètic de l'ADNmt en trastorn mental greu

A causa d'alteracions en la cadena respiratòria mitocondrial, en el metabolisme oxidatiu i en la morfologia mitocondrial observades en teixit cerebral de pacients amb esquizofrènia, trastorn bipolar o depressió major (*Scaglia, 2010*), les alteracions genètiques mitocondrials podrien ser una característica comuna que contribuiria al risc de patir aquests trastorns psiquiàtrics.

D'altra banda, la majoria de les alteracions de les malalties mitocondrials que afecten el sistema nerviós central es troben en la substància blanca del cervell, i alteracions en la substància blanca també s'han observat en aquestes patologies psiquiàtriques (*Regenold et al., 2007; Bartzokis, 2011*).

En aquest sentit, un dèficit en la cadena respiratòria o la presència continuada d'estrès oxidatiu podrien conduir a aquesta pèrdua de substància blanca, motivada per mort neuronal i pel reemplaçament d'aquestes neurones per cèl·lules glials (*Finsterer i Mahjoub, 2012*). Aquest paral·lisme suggereix que la funció mitocondrial podria estar implicada en aquestes alteracions, i que la causa podria raure en l'ADNmt.

Amb aquestes premisses com a base, s'ha contrastat la hipòtesi que el contingut d'ADNmt, la presència de delecions i l'expressió dels seus transcrits en teixit de còrtex occipital ric en substància blanca de pacients d'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major presenten un perfil diferent del que presenten els individus sans. Els resultats obtinguts no permeten concloure, fermament, que l'ADNmt està implicat en l'etiologia de l'esquizofrènia, el trastorn bipolar i la depressió major, però sí que mostren una tendència d'alteració del perfil genètic de l'ADNmt que fa palesa la necessitat de fer més estudis amb mida mostral més gran i en altres regions cerebrals.

### Expressió gènica dels transcrits mitocondrials

Pel que fa a l'anàlisi de l'expressió gènica dels transcrits de l'ADNmt, val a dir que és un camp d'estudi molt poc explorat. Gairebé no hi ha estudis d'expressió d'aquests transcrits en l'àmbit biomèdic general i encara n'hi ha menys relacionats amb el trastorn mental greu. En el present treball, s'han avaluat els nivells d'expressió gènica en còrtex occipital de pacients amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major en comparació amb individus con-



trol, havent definit prèviament els gens de referència idonis per a aquesta mostra i havent controlat la qualitat de l'ARNm del bioespècimen.

Es reporten resultats metodològicament sòlids que presenten un augment significatiu de l'expressió del gen MT-ND1 en trastorn bipolar. Tanmateix, no vam detectar que els pacients amb trastorn bipolar presentessin nivells més elevats que els individus control de la proteïna ND1 del complex I per a la qual codifica aquest gen.

La tècnica emprada per a aquesta quantificació va ser el Western Blot, però, malgrat que no podem descartar que la relació entre l'expressió d'aquest gen i els nivells de proteïna no sigui proporcional, és una tècnica poc acurada per quantificar nivells de proteïna. Una de les millors tècniques per fer-ho hagués estat l'ELISA, però cap empresa del sector científic n'ha dissenyat un assaig per a aquesta proteïna mitocondrial.

És interessant destacar que els nivells elevats d'expressió del gen MT-ND1 que hem observat en trastorn bipolar estan en sintonia amb altres estudis que han mostrat un augment de l'expressió dels gens codificats en l'ADNn relacionats amb el complex I en cèl·lules sanguínies (Beech *et al.*, 2010). També,

en relació amb el complex I, se n'ha publicat una disminució de l'activitat enzimàtica en còrtex prefrontal d'individus amb trastorn bipolar (Andreazza *et al.*, 2010) i s'aposta perquè aquest mal funcionament del complex I estigui relacionat amb l'estrès oxidatiu observat en aquesta malaltia (Wang, 2007). Per tant, aquest treball aporta una evidència més de l'alteració ja descrita en el complex I dels pacients amb trastorn bipolar.

Quant a l'esquizofrènia i la depressió major, no hem identificat cap alteració en l'expressió gènica dels transcrits mitocondrials en comparació amb els individus control. Aquests resultats són difícils de contrastar amb la literatura científica publicada, ja que només hi ha un altre estudi que ha analitzat tots els transcrits mitocondrials en teixit cerebral, concretament, en còrtex dorsolateral prefrontal (Shao *et al.*, 2008). Aquest estudi presenta un descens generalitzat de l'expressió de tots els transcrits mitocondrials en pacients d'esquizofrènia i depressió major, però no ocorre el mateix en trastorn bipolar quan es compara amb individus control. Cal dir que els gens de referència emprats no són els mateixos que s'han utilitzat en aquest treball i l'anàlisi no ha tingut en compte variables com l'edat, el sexe, el pH o la qualitat de l'ARNm.

Cal destacar, també, que si bé aquest estudi és recent i emprà la tecnologia de l'RT-qPCR, els autors no descriuen, acuradament, els passos metodològics emprats en la quantificació i mesura dels gens mitocondrials, i no consideren una sèrie de criteris i passos metodològics imprescindibles per a la fiabilitat dels resultats (*Bustin et al., 2010*).

De fet, tampoc hem pogut contrastar els nostres resultats amb els d'un estudi del 2006 que va comparar l'expressió dels gens MT-ATP6, MT-CO1, MT-ND1, MT-ND2 i MT-ND3 en teixit cerebral entre pacients amb trastorn bipolar i controls, i entre pacients amb depressió major i controls, ja que, malgrat que aquest estudi va utilitzar l'RT-qPCR, no va emprar gens de referència per normalitzar els valors, ni va controlar les característiques de la mostra (*Varwter et al., 2006*). Aquesta dificultat en la comparació de resultats assenyalava la necessitat d'establir una metodologia rigorosa en la detecció de nivells d'expressió mitjançant la RT-qPCR i la importància de descriure'n els passos seguits (*Bustin et al., 2010*).

D'altra banda, i en referència als resultats de l'estudi, hem observat un patró d'expressió similar entre els pacients d'esquizofrènia i els de depressió major. Aquests resultats suggereixen d'una banda, que al-

guns dels factors que estan implicats en el desenvolupament dels trastorns afectius podrien ser compartits amb els implicats en el desenvolupament de l'esquizofrènia; i d'altra banda també suggereixen que podrien convertir-se en diferències significatives si s'ampliés el nombre de mostres.

### Contingut d'ADNmt

No s'ha pogut detectar un increment o un descens del contingut d'ADNmt en còrtex occipital en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major respecte del que presentaven els individus control. La metodologia que hem utilitzat per quantificar el contingut d'ADNmt, la qPCR, és robusta, atès que s'han tingut en compte els tres factors principals que poden influir en l'obtenció de resultats per aquesta tècnica (*Malik i Czajka, 2013*).

S'han emprat tres gens mitocondrials per a la seva determinació en lloc d'un (la regió MT-7S del *D-loop* i els gens MT-ND1 i MT-ND4), s'ha avaluat l'especificitat de les sondes Taqman i s'ha determinat la quantitat d'ADN necessària per evitar biaixos. Malgrat la robustesa dels resultats, és difícil comparar-los amb la literatura científica, a causa, sobretot, de discrepàncies metodològiques i de descripció poc estricta i coherent dels passos emprats. En concordança amb els nostres resultats, un estudi

dut a terme en còrtex frontal de pacients amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major no va identificar diferències en el contingut d'ADNmt en comparació amb individus sans (*Sabunciyan et al., 2007*). Tanmateix, els resultats són difícils de comparar perquè, tot i que empren el D-loop com a gen mitocondrial, hi ha una incongruència entre el gen nuclear que diuen que utilitzen i els encebadors que descriuen en l'apartat de metodologia.

Prèviament, s'havien reportat resultats similars en còrtex frontal de subjectes amb trastorn bipolar i esquizofrènia per comparació de dos gens mitocondrials (MT-ND1 i MT-ND4) amb un de nuclear (RPPH1) i la tècnica de la qPCR (*Kakiuchi et al., 2005*). El treball de Kakiuchi i col·laboradors és l'únic metodològicament comparable amb el nostre estudi. Aquests investigadors no van trobar diferències en el contingut d'ADNmt entre pacients d'esquizofrènia i trastorn bipolar i els subjectes control.

Sí que van trobar que les pacients dones d'esquizofrènia presentaven més contingut d'ADNmt que les dones control i que en els pacients amb trastorn bipolar, el contingut d'ADNmt correlacionava negativament amb l'edat. Nosaltres no hem obtingut aquestes troballes en la nostra mostra d'estudi. Per últim en teixit cerebral, també s'ha analitzat el con-

tingut d'ADNmt en còrtex cerebel·lós de pacients amb trastorn bipolar i, malgrat que es va trobar una tendència dels pacients a tenir més contingut d'ADNmt que els individus control, aquestes diferències no van resultar ser significatives (*Vawter et al., 2006*). Aquest estudi també va emprar el D-loop com a gen mitocondrial, però un gen nuclear diferent al del nostre estudi. Cal esmentar que és difícil extreure conclusions d'estudis que analitzen regions cerebrals diferents perquè el contingut d'ADNmt podria ser específic de cada regió cerebral.

També és interessant destacar els estudis de contingut d'ADNmt obtingut de cèl·lules sanguínies de pacients amb un trastorn mental greu. Un d'aquests va analitzar el contingut d'ADNmt de 142 pacients geriàtriques amb diagnòstic de depressió major i d'un grup de dones control de la mateixa edat. Per qPCR van determinar el nombre de còpies d'MT-ND1 respecte d'HBB, corresponent al gen nuclear de la beta-globina i van identificar que les pacients presentaven un descens significatiu del contingut d'ADNmt (*Kim et al., 2011*). Aquest estudi és comparable, metodològicament, amb un de fet recentment en pacients amb trastorn bipolar i controls (*Sousa et al., 2013*). En aquest treball, van comparar el contingut d'ADNmt entre individus amb trastorn bipo-

lar i individus control, i entre els mateixos pacients abans i després d'un tractament amb liti. La tècnica emprada va ser també la qPCR, i es va analitzar una regió mitocondrial que comprenia el *D-loop* i el gen *MT-RNR1* en comparació amb el gen nuclear *HBB*. Com a resultat, no es van apreciar diferències en el contingut mitocondrial entre pacients i controls, i tampoc diferències a conseqüència del tractament. Similar al que hem observat en els nostres resultats, també aquells reporten una gran variabilitat en els valors de contingut d'ADNmt.

Sorprenentment, malgrat que aquests dos estudis comparteixen similituds metodològiques (ambdós empen la qPCR, el mateix gen nuclear, ADN obtingut a partir de leucòcits i el càlcul del  $2^{-\Delta Ct}$ ), els valors relatius de nombre de còpies que reporten són molt diferents entre si. Així, Kim i col·laboradors descriuen un contingut d'ADNmt del rang de 90 còpies per cèl·lula, mentre que Sousa i col·laboradors descriuen valors que van de 500 a 1.500, aproximadament. L'única diferència metodològica rau en les tècniques d'obtenció de l'ADN, aspecte ja reportat com a determinant en la mesura de contingut d'ADNmt (*Malik i Czajka, 2013*).

Aquesta disparitat en els valors mostra la importància de seguir uns criteris i passos metodològics acurats,

entre els quals s'inclou determinar el contingut d'ADNmt a partir de més d'un gen mitocondrial, així com la quantitat d'ADN idònia per dur a terme la qPCR.

Cal destacar que, en el moment de redacció d'aquest treball de tesi doctoral, cap grup investigador no ha publicat cap estudi que analitzi el contingut d'ADNmt de cèl·lules sanguínies en relació amb l'esquizofrènia.

### Delecions en l'ADNmt

La presència de delecions en l'ADNmt en el trastorn mental greu s'ha investigat amb més profunditat que els altres aspectes genètics relacionats amb aquesta molècula. En aquest treball no es reporten diferències significatives quant a la presència de delecions dels pacients d'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major en comparació amb els individus sans. Aquests resultats estan en concordança amb dos estudis publicats: l'un s'ha fet en còrtex cerebral d'individus amb esquizofrènia i trastorn bipolar (*Kakiuchi et al., 2005*) i l'altre, en còrtex frontal d'individus amb esquizofrènia i trastorn bipolar (*Fuke et al., 2008*), però no està en concordança amb un altre estudi que sí que ha descrit més presència de delecions en diverses regions cerebrals de pacients d'esquizofrènia i depressió major (*Sequeira et al., 2012*).

Aquestes discrepàncies podrien atribuir-se a dues causes. La primera és la diferència en la regió cerebral analitzada, ja que s'ha descrit que la proporció d'ADNmt delecionat varia entre regions cerebrals (Meissner *et al.*, 2008). La segona podrien ser mancances metodològiques que conduïssin a falsos positius o falsos negatius que impedissin comparar els resultats entre diferents treballs. Malgrat que en tots els estudis publicats s'empra la qPCR, el procediment per definir les delecions mitocondrials varien entre si. Mentre que Fuke i col·laboradors i Sequeria i col·laboradors van fer una quantificació absoluta d'aquestes delecions mitjançant una corba estàndard, Kakiuchi i col·laboradors van mesurar el nombre de còpies de dos gens mitocondrials relatives a un gen nuclear, i en van calcular una proporció, tal com hem fet en el present treball de tesi. Així doncs, malgrat que aquestes metodologies permeten comparar grups de casos i de controls en cada estudi individual, no podem assegurar que els resultats es puguin comparar entre diferents estudis.

## Variacions de la seqüència de l'ADNmt en esquizofrènia

---

A causa de l'increment del risc a patir esquizofrènia si es té un familiar de la línia materna afectat amb la malaltia (*revisat a Verge et al., 2011*), l'herència materna observada en l'esquizofrènia es podria explicar per la transmissió de mutacions o variants presents en l'ADNmt provinent de la mare que contribuïssin a desenvolupar la malaltia. En aquest treball, es va seqüenciar tot l'ADNmt de 14 pacients amb aparent herència materna d'esquizofrènia, però no es va trobar cap variant en cap dels subjectes que pogués estar relacionada amb la transmissió de la malaltia.

Malgrat que les evidències en la literatura científica suggereixen que les variants de l'ADNmt poden estar implicades en l'esquizofrènia, el cert és que pocs estudis han tingut èxit en la troballa d'una variant concreta associada al risc de patir la malaltia. Els estudis que sí que han identificat variants no s'han confirmat en estudis posteriors (*Lindholm et al., 1997; Odawara et al., 1998; Gentry i Nimgaonkar, 2000; Kazuno et al., 2005; Martorell et al., 2006; Bamne et al., 2008; Rollins et al., 2009; Ueno et al., 2009; Ichikawa et al., 2012; Sequeira et al., 2012*). A més, alguns d'aquestes estudis reporten variants que en aquell moment no havien estat descrites, però que després s'han identificat en individus sans i han estat incorporades com a va-

riants comunes a la base de dades MITOMAP. En la mateixa línia, els estudis que han cercat una possible associació entre pertànyer a un haplogrup mitocondrial i el risc a patir esquizofrènia no han mostrat resultats concloents que s'hagin confirmat en estudis posteriors (*Amar et al., 2007; Magri et al., 2007; Ueno et al., 2009; McMachon et al., 2000; Mosquera-Miguel et al., 2012*).

Un dels principals motius que pot explicar haver trobat resultats tan diferents en diversos estudis és la presència de mutacions específiques de teixit, perquè és més probable que les mutacions relacionades amb l'esquizofrènia es trobin en el teixit cerebral i no es detectin en cèl·lules sanguínies. Malgrat això, els estudis que han seqüenciat l'ADNmt en teixit cerebral tampoc no han trobat cap mutació associada a la malaltia, tot i que en aquest cas s'ha trobat un percentatge més elevat de substitucions en regions codificants en individus amb la malaltia que en individus sans (*Rollins et al., 2009; Sequeira et al., 2012*).

D'altra banda, aquesta disparitat en els resultats també es podria explicar per mancances i limitacions metodològiques. Alguns d'aquests estudis potser s'enfronten a la presència d'errors de tipus I,

és a dir, de falsos positius, sovint presents en els estudis d'associació (Shen i Carlborg, 2013). Els estudis d'associació amb gran nombre de mostres i de variants requereixen una correcció per múltiples tests (generalment, una correcció de Bonferroni, de permutacions o de simulacions) per evitar la presència de falsos positius.

Tanmateix, l'ús d'aquestes correccions implica una mida de mostra major, ja que es restringeix la detecció de diferències significatives. En contraposició, no disposar de mides de mostra suficients ni de prou capacitat estadística pot conduir a errors de tipus II, és a dir, a passar per alt SNP poc freqüents que sí que tindrien associació amb el risc de desenvolupar algun trastorn mental greu. Una alternativa en els estudis d'ADNmt per augmentar la potència estadística és augmentar el nombre de subjectes en el grup control (Pardo-Seco et al., 2013).

En el present treball, s'han detectat dues variants associades a la malaltia en una mostra que comprenia 495 pacients d'esquizofrènia i 615 controls.

La variant 1.811A>G es troba al gen de l'ARNr 16S (MT-RNR1) i té una freqüència del 8% al GenBank (MITOMAP). És definidora dels haplogrups K, U2', U3', U4' i U7' i està poc conservada entre les espècies. A més, es troba al domini I de l'ARNr 16S,

domini que, en principi, no sembla tenir cap funció rellevant associada (Burk et al., 2002).

La variant 9.110T>C comporta un canvi d'aminoàcid d'una isoleucina a una treonina i l'algorisme de predicció d'efectes funcionals del Polyphen (Adzhubei et al., 2010) no atribueix un efecte greu d'aquest canvi en la conformació de la proteïna. Tanmateix, la base de dades d'mtSNP, li assigna un valor de Grantham de 89, valor que indica que sí que pot tenir un efecte patogènic moderat (entre un valor mínim de 0 i un màxim de 150, Li et al., 1984). Aquesta variant té una freqüència del 0,17% a GenBank i, recentment, ha estat incorporada com a definidora de l'haplogrup H1e5.

Aquestes dues variants, la variant 1.811A>G i la variant 9110T>C, s'han relacionat amb característiques fenotípiques dels pacients, que, fins a la data de redacció d'aquest treball, cap altre grup de recerca no havia avaluat.

La presència de la variant 1.811A>G es va analitzar en relació amb les característiques psicopatològiques i neuropsicològiques, però no es va trobar cap diferència entre els que presentaven una o altra variant. La relació de les variants de l'ADNmt i el rendiment cognitiu ha estat poc avaluada. Un grup de recerca australià va analitzar la relació entre 69

variants comunes de l'ADNmt i el rendiment cognitiu mesurat en habilitats en el processament de la informació, el reconeixement de paraules i la capacitat cognitiva general. Aquest grup va analitzar un conjunt de 1.385 individus de 665 famílies i no va trobar cap variant la presència de la qual estigués associada a un empitjorament o una millora del rendiment cognitiu (*Byrne et al., 2009*).

La presència de la variant 9.110T>C p.Ile195Thr es va analitzar en relació amb 1) la capacitat de consumir oxigen mitjançant la mesura de les activitats oxidatives i 2) l'activitat enzimàtica de l'ATP sintasa en limfòcits de pacients amb la variant, en comparació amb pacients sense la variant i amb individus sans.

Alguns estudis sí que han trobat que la genètica mitocondrial influeix en la capacitat de consumir oxigen (*Bouchard et al., 1998; Marcuello et al., 2009*), però d'altres no han pogut trobar aquesta associació (*Rivera et al., 1998; Murakami et al., 2002*).

També s'ha descrit que la capacitat de producció d'ATP pot estar associada amb la genètica mitocondrial (*Szczepanowska et al., 2012*), i estudis en línies cel·lulars de híbrids amb les mutacions causants de MELAS i MELAS en el seu ADNmt van mostrar que la presència d'aquestes mutacions comportaven un descens en l'efi-

ciència de producció d'ATP (*Pallotti et al., 2004*).

Així doncs, malgrat que la implicació de variants de l'ADNmt en originar canvis en el sistema de producció d'energia ha estat reportada en alguns casos, no hem pogut descriure que la variant 9110T>C estigui relacionada amb el consum d'oxigen i/o l'activitat enzimàtica de l'ATP sintasa.

El que sí que hem observat és que els pacients d'esquizofrènia analitzats, fossin portadors de la variant 9.110T>C o no, tendien a presentar menys capacitat de consum d'oxigen i menys activitat enzimàtica de l'ATP sintasa que els individus sense malaltia psiquiàtrica. Aquesta observació està en acord amb altres publicacions científiques recents que mostren una alteració dels complexos enzimàtics de la cadena respiratòria mitocondrial en esquizofrènia (*Gubert et al., 2013*), amb el consegüent estrès oxidatiu que això pot ocasionar.

El que és una mica difícil de discriminar és si aquesta disfunció és intrínseca de la malaltia o està causada per l'acció dels fàrmacs neurolèptics (*Casademont et al., 2007; Finsterer i Segall, 2010*) o altres factors que interfereixen en el funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial com el tabac (*Cardellach et al., 2003*).



## DISCUSSIÓ GLOBAL

---

Mitjançant les publicacions de Nerea Abasolo, [Helena Torrell](#) et al, 2011; [Helena Torrell](#), Elena Montaña et al., 2013, i [Helena Torrell](#), Antonio Salas et al., en revisió, aquest treball de tesi aporta, d'una banda, informació del perfil genètic mitocondrial, no descrit mai fins ara, en teixit de còrtex occipital d'individus amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major i, d'altra banda, l'anàlisi de dues variants de l'ADNmt presents en cèl·lules sanguínies i associades a l'esquizofrènia, en relació amb característiques psicopatològiques i neuropsicològiques, i amb el funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial.

Fins a la data, el nostre estudi en teixit cerebral *post mortem* és el segon que s'ha publicat i que estudia el contingut, l'expressió i la deleció de l'ADNmt en trastorn mental greu. Tanmateix, cal destacar, com a limitacions importants de l'estudi, el nombre reduït de casos en cada grup diagnòstic i el fet que només s'analitzi una regió cerebral. Malgrat les limitacions, l'augment de l'expressió del gen MT-ND1 en trastorn bipolar, respecte dels individus control, suggereix que el complex I de la cadena respiratòria d'aquests pacients pot presentar algun tipus d'alteració. En aquest sentit, si ja hem mencionat que cal-

dria fer estudis amb més mostres i en altres regions cerebrals, el més prioritari seria dur-los a terme en relació amb el trastorn bipolar.

En referència a l'anàlisi del nombre de còpies d'ADNmt, el present treball no troba diferències entre pacients amb trastorn mental greu i individus controls. Tanmateix, ja hem dit que el nombre de mostres analitzades pot no ser suficient i la regió cerebral estudiada pot no estar afectada en els trastorns mentals greus analitzats. No obstant això, el contingut d'ADNmt pot alterar, significativament, la funció mitocondrial, ja que, de la seva transcripció, en depèn directament el sistema de producció d'energia.

Recentment, s'ha postulat que el contingut d'ADNmt podria ser un biomarcador de disfunció mitocondrial que podria tenir relació amb diverses condicions mèdiques en les quals l'estrès oxidatiu juga un paper important (*Malik i Czajka, 2013*). Els investigadors d'aquesta revisió plantegen que un increment d'estrès oxidatiu augmenta el contingut d'ADNmt, i ocasiona que algunes d'aquestes còpies estiguin malmeses fruit del mateix estrès oxidatiu. Aquesta acumulació de molècules defectuoses d'ADNmt podria conduir a un augment de l'estrès

oxidatiu que, un altre cop, malmetria més la cèl·lula i el teixit, i produiria inflamació d'aquest i agreujaria la simptomatologia de la malaltia. A causa de la presència d'estrès oxidatiu en nombroses malalties, com per exemple el càncer, la síndrome de la immunodeficiència adquirida o les malalties metabòliques, els autors de la revisió proposen el contingut d'ADNmt mesurat en fluids i/o en teixit com un biomarcador fàcil i econòmic de la disfunció mitocondrial i, per tant, dels nivells d'estrès oxidatiu.

Abans, però, s'ha d'assolir el repte d'estandarditzar i elaborar una metodologia acurada per la mesura del contingut d'ADNmt. En aquest sentit, les síndromes de depleció mitocondrial (OMIM #612073), en les quals el nombre de còpies d'ADNmt és inferior al 30% del rang de normalitat, cursen amb nombrosos símptomes cerebrals, hepàtics i musculars. També evidencien la importància del nombre de còpies de l'ADNmt per al correcte funcionament de tot l'organisme.

Aquestes síndromes estan causades per mutacions en gens codificats en l'ADNn que regulen la síntesi de nucleòtids mitocondrials o la replicació de l'ADNmt (*El-Hattab i Scaglia, 2013*). No s'han fet estudis d'aquestes mutacions en pacients amb trastorn mental greu, ni estudis que relacionessin aquests gens amb esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió

major. A més, també són escassos els estudis d'associació de mutacions en l'ADNn en gens relacionats amb la funcionalitat mitocondrial, ja que els únics que s'han avaluat són el gen NDUFV2 del complex I i el gen SLC25A12 del transportador d'aspartat/glutamat de la membrana mitocondrial, sense resultats concloents en esquizofrènia (*Washizuka et al., 2006; Hong et al., 2007*) ni en trastorn bipolar (*Washizuka et al., 2003b; Washizuka et al., 2004; Xu et al., 2008; Doyle et al., 2011*).

En aquest treball de tesi, s'han estudiat tres malalties complexes i poligèniques, l'aparició de les quals està condicionada a la conjunció de múltiples factors genètics i ambientals. Si bé, en alguns casos, aquesta malaltia s'hereta, aparentment, de la mare, és possible que aquesta herència no s'expliqui, només, per factors genètics codificats en l'ADNmt, sinó per altres factors genètics presents en l'ADNn, o fins i tot per la suma d'ambdós. A més, no es pot descartar el factor psicosocial, fruit de la criança propera de la progènie per part de les mares amb esquizofrènia, com una explicació de l'herència observada.

D'altra banda, l'ADNmt podria contribuir a desenvolupar algunes d'aquestes malalties a causa de la presència de variants genètiques aparegudes al llarg de la vida dels pacients i no heretades, ja siguin

puntuals o estructurals, específiques de teixit i/o presents en heteroplàsmia. Aquesta complexitat requeriria que els estudis d'associació tinguessin la capacitat tècnica per poder analitzar possibles variants heteroplàsmiques i una mida mostral que permetés la potència estadística adequada per poder detectar variants de risc poc freqüents. Hem detectat dues variants en l'ADNmt associades a l'esquizofrènia i, malgrat que no vam trobar cap variant definidora d'haplogrup associada a la malaltia en un estudi d'associació amb una mida mostral més gran en el que vam participar (*Ana Mosquera-Miguel, Helena Torrell, et al., 2012*), aquests resultats indiquen que, amb un mida de mostra equiparable als GWAS que es fan en ADNn, podrien aparèixer variants de risc presents en l'ADNmt associades a l'esquizofrènia i, fins i tot, compartides amb altres trastorns mentals greus. De cara al futur, s'hauria d'apostar per promoure estudis de seqüenciació massiva i/o estudis d'associació de variants de l'ADNmt, tant puntuals com estructurals, que incloguessin milers d'individus per poder analitzar la implicació de l'ADNmt en aquests trastorns i, en cas que hi estigués implicat, poder començar a treballar en possibles accions terapèutiques.

Més enllà de la genètica pròpia de l'ADNmt, la implicació dels mitocondris en el trastorn mental greu s'ha estudiat des de diversos vessants, però amb resultats poc conclouents. Encara que s'han apreciat canvis en la morfologia i densitat mitocondrial, alteracions en el sistema de producció d'energia i modificacions del patró d'expressió dels gens relacionats amb la dinàmica mitocondrial, els resultats no són prou consistents i sovint no s'han repetit, i si s'han repetit, no s'han confirmat, probablement fruit de mancances metodològiques i de mides mostrals reduïdes. Tanmateix, la suma d'aquestes evidències continua mostrant el mitocondri i la seva genètica com un àmbit d'estudi important per a l'etiologia i el tractament de les malalties psiquiàtriques, no només en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió, sinó també en autisme (*Gu et al., 2013*).

La presència de símptomes psiquiàtrics en pacients amb característiques típiques de les malalties mitocondrials és una evidència més per elucidar el paper del mitocondri en els trastorns mentals. La prevalença de símptomes psiquiàtrics en pacients amb malaltia mitocondrial és quatre vegades més elevada que en la població general (*Fattal et al., 2007*), i els símptomes que es presenten amb més freqüència són trastorns de l'estat d'ànim, psicosis i angoixa (*Anglin et al., 2012b*).

Recentment, s'han proposat complementar el tractament farmacològic dels pacients amb trastorn mental amb compostos o fàrmacs que milloressin la funció mitocondrial i/o amb activitat antioxidant (*Manji et al., 2012*). En aquesta línia, s'ha vist que pacients amb un trastorn mitocondrial que, comòrbidament, presenten símptomes psiquiàtrics, aquests símptomes disminueixen quan són tractats amb nutracèutics que inclouen coenzim Q10, vitamines B2, C, D i E, carnitina i creatina, que milloren la funcionalitat mitocondrial d'una manera senzilla, econòmica i no invasiva (*Gardner i Boles, 2011; Anglin et al., 2010*).

Així doncs, tot i que el paper de l'ADNmt i de la funcionalitat mitocondrial en el trastorn mental greu encara no es coneix prou bé, seria interessant d'investigar-los més profundament a fi de poder donar-los una translació i aplicació clínica. Recentment, i des de diversos àmbits de recerca, es proposa al sector de la psiquiatria que es tinguin en compte aquells pacients que presenten característiques típiques de malaltia mitocondrial.

La presència d'anomalies neurològiques, història mèdica amb múltiples òrgans afectats, un historial familiar amb nombroses afectacions mèdiques i resistència al tractament o, fins i tot, empitjorament a causa dels fàrmacs psicotròpics pot alertar de la presència de malaltia mitocondrial (*Anglin et al., 2012a*). La detecció de malaltia mitocondrial en malalts psiquiàtrics pot tenir conseqüències en el tractament farmacològic i el diagnòstic, i per tant aquest àmbit requereix una especial atenció.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

# *Relació de publicacions*

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Psychiatric Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/psychires](http://www.elsevier.com/locate/psychires)



## RT-qPCR study on post-mortem brain samples from patients with major psychiatric disorders: Reference genes and specimen characteristics

Nerea Abasolo, Helena Torrell, Bàrbara Roig, Sílvia Moyano, Elisabet Vilella, Lourdes Martorell\*

Hospital Universitari Psiquiàtric Institut Pere Mata, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 March 2011  
Received in revised form  
17 May 2011  
Accepted 1 June 2011

#### Keywords:

Schizophrenia  
Bipolar disorder  
Major depressive disorder  
Reference genes  
Post-mortem human brain  
RNA quality indicator

### ABSTRACT

**Background:** Gene expression studies conducted in post-mortem human brain samples have the potential to identify relevant genes implicated in psychiatric disorders. Although reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) has emerged as the method of choice for specific gene expression studies, it requires the use of stable reference genes, and it is necessary to control for pre- and post-mortem factors to obtain reliable data.

**Objective:** The aim of this study was to identify suitable reference genes and specimen characteristics that can be taken into account when comparing mRNA expression data between post-mortem brain specimens from psychiatric patients and controls.

**Method:** We used a selection of suitably matched occipital cortex specimens from subjects in each of the following groups: schizophrenia ( $N = 15$ ), bipolar disorder ( $N = 13$ ), major depressive disorder ( $N = 15$ ), and control ( $N = 15$ ). Quantitative and qualitative RNA analyses were performed prior to RT-qPCR and gene expression stability was evaluated with geNorm and NormFinder.

**Results:** We identified GAPDH, RPS17, RPL30, RPLP0, and TFRC as potential reference genes from a sample plate containing 32 candidates commonly used as reference genes. Further analyses of these 5 genes highlighted that 1) they are suitable reference genes for RT-qPCR studies in these post-mortem brain samples from psychiatric patients, and 2) the RNA quality index is highly correlated with gene expression values ( $r = -0.681$ ,  $p < 0.0001$ ).

**Conclusions:** In addition to controlling for pre- and post-mortem factors and selecting stable reference genes for normalization, sample sets should be matched with regard to RNA quality.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Gene expression studies performed on post-mortem human tissue have proved to be valuable for identifying genetic factors involved in the etiology and phenotypic expression of psychiatric disorders. To date, the majority of studies have sought to find differences in gene expression between control subjects and individuals suffering from schizophrenia, and some replicated findings have identified disturbances in genes related to synaptic function, energy metabolism, and oligodendrocyte function (Bray, 2008). Schizophrenia (SCH), bipolar disorder (BD), and major depressive disorder (MDD) are severe mental disorders with genetic and environmental factors known to be involved in their development. Evidence indicates a common neurobiological and psychopharmacological aspect, and some biological markers in areas of neurophysiology, neuroendocrinology, psychoneuroimmunology, and psychopharmacology show an overlap between SCH, BD, and

MDD (Muller and Schwarz, 2008). Therefore, several studies have been working with the hypothesis that a specific gene or set of genes is implicated in SCH, BD, and MDD, and some specific genes and proteins have been identified as putative risk factors for these disorders (Johnston-Wilson et al., 2000; McCullumsmith and Meador-Woodruff, 2002; Chana et al., 2003; Rollins et al., 2009; Liu et al., 2011; Reynolds and Reynolds, 2011; Ben-Shachar and Karry, 2008; Knight et al., 2009; Green et al., 2010).

Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) is a molecular biology technique that is used to amplify and simultaneously quantify a targeted molecule by measuring incremental changes in specific fluorescence signals with each PCR cycle. This technique allows for the quantification of specific mRNAs in a high-throughput manner and is considered the method of choice for gene expression detection because of its demonstrated sensitivity and reproducibility (VanGuilder et al., 2008). The two most commonly used methods to analyze data from qPCR experiments are absolute quantification and relative quantification. Absolute quantification involves determining the transcript copy number in the experiment, usually by relating the fluorescence value to

\* Corresponding author. Unitat de Psiquiatria, C/ Sant Llorenç, 21, 43201 Reus Spain. Tel.: +34 977 759338; fax: +34 977 759322.  
E-mail address: [lourdes.martorell@urv.cat](mailto:lourdes.martorell@urv.cat) (L. Martorell).



a standard curve. For relative quantification, the fluorescence value in a determined group is related to that of another group, e.g., a treatment group versus an untreated group or a patient group versus a control group. The resulting value is expressed as the change in steady-state mRNA levels of a target gene relative to an internal control RNA (known as a reference gene or “housekeeping” gene). To calculate these relative changes in gene expression, the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method is generally recommended (Livak and Schmittgen, 2001). It has been reported that the specific methodology, including experimental design, sample origin, nucleic acid extraction, reverse transcription, qPCR target information, qPCR oligonucleotides, qPCR protocol, qPCR validation, and data analysis, can influence the results of gene expression studies (Bustin et al., 2009). Likewise, pre-mortem, ante-mortem, and post-mortem non-genetic factors could affect qPCR results when gene expression studies are conducted on post-mortem tissues (Lipska et al., 2006; Weickert et al., 2010). Another requirement for obtaining accurate results is the correct selection of the reference gene; in fact, it has been demonstrated that accurate normalization data relies on using the geometric mean of the expression levels of various reference genes (Lipska et al., 2006; Vandesompele et al., 2002). The prevalent way for selecting valid reference genes for normalization of gene expression data is based on excel applets like *geNorm* (Vandesompele et al., 2002) or *NormFinder* (Andersen et al., 2004).

The aims of the present study were to identify and evaluate reference genes for RT-qPCR studies conducted on post-mortem occipital cortex samples from patients with SCH, BD, and MDD and to identify specimen characteristics that can influence gene expression data.

## 1. Materials and methods

### 1.1. Brain specimens

This study was conducted using specimens from the Neuropathology Consortium of the Stanley Brain Collection (Stanley Medical Research Institute (SMRI), MD, USA) and received the approval of the review board of the Hospital Universitari Psiquiàtric Institut Pere Mata. This brain collection is a selection of matched specimens that includes 15 specimens each from individuals diagnosed with SCH, BD, MDD or no psychiatric disorder (control, C). However, only 13 of the 15 BD samples could be analyzed in the present study because of complications in RNA extraction. Patients were diagnosed according to the DSM-IV criteria. Specimens of each group were matched for age, sex, race, post-mortem interval (PMI), acidity–alkalinity (pH), and side of brain used (Torrey et al., 2000). Specimens were obtained with the permission of the family of the deceased. Fresh frozen blocks of occipital cortex were shipped to our laboratory in dry ice and maintained at  $-80^\circ\text{C}$  until RNA was extracted. Clinical and post-mortem data of the patients and unaffected controls are given in Supplementary Table 1.

### 1.2. RNA extraction, quantification and quality measures

All lab areas were cleaned with RNaseZap (Ambion, Applied Biosystems [ABI], Madrid, Spain) prior to RNA extraction. Total RNA was extracted using TRizol Reagent (Invitrogen, Barcelona, Spain). RNA was quantified by spectrophotometry (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and by microfluidic analysis with an Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad Laboratories, Barcelona, Spain). The correlation between measurements by the two methods presented a Pearson coefficient of  $r^2 = 0.897$  and  $p < 0.0001$ , and the mean of the two values was calculated. Quantitative information about the general state and quality of the

RNA was obtained with an Experion system (Bio-Rad Laboratories) by determining the RNA quality indicator number (RQI), which ranges from 1 (lowest quality) to 10 (highest quality).

### 1.3. RT-qPCR

#### 1.3.1. Identification of reference genes

To screen for appropriate reference genes, we used a Taqman Express Plate Endogenous Control (ABI). This 96-well plate contains 32 pre-optimized human TaqMan Gene Expression Assays that are commonly used as reference genes (Table 1). Therefore, there are only three well positions for each gene, and we only considered SCH, MDD, and C samples for this first stage. We selected SCH and MDD samples based on the psychopathological continuum theory, which considers these two disorders as extreme conditions lying along an admixture of symptoms (Van Os et al., 1998; Peralta and Cuesta, 2008). This theory, which is also expected to be applicable at the molecular level, establishes that symptomatology follows a continuum ranging from depressive symptoms, which correspond to major depressive disorder, to psychotic symptoms, which appear in schizophrenia. Both depressive and psychotic symptoms that define bipolar disorder are situated in the middle of this continuum phenotype. Likewise, to obtain reliable results, only high-quality RNAs were considered at this stage ( $RQI > 7$ ). A pool of RNA for each of the SCH ( $N = 7$ ), MDD ( $N = 7$ ), and C ( $N = 11$ ) groups was used, and in each case 0.5  $\mu\text{g}$  of total RNA was DNase treated and then reverse transcribed to cDNA using random hexamers and Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) in a final reaction volume of 100  $\mu\text{L}$ . qPCR reactions were performed in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  containing 10  $\mu\text{L}$  of cDNA + nuclease-free water (Ambion, ABI) and 10  $\mu\text{L}$  of TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix,

**Table 1**

C<sub>q</sub> values in pooled schizophrenia (SCH), major depressive disorder (MDD), and control subjects (C) for the 32 candidate reference genes.

| Candidate reference genes | Threshold cycle (C <sub>q</sub> ) |       |         |       |      |
|---------------------------|-----------------------------------|-------|---------|-------|------|
|                           | SCH                               | MDD   | Control | Mean  | SD   |
| 18S                       | 18.98                             | 19.31 | 19.90   | 19.40 | 0.47 |
| ABL1                      | 32.74                             | 32.97 | 32.83   | 32.84 | 0.11 |
| ACTB                      | 34.73                             | 34.74 | 34.98   | 34.82 | 0.24 |
| B2M                       | 31.47                             | 31.96 | 31.68   | 31.70 | 0.24 |
| CASC3                     | 30.96                             | 30.80 | 30.94   | 30.90 | 0.09 |
| CDKN1A                    | 34.55                             | 35.99 | 35.64   | 35.39 | 0.75 |
| CDKN1B                    | 29.93                             | 29.98 | 29.81   | 29.91 | 0.09 |
| EIF2B1                    | 33.93                             | 33.66 | 33.71   | 33.77 | 0.14 |
| MT-ATP6                   | 21.96                             | 21.93 | 21.92   | 21.93 | 0.02 |
| PES1                      | 35.78                             | 34.93 | 35.29   | 35.33 | 0.42 |
| PGK1                      | 29.91                             | 29.63 | 29.71   | 29.75 | 0.14 |
| POLR2A                    | 33.96                             | 33.63 | 33.55   | 33.71 | 0.22 |
| POP4                      | 32.94                             | 32.96 | 32.93   | 32.94 | 0.01 |
| PPIA                      | 29.97                             | 29.99 | 29.85   | 29.94 | 0.07 |
| PSMC4                     | 33.75                             | 33.54 | 34.01   | 33.77 | 0.23 |
| PUM1                      | 33.77                             | 33.47 | 33.94   | 33.73 | 0.24 |
| ELF1                      | 32.91                             | 33.64 | 32.90   | 33.15 | 0.42 |
| GADD45A                   | 36.03                             | 36.86 | 37.01   | 36.63 | 0.53 |
| GAPDH                     | 30.93                             | 30.78 | 30.96   | 30.89 | 0.10 |
| GUSB                      | 34.08                             | 34.09 | 33.94   | 34.04 | 0.08 |
| HMBS                      | 35.91                             | 36.71 | 35.95   | 36.19 | 0.45 |
| HPRT1                     | 32.38                             | 31.93 | 31.93   | 32.08 | 0.26 |
| IPO8                      | 33.94                             | 33.71 | 33.87   | 33.84 | 0.12 |
| MRPL19                    | 33.92                             | 33.95 | 33.98   | 33.95 | 0.03 |
| RPL30                     | 32.93                             | 32.77 | 32.81   | 32.84 | 0.08 |
| RPL37A                    | 31.76                             | 31.41 | 31.97   | 31.71 | 0.28 |
| RPLP0                     | 32.96                             | 32.75 | 32.94   | 32.88 | 0.11 |
| RPS17                     | 31.91                             | 31.74 | 31.80   | 31.82 | 0.09 |
| TBP                       | 36.40                             | 36.97 | 35.86   | 36.41 | 0.55 |
| TFR3                      | 32.83                             | 32.84 | 32.93   | 32.87 | 0.05 |
| UBC                       | 28.91                             | 28.72 | 28.82   | 28.82 | 0.09 |
| YWHAZ                     | 35.86                             | 35.68 | 35.94   | 35.83 | 0.13 |

which contains ROX as a passive internal reference and primers and probes for each gene (ABI). Thermal cycling was performed on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI) according to the manufacturer's instructions. The thermal cycling protocol was as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and then 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C.

### 1.3.2. Confirmation of the suitability of selected reference genes for SCH, BD, and MDD samples

In the analysis of selected reference genes in the SCH, BD, MDD, and C samples, reverse transcription was done simultaneously with qPCR in a single reaction well using a TaqMan RNA-to-C<sub>T</sub> 1-Step Kit (ABI) and TaqMan gene expression validated assays (ABI) in the 7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI). Five candidate reference genes (GAPDH, RPL30, RPLP0, RPS17, and TFRC) were analyzed (Table 2). Prior to the experiment, 6 serial dilutions of two representative mRNAs were run in triplicate with two objectives: 1) to identify the best quantity of mRNA for the experiment and 2) to confirm that amplification efficiencies were around 100%. The optimum amount of mRNA was 200 pg, and the efficiency range was 92.5–104.6% (data not shown). Each RT-qPCR reaction contained 4.25 µL of RNA, 0.5 µL of the validated assay for the reference gene, 0.25 µL of RT enzyme mix, and 5 µL of TaqMan RNA-to-C<sub>T</sub> 1-Step Master Mix (ABI). All measurements were performed in triplicate in a final reaction volume of 10 µL in 384-well plates, and qPCR data were acquired using Sequence Detector Software (SDS version 2.3, ABI). Mean quantification cycle (C<sub>q</sub>) values (also known as threshold cycle, C<sub>t</sub>) were calculated as the average of three replicates if the SD was less than 0.3; otherwise, the individual C<sub>q</sub> value was eliminated from the study and the remaining data were reanalyzed. Data from 7.5% of the wells were discarded. The non-template sample did not produce a signal in any assay. Likewise, the samples without the RT enzyme did not produce any signal. The geometric mean of C<sub>q</sub> values for the 5 genes was also calculated as a unique value.

### 1.4. Gene expression stability analysis

The RT-qPCR data were evaluated with two independent statistical approaches: geNorm (Vandesompele et al., 2002) and NormFinder (Andersen et al., 2004). GeNorm identified the two best reference genes to use for normalization based on the *M* measure, which is calculated from the pairwise comparison of each gene with all other genes. NormFinder identified the best reference gene based on the expression variability value (*V*), and intra- and intergroup variability were considered if more than two groups were available. Both programs are Visual Basic Applications for Microsoft Excel, and a histogram was built to rank the genes from best (minimum variation, more stable) to worst (maximum variation, less stable) in terms of their use as a reference gene.

**Table 2**  
 Suitable reference genes analyzed in SCH, BD, MDD, and C.

| Gene name                                | Gene symbol | Gene ID | Location | Assay ID      | Amplicon size |
|--|-------------|---------|----------|---------------|---------------|
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | GAPDH       | 2597    | 12p13    | Hs99999905_m1 | 122           |
| Ribosomal protein, large, P0             | RPLP0       | 6175    | 12q24.2  | Hs99999902_m1 | 105           |
| Ribosomal protein S17                    | RPS17       | 6218    | 15q      | Hs00734303_g1 | 93            |
| Ribosomal protein L30                    | RPL30       | 6156    | 8q22     | Hs00265497_m1 | 149           |
| Transferrin receptor                     | TFRC        | 7037    | 3q29     | Hs00951094_m1 | 97            |

### 1.5. Statistical analysis

To determine whether mRNA expression of the selected candidate reference genes was associated with specimen characteristics, we performed a series of statistical analyses. Distributions for all dependent variables were examined by the Kolmogorov–Smirnov test of normality. Pearson correlation analyses were conducted between mRNA expression (mean C<sub>q</sub> values for each gene and the geometric mean of C<sub>q</sub> values for the 5 reference genes), RQI, age of death, duration of the disease, age of onset, lifetime quantity of fluphenazine or equivalent, pH, mass of brain, PMI, and storage time. ANOVA or *t*-tests were applied to identify differences between the above-mentioned quantitative variables in the following categorical variables: diagnoses, gender, death by suicide, history of substance abuse, and brain hemisphere. The general linear model was used to determine whether reference genes presented statistically significant differences between patients and controls considering the correlated covariates. All tests were two-tailed, and statistical significance was set at *p* < 0.05. Statistical analyses were performed with SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA).

## 2. Results

### 2.1. Identification of reference genes

We have analyzed 32 potential reference genes in three groups of pooled mRNA samples with high RNA quality (RQI ≥ 7.0) from SCH, MDD, and C specimens. C<sub>q</sub> values were obtained for all samples and genes (Table 1). When we considered all of the data, the two different algorithms used for the analyses, geNorm and NormFinder, identified similar groups of genes as the best and worst candidate reference genes. GeNorm identified 18 genes with an *M*-value less than 0.005 and NormFinder identified 18 genes with a *V*-value less than 0.005 (Fig. 1). All 18 genes identified by geNorm coincided with those identified by NormFinder. However, the best five genes identified by geNorm (RPS17/RPL30, UBC, IPO8, and CASC3) did not coincide at all with the best five genes identified by NormFinder (MRPL19, TFRC, POP4, MT-ATP6, and CASC3). Both algorithms presented a high degree of agreement in identifying 18S, CDKN1A, and TBP as the three worst genes in the ranking.

#### 2.1.1. Reference genes for SCH

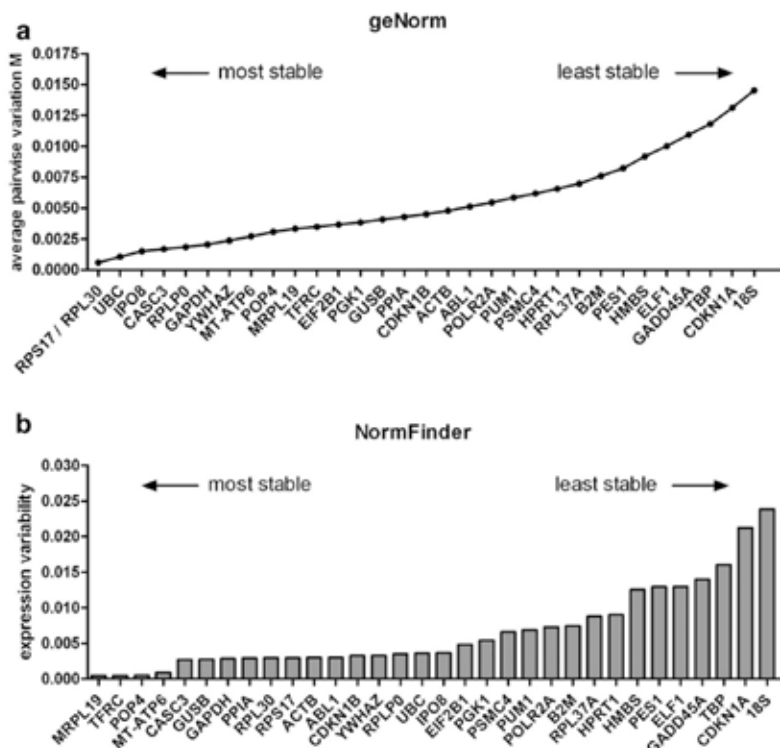
When considering the SCH and C samples, the best genes identified by geNorm (*M* < 0.003), ranked from best to worst, were as follows: GUSB/PPIA, CDKN1B, RPL30, UBC, RPS17, IPO8, MT-ATP6, CASC3, RPLP0, and POP4 (Supplementary Fig. 1a). On the other hand, the best reference genes identified by NormFinder (*V* < 0.003), ranked from best to worst, were as follows: ABL1, YWHAZ, POP4, ELF1, RPLP0, GAPDH, HMBS, MRPL19, TFRC, CASC3, and PUM1.

#### 2.1.2. Reference genes for MDD

For the MDD and C samples, the best reference genes identified by geNorm (*M* < 0.0025), ranked from best to worst, were as follows: PGK1/TFRC, UBC, RPS17, EIF2B1, RPL30, MRPL19, HPRT1, MT-ATP6, POP4, and GADD45A (Supplementary Fig. 1b). Likewise in the SCH and control groups, the best genes identified by NormFinder (*V* < 0.002), ranked from best to worst, were as follows: PGK1, TFRC, EIF2B1, RPL30, HPRT1, MT-ATP6, MRPL19, POP4, RPS17, UBC, and POLR2A.

### 2.2. Evaluation of selected reference genes

We further analyzed RPLP0, RPS17, RPL30, GAPDH, and TFRC in all SCH, BD, MDD, and C samples (*N* = 58) using three technical



**Fig. 1.** Expression variability of the 32 candidate reference genes examined in pooled SCH, MDD, and control samples. a) M-values identified by geNorm, and b) V-values identified by NormFinder.

replicates. RPLP0 and TFRC were selected based on their low variability in the present study and also in a previous study (Silberberg et al., 2009); RPS17 and RPL30 were selected based on their low variability identified in the present study. Additionally, GAPDH was selected based on its low variability identified in the present study and its popularity as a reference gene. We decided not to include the mitochondrial DNA gene MT-ATP6 because it would have required a DNase treatment step (mtDNA do not have introns), making the ABI assay no longer specific for mRNA. In the analysis of these 5 genes in all samples, geNorm and NormFinder both ranked the genes in the same order from best to worst: RPLP0, RPS17, RPL30, GAPDH, and TFRC. Analysis of pairwise variation by geNorm to determine the optimal number of reference genes for normalization indicated that two genes should be sufficient because the  $V_{2/3}$  value was 0.007, which is lower than the 0.15 cutoff proposed by Vandesompele et al. (Vandesompele et al., 2002). The results of geNorm and NormFinder analysis for the 5 genes in all SCH, BD, MDD, and C samples are shown in Fig. 2.

### 2.3. Relationship between specimen characteristics

Sample characteristics of SCH, BD, MDD, and C are shown in Supplementary Table 1. Statistical differences were identified in storage time, death by suicide, age of onset of the disease, and duration of the disease. Prior to correlating specimen characteristics with mRNA expression, we analyzed which specimen characteristics were related to each other. The following variables were evaluated: gender, age at death, pH, mass of brain, PMI, storage time, RQI, brain hemisphere, history of substance abuse, death by suicide, duration of disease, lifetime quantity of fluphenazine or

equivalent (mg), and age of onset of the disease. As expected, RQI was positively correlated with pH ( $r = 0.589, p < 0.0001$ ), and age at death was correlated with duration of the disease ( $r = 0.488, p = 0.001$ ) and age of onset ( $r = 0.478, p = 0.001$ ). Females presented a lower mass of brain compared to males ( $1386 \pm 106$  and  $1528 \pm 145$  g, respectively;  $t = -4.078, p < 0.0001$ ). We also observed that lifetime quantity of fluphenazine (or equivalent) was correlated with storage time ( $r = -0.563, p = 0.002$ ). Those individuals who died by suicide were younger than those who did not ( $39.1 \pm 10.7$  and  $49.2 \pm 9.7$  years, respectively;  $t = -3.637, p = 0.001$ ), and individuals whose samples were processed in a larger PMI presented a lower age of disease onset ( $r = -0.344, p = 0.021$ ).

### 2.4. Specimen characteristics associated with mRNA expression

To evaluate the potential effect of specimen characteristics on the mean Cq values, we considered the following variables: gender, age of death, pH, mass of brain, PMI, storage time, RQI, brain hemisphere, history of substance abuse, death by suicide, duration of disease, lifetime quantity of fluphenazine or equivalent (mg), and age of onset. We identified significant correlations between Cq and RQI and between Cq and pH. As shown in Fig. 3, RQI was negatively correlated with Cq values for the five genes studied: RPLP0 ( $r = -0.732, p < 0.0001$ ), RPS17 ( $r = -0.656, p < 0.0001$ ), RPL30 ( $r = -0.686, p < 0.0001$ ), GAPDH ( $r = -0.707, p < 0.0001$ ), and TFRC ( $r = -0.457, p < 0.0001$ ), as well as for the geometric mean ( $r = -0.681, p < 0.0001$ ). In addition, pH was negatively correlated with the Cq values of RPLP0 ( $r = -0.467, p < 0.0001$ ), RPS17 ( $r = -0.538, p < 0.0001$ ), RPL30 ( $r = -0.393, p < 0.003$ ), GAPDH ( $r = -0.457,$

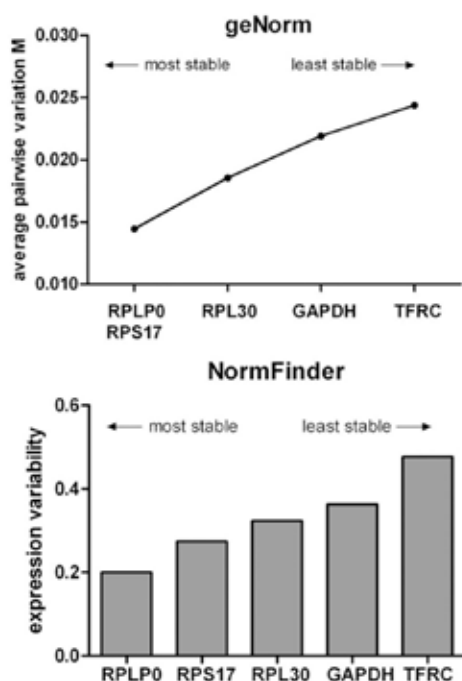


Fig. 2. Expression variability of the five selected reference genes examined in all samples (SCH, BD, MDD, and C) by geNorm and NormFinder.

$p = 0.0001$ ), and geometric mean ( $r = -0.430$ ,  $p = 0.001$ ), but not with that of TFRC ( $-0.226$ ,  $p = 0.1$ ). We obtained identical results after normalizing the mean Cq values by considering the efficiency of PCR reactions with the equation  $Q = E^{\Delta Cq}$ , where  $E$  is the reaction efficiency and  $\Delta Cq = Cq_{\text{minim}} - Cq_{\text{sample}}$ . It is worth noting that RQI presented slight statistical differences between MDD and C ( $t = -2.128$ ,  $p = 0.047$ ) and between SCH and C ( $t = -2.196$ ,  $p = 0.041$ ), but not between BD and C ( $t = -1.478$ ,  $p = 0.157$ ).

### 2.5. Evaluation of reference genes between SCH, BD, MDD, and C samples

The qPCR data were compared between each patient group and the controls using a general linear model and including RQI (highly correlated with mean Cq values of reference genes) as a covariate. RQI and pH were highly correlated; however, we did not include pH in the model because it could hide the effect of RQI. We did not observe significant differences among the patient groups and controls for any of the five reference genes studied or for the geometric mean values presented in Fig. 4. However, if we did not consider RQI in the analysis, statistically significant results were obtained for GAPDH between BD and C ( $t = 2.193$ ;  $p = 0.044$ ), even though there were no statistical differences among the RQI values for these two groups.

### 3. Discussion

RT-qPCR is one of the most frequently used methods for the quantification of specific mRNAs due to its high specificity, large dynamic range, and high accuracy (Vandesompele et al., 2002). However, a lack of consensus exists on how best to perform and

interpret qPCR data (Bustin et al., 2009). In the present study, we aimed to shed light on the use of RT-qPCR for the analysis of SCH, BD, MDD, and C post-mortem brain samples. We identified and evaluated suitable reference genes and variables related to clinical, demographic, and specimen characteristics of each sample that could affect the interpretation of qPCR data. For the sake of completeness, atypical correlations were performed.

We investigated 32 previously identified candidates as potential reference genes for normalization in expression studies. Among them, we identified a group of stable reference genes that are suitable for qPCR in our target specimen groups, and we identified a group of reference genes that, a priori (because we have not done further analysis), are less stable and should not be used. The 5 best reference genes (ranked from best to worst) identified by geNorm were RPS17/RPL30, UBC, IPO8 and CASC3; meanwhile, NormFinder identified MRPL19, TFRC, POP4, MT-ATP6, and CASC3. In a previous study (Silberberg et al., 2009) using SCH and BD samples also obtained from the Stanley Brain Collection, geNorm identified RPLP0/TFRC, ACTB, PGK1, and IPO8, and NormFinder identified ACTB, IPO8, TFRC, PGK1, and UBC as the five best suitable genes. Their study was similar to ours in that they first selected 6 reference genes from a sample plate containing 16 total by using a small sample, and they later applied their results to a larger sample. However, it should be noted that they analyzed specimens obtained from a different area of the brain, they investigated 16 instead of 32 genes, and they used 2 SCH, 4 BD and 2 C mRNA samples at this first stage of the study (Silberberg et al., 2009); in contrast, we analyzed pooled mRNA from 7 SCH, 7 MDD, and 11 C samples. In our study, IPO8 ranked 3rd and 17th using geNorm and NormFinder, respectively (1st = best gene, 32nd = worst gene), ACTB ranked 17th and 11th (although it is one of the most frequently used reference genes), TFRC ranked 11th and 2nd, and RPLP0 ranked 5th and 15th, respectively. According to the results of Silberberg et al. and the present study, we decided to further analyze TFRC and RPLP0 (the two best reference genes from Silberberg et al.), RPS17 and RPL30 (two highly stable genes from our study, not included in the previous study), and GAPDH (not identified as a stable reference gene by Silberberg et al. but ranked 6th and 7th respectively in this study and one of the most universally used in gene expression studies).

Our study is also in accordance with Silberberg et al. in ranking the worst reference genes. Silberberg identified TBP, POLR2A and 18S as the three most unstable reference genes according to both geNorm and NormFinder. In our study, TBP was ranked 29th by geNorm and 30th by NormFinder, POLR2A was ranked 19th and 22nd in geNorm and NormFinder, respectively, and 18S was ranked 31st by geNorm and 32nd by NormFinder. Therefore, according to both Silberberg et al. and our study, TBP and the commonly used 18S should not be used as reference genes in this brain collection. Another study conducted in distinct brain samples (human epileptogenic neocortex) has recently identified TBP as a valid reference gene if used with neuron-specific enolase (NSE) (Wierschke et al., 2010). However, this study used a small sample size of 18 fresh specimens processed with a low PMI and TBP could be particularly fragile in other situations. Likewise, our GAPDH results (7th best out of 32) did not concur with those of Silberberg et al. (13th out of 16) in either geNorm or NormFinder. Silberberg et al. identified GAPDH to have the least stability, but in our study GAPDH also had low variability. In a validation study of reference genes to use in different post-mortem tissues, GAPDH was identified as the second-most-stable gene investigated in the human brain (frontal lobe) (Koppelkamm et al., 2010). Additionally, in another study aimed at selecting reference genes in dorsolateral prefrontal cortex SCH and C samples, GAPDH and ACTB showed the best stability (Weickert et al., 2010). Distinct brain regions present

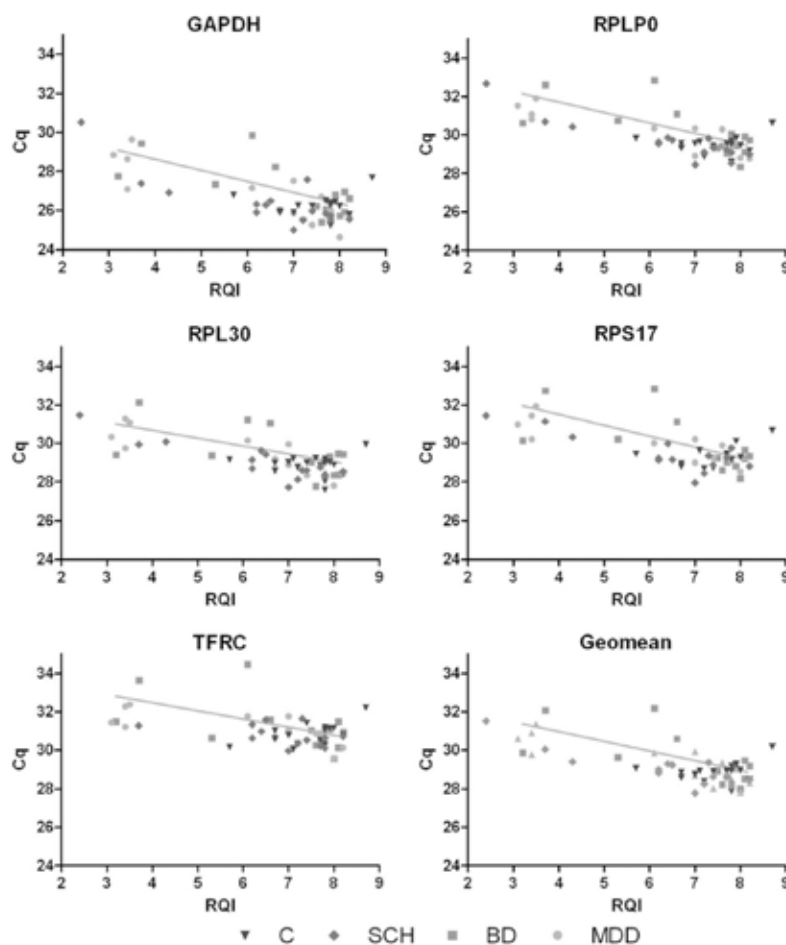


Fig. 3. Correlation between mRNA expression of the five selected genes and the calculated geomean and RQI.

distinct expression patterns, as has been shown in a gene expression study that compared schizophrenia and control subjects using an Affymetrix GeneChip microarray (Katsel et al., 2005). Interestingly, this study showed that the dorsolateral prefrontal cortex, which is the candidate target region in most SCH studies, presented fewer altered transcripts compared to other brain areas, including the temporal and cingulate cortices and hippocampus. There is little information available about the expression patterns of reference genes in different brain areas. GAPDH has been identified as a stable reference gene in dorsolateral prefrontal cortex in a schizophrenia-control study (Weickert et al., 2010) and unstable in temporal cortex in an epilepsy-control study (Wierschke et al., 2010). Therefore, we were interested in analyzing reference genes in a distinct brain area, and we selected the occipital cortex, as it is involved in visual memory and the interpretation of visual images that can be related to visual hallucinations. We also chose the occipital cortex because it is a heavily myelinated region, and several studies analyzing genes that are involved in myelination have been performed in major psychiatric disorders. However, based on the results of our study of occipital cortex samples from SCH, BD, MDD, and C specimens, the results of Silberberg et al. using dorsolateral prefrontal cortex samples from SCH, BD, and C specimens from the same brain collection, and the results of

Weickert et al. using SCH and C samples from a different brain collection, we conclude that TFRC, RPLP0, and GAPDH are the most-stable reference genes to use in schizophrenia studies. We agree with Silberberg et al. that GAPDH presents statistical differences between BD and C samples; however, we speculate that these differences are more related to RQI than to variation in the expression of this gene.

Notably, low variation was observed in our study samples, likely due to the high accurate quantification of RNAs (using two methods) and selection of high-quality RNA samples for analysis in the first stage of the study. We observed that both algorithms (geNorm and NormFinder) agreed with their selection of best and worst reference genes, although they did not coincide with ranking, especially for the best reference genes. Taking into account that more than one gene is recommended for normalization (Vandesompele et al., 2002; Koppelkamm et al., 2010), using a combination of at least two of these five genes identified in this study would be ideal for normalizing gene expression in SCH, BD, MDD, and C samples. It is noteworthy that the samples from the brain collection used in this study were matched for age, sex, race, PMI, pH, and side of brain analyzed (Torrey et al., 2000); however, we determined that variables such as storage time and death by suicide presented statistical differences (with larger periods of

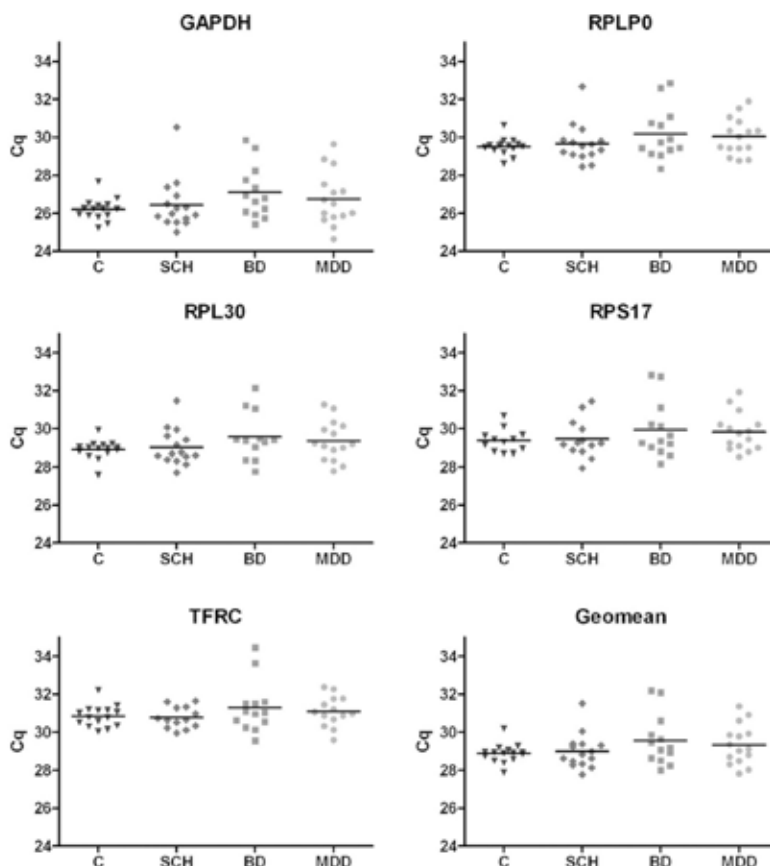


Fig. 4. mRNA expression of the five selected reference genes and the calculated geomean among diagnostic groups.

storage for patients than for controls, and death by suicide present in some of the patients but not for any control subject). Whether these variables were included in our analyses did not affect the model, which analyzed Cq values depending on diagnosis. The RQI index was not statistically significant among the four groups (SCH, BD, MDD, and C), but significant differences were observed between SCH and C and between MDD and C when specific comparisons were performed.

We also found that RQI is a key variable that should be considered in future gene expression studies. RQI was highly correlated with the five genes analyzed, showing an increase in Cq value with a decrease in sample RQI. The assessment of RNA quality has been described as a critical first step in obtaining meaningful gene expression data because RT-qPCR performance is affected by RNA integrity, except for short cDNA fragments (about 70–250 bp) (Fleige and Pfaffl, 2006). Therefore, RNA quality should be assessed in any qPCR analysis by determining the RQI or its counterpart, RIN (RNA Integrity Index) (Weickert et al., 2010).

We also found that pH was highly correlated with Cq, although to a lesser extent than RQI. A number of studies conducted with microarrays have identified differences in gene expression associated with brain pH (Tomita et al., 2004; Mexal et al., 2006), and it has been argued that RNA quality is most strongly affected by pH of the tissue (Chevyreva et al., 2008). However, other authors have pointed out that even though RNA quality is strongly correlated with pH, a causal relationship cannot be assumed (Atz et al., 2007).

Although false positive results can be obtained because of the large number of statistical analyses performed, it cannot be ruled out that these variables influence the Cq values of specific genes. In the same way, we did not observe statistical differences among variables that have been identified in other studies to be correlated with gene expression, as described for PMI (Birdsill et al., 2010).

The main conclusion of the present study is that, in addition to selecting stable reference genes for normalization, sample sets should be matched with regard to RNA quality. Whenever this is not possible, a statistical model considering the covariates must be the method of choice when comparing mRNA expression data between patients and controls. With the present selection of occipital cortex matched specimens from the Neuropathology Consortium of the SMRI, the genes RPLP0, RPS17, RPL30, GAPDH, and TFRC should be used as reference genes in future RT-qPCR studies.

#### Conflicts of interest

The authors affirm that they have no actual or potential conflicts of interest including financial, personal or other relationships that could have inappropriately influenced the work presented in this manuscript.

#### Funding

Funding for this study was provided by grants PI06/1586, PS09/01052, and FEDER from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) of the Ministry of Science and Innovation in Spain. Helena Torrell was

funded by an FI-DGR scholarship from the Generalitat de Catalunya. Specimens for this study were provided by the Stanley Medical Research Institute (SMRI). The ISCIH and the SMRI had no further role in the study design; analysis and interpretation of data; in writing the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

#### Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jpsychires.2011.06.001.

#### References

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 2004;64:5245–50.

Atz M, Walsh D, Cartagena P, Li J, Evans S, Choudary P, et al. Methodological considerations for gene expression profiling of human brain. *Journal of Neuroscience Methods* 2007;163:295–309.

Ben-Shachar D, Karry R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS One* 2008;3:e3676.

Birdsill AC, Walker DG, Lue L, Sue LL, Beach TG. Postmortem interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell and Tissue Banking*: 2010 Aug 12 [Epub ahead of print].

Bray NJ. Gene expression in the etiology of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 2008;34:412–8.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009;55:611–22.

Chana G, Landau S, Beasley C, Everall IP, Cotter D. Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biological Psychiatry* 2003;53:1086–98.

Chevyreva I, Faulk RL, Green CR, Nicholson LF. Assessing RNA quality in postmortem human brain tissue. *Experimental and Molecular Pathology* 2008;84:71–7.

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:126–39.

Green EK, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, et al. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2010;15:1016–22.

Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, et al. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley neuropathology consortium. *Molecular Psychiatry* 2000;5:142–9.

Katsel P, Davis KL, Gorman JM, Haroutunian V. Variations in differential gene expression patterns across multiple brain regions in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2005;77:241–52.

Knight HM, Pickard BS, Maclean A, Malkoy MP, Soares DC, McRae AF, et al. A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *American Journal of Human Genetics* 2009;85:833–46.

Koppelkamm A, Vennemann B, Fracasso T, Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Heinrich M. Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *International Journal of Legal Medicine* 2010;124:371–80.

Lipska BK, Deep-Soboslay A, Weickert CS, Hyde TM, Martin CE, Herman MM, et al. Critical factors in gene expression in postmortem human brain: focus on studies in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2006;60:650–8.

Liu J, Li J, Li T, Wang T, Li Y, Zeng Z, et al. CTLA-4 confers a risk of recurrent schizophrenia, major depressive disorder and bipolar disorder in the Chinese Han population. *Brain, Behavior, and Immunity* 2011;25:429–33.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25:402–8.

McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH. Striatal excitatory amino acid transporter transcript expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:368–75.

Mexal S, Berger R, Adams CE, Ross RG, Freedman R, Leonard S. Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles. *Brain Research* 2006;1106:1–11.

Muller N, Schwarz MJ. A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelin's dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2008;258(Suppl. 2):97–106.

Peralta V, Cuesta MJ. Exploring the borders of the schizoaffective spectrum: a categorical and dimensional approach. *Journal of Affective Disorders* 2008;108:71–86.

Reynolds LM, Reynolds GP. Differential regional N-acetylaspartate deficits in post-mortem brain in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Research* 2011;45:54–9.

Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, et al. Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One* 2009;4:e4913.

Silberberg G, Baruch K, Navon R. Detection of stable reference genes for real-time PCR analysis in schizophrenia and bipolar disorder. *Analytical Biochemistry* 2009;391:91–7.

Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, Evans SJ, Choudary PV, Li J, et al. Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biological Psychiatry* 2004;55:346–52.

Torrey EF, Webster M, Knable M, Johnston N, Yolken RH. The Stanley foundation brain collection and neuropathology consortium. *Schizophrenia Research* 2000;44:151–5.

Van Os J, Jones P, Sham P, Bebbington P, Murray RM. Risk factors for onset and persistence of psychosis. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology* 1998;33:596–605.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002;3:RESEARCH0034.

VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 2008;44:619–26.

Weickert CS, Sheedy D, Rothmond DA, Dedova I, Fung S, Garrick T, et al. Selection of reference gene expression in a schizophrenia brain cohort. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 2010;44:59–70.

Wierschke S, Gigout S, Horn P, Lehmann T-N, Dehnicke C, Bräuer AU, et al. Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;403:385–90.

# Mitochondrial DNA (mtDNA) in Brain Samples From Patients With Major Psychiatric Disorders: Gene Expression Profiles, MtDNA Content and Presence of the MtDNA Common Deletion

Helena Torrell, Elena Montaña, Nerea Abasolo, Bàrbara Roig, Ana M. Gaviria, Elisabet Vilella, and Lourdes Martorell\*

Hospital Universitari Psiquiàtric Institut Pere Mata, IISPV, Universitat Rovira i Virgili. C/Sant Llorenç, Reus, Spain

Manuscript Received: 8 February 2012; Manuscript Accepted: 3 January 2013

Several lines of evidence support a mitochondrial dysfunction in major psychiatric disorders. The objective of this study was to determine whether mitochondrial DNA (mtDNA) expression or content are implicated in the mitochondrial dysfunction observed in schizophrenia (SCH), bipolar disorder (BD), and major depressive disorder (MDD). MtDNA gene expression and mtDNA content (including the *MT-ND4* deletion) were measured by RT-qPCR and qPCR, respectively. Post-mortem brain tissue from 60 subjects, divided evenly into four diagnostic groups (SCH, BD, MDD, and control (C)), was analyzed. *MT-ND1* gene expression was significantly increased in the BD group compared with the C group. MDD and SCH patients showed a similar pattern of mtDNA expression, which was different from that in BD patients. Similarly, a larger number of MDD and SCH patients tended to have the *MT-ND4* gene deleted compared with BD and C subjects. However, no other significant differences were observed in mtDNA gene expression and mtDNA content. Notably, high variability was observed in the mtDNA gene expression and content in each diagnostic group. Previous studies and the present work provide evidence for a role of mtDNA in SCH, BD and MDD. However, further studies with larger patient and control groups as well as by analyzing distinct brain regions are needed to elucidate the role of mtDNA in major psychiatric disorders. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** schizophrenia; major depressive disorder; bipolar disorder; mitochondrial genetics

## INTRODUCTION

### Mitochondrial DNA

Mitochondria are subcellular organelles responsible for providing energy for cellular processes. They are located in the cytoplasm and implicated in amino acid and lipid metabolism, apoptosis and calcium equilibrium. Each mitochondrion contains between 2 and 10 mitochondrial DNA molecules (mtDNA) that encode two ribosomal RNAs (*MT-RNR1* and *MT-RNR2* genes); 22 transfer RNAs; the displacement loop (D-loop), which is necessary for

replication and transcription; and 13 protein subunits of the electron transport chain (the *MT-ATP6*, *MT-ATP8*, *MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3*, *MT-CYB*, *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, and *MT-ND6* genes; Fig. 1). The remaining subunits for the electron transport chain are encoded in the nuclear genome. MtDNA is maternally inherited and more susceptible to somatic mutations than nuclear DNA. These mutations are frequently heteroplasmic such that mutated and wild-type molecules coexist in the same cell. Because of this variability, mtDNA was suggested to be a potential weak point of the genome related to the aging process and age-associated pathologies. Moreover, mtDNA is known to be involved in several clinical syndromes [Wallace et al., 1992; Taylor and Turnbull, 2005].

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Ministry of Science and Innovation in Spain; Grant numbers: PI06/1586, PS09/01052, FEDER; Grant sponsor: Generalitat de Catalunya.

\*Correspondence to:

Lourdes Martorell, Ph.D., Unitat de Psiquiatria, C/ Sant Llorenç, 21, Reus 43201, Spain. E-mail: lourdes.martorell@urv.cat

Article first published online in Wiley Online Library

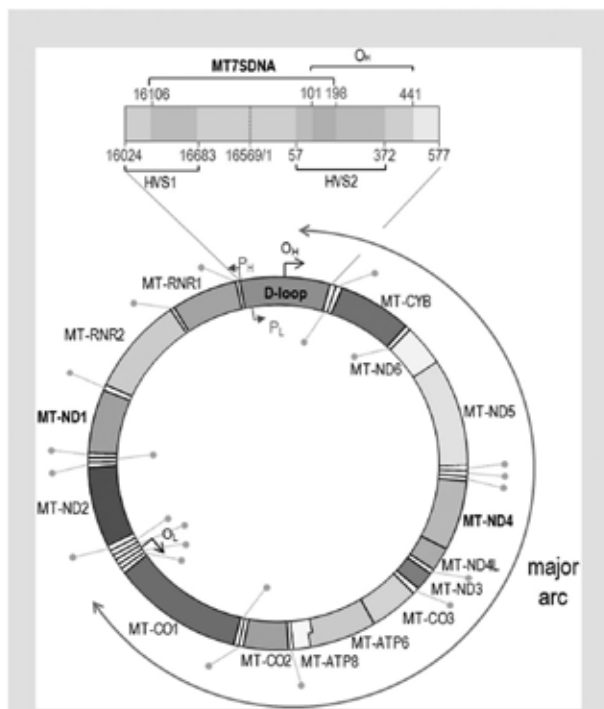
(wileyonlinelibrary.com): 25 January 2013

DOI 10.1002/ajmg.b.32134

### How to Cite this Article:

Torrell H, Montaña E, Abasolo N, Roig B, Gaviria AM, Vilella E, Martorell L. 2013. Mitochondrial DNA (mtDNA) in Brain Samples From Patients With Major Psychiatric Disorders: Gene Expression Profiles, MtDNA Content and Presence of the MtDNA Common Deletion. *Am J Med Genet Part B* 162B:213–223.





**FIG. 1.** Schematic representation of the mitochondrial genome. The majority of mtDNA deletions involve the major arc of the mitochondrial genome between the origin of heavy-strand replication [O<sub>H</sub>] and the origin of light-strand replication [O<sub>L</sub>]. P<sub>H</sub> and P<sub>L</sub> indicate the transcription promoters for the heavy and light strands, respectively. Gray dots mark the 22 transfer RNAs. HVS1 and HVS2 in the D-loop sequence indicate hypervariable segments 1 and 2, respectively.

### Mitochondrial Dysfunction in Psychiatric Disorders

Schizophrenia (SCH), bipolar disorder (BD), and major depressive disorder (MDD) are severe forms of mental illness that share some signs and symptoms. They have a complex etiology involving a major genetic contribution that interacts with environmental factors. Family studies [Tsuang et al., 1980; Taylor et al., 1993; McGuffin et al., 2003; Smoller and Finn, 2003] and recent genome-wide studies support a genetic overlap in these major psychiatric disorders [Huang et al., 2010; Gejman et al., 2011; Wray et al., 2012]. These studies, however, are far from providing biological explanations for the pathophysiology of these disorders. The mitochondrial dysfunction hypothesis has emerged as an explanation for the underlying heterogeneity of the clinical and pathological manifestations of SCH, BD, and MDD [Rollins et al., 2009; Scaglia, 2010]. Recently, it has been suggested that impaired mitochondrial function may cause defects in synaptic plasticity and cellular resilience that are now clearly associated with major psychiatric disorders [Manji et al., 2012]. Several lines of evidence support a role of mitochondrial dysfunction in major psychiatric disorders not only in clinical studies [Fattal et al.,

2006] but also at a molecular level [Rezin et al., 2009]. For instance, comorbidity with major mental disorders has been reported in patients with mitochondrial cytopathies [Fattal et al., 2007]. Fattal et al. reported fatigue, muscle weakness, and hearing loss as the most common features in patients who presented a mitochondrial disorder with psychiatric comorbidities. More recently, mood disorders, cognitive deterioration, psychosis, and anxiety have been identified as the most common psychiatric features in patients with mitochondrial dysfunction [Anglin et al., 2012]. Patients exhibiting psychiatric symptoms accompanied by various degrees of myopathic symptoms have also been reported [Kato et al., 2011]. In one genetic study, multiple mtDNA deletions were reported in a patient fitting DSM-IV criteria for MDD and with a positive family history of major psychiatric disorders including BD, MDD, and SCH [Mancuso et al., 2008]. In addition, several disease-associated mtDNA SNPs were found to have functional implications in major mental disorders [Kato and Kato, 2000; Washizuka et al., 2003; Munakata et al., 2004].

With respect to SCH, a transcriptomic, proteomic, and metabolomic study conducted in human brain tissue showed that genes related to energy metabolism and oxidative stress differentiated nearly 90% of SCH patients from controls [Prabakaran et al., 2004]. Additionally, mitochondrial hypoplasia, respiratory chain impairments and altered mitochondrial-related gene expression have been reported in SCH [Altar et al., 2005; Ben-Shachar, 2009]. Furthermore, some studies have found a maternal pattern of SCH inheritance. (Reviewed in Verge et al. [2011]).

Post-mortem studies comparing the prefrontal cortex of BD patients and healthy individuals have found that, in patients, (1) individual mitochondrial profiles covered smaller areas [Cataldo et al., 2010]; (2) complex I activity was decreased [Andreazza et al., 2010]; and (3) there was a higher incidence of mtDNA common deletion [Sequeira et al., 2012]. As in SCH, an increased risk of BD has been reported for maternal versus paternal relatives [McMahon et al., 1995].

Finally, a high prevalence of major depressive disorder has been reported in patients presenting mitochondrial cytopathies [Fattal et al., 2007] and MDD patients showed a significant decrease in mitochondrial ATP production rates in muscle [Gardner et al., 2003]. In addition, depressive disorders have been described in case histories of patients with mtDNA mutations [Koene et al., 2009; Ryu et al., 2009].

In summary, evidence supports the presence of mitochondrial dysfunction in SCH, BD, and MDD. Mitochondrial diseases often manifest with dysmyelination [Schoenfeld et al., 2010]. Therefore, to explore the hypothesis that mtDNA may be altered in the brain cells of these patients, this study was designed to evaluate the profiles of mtDNA expression, mtDNA content and mtDNA deletion in the myelinated region of the occipital cortex of SCH, BD, and MDD patients and control subjects.

### SUBJECTS AND METHODS

#### Brain Specimens

This study was conducted using specimens from the Neuropathology Consortium of the Stanley Brain Collection (Stanley Medical Research Institute (SMRI), Chevy Chase, MD) and was approved by the review board of the Hospital Universitari Psiquiàtric Institut

Pere Mata. This human brain collection consists of a selection of matched samples that includes 15 subjects in each of the following groups: SCH, BD, MDD, and control (C). Diagnoses were established according to the DSM-IV criteria [Torrey et al., 2000]. Fresh frozen blocks of occipital cortex, Brodmann Area 19, were shipped to our laboratory on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA, DNA, and protein were extracted. Clinical and post-mortem patient and control data are given in Supplementary Table I.

### RNA Extraction, Quantification, and Quality Measures

All lab areas were cleaned with RNaseZap (Ambion, Applied Biosystems [AB], Madrid, Spain) prior to RNA extraction. Total RNA from fresh-frozen occipital cortex sections was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen, Barcelona, Spain). The purity and quantification of the RNA were determined by spectrophotometry (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and the Experion system (Bio-Rad Laboratories, Barcelona, Spain) as described previously [Abasolo et al., 2011]. The Experion system was used to obtain information regarding the general state and quality of the RNA by determining the RNA Quality Indicator (RQI) value, which ranges from 1 (lowest quality) to 10 (highest quality). We previously reported a high correlation between RQI and the expression of reference genes in these same brain samples [Abasolo et al., 2011] and mentioned the necessity of controlling this variable in expression studies. Thus, three SCH, three BD, and four MDD samples were discarded due to low RNA Quality Index values ( $<5$ ) [Schroeder et al., 2006].

### DNase Treatment

Because mtDNA does not contain introns, total DNA removal is the best strategy to avoid co-amplification of residual DNA in expression studies. To eliminate contaminating DNA, the DNA-free™ DNase Treatment & Removal Reagent kit was used according to the manufacturer's instructions (Ambion, AB). Residues of the DNase reaction were eliminated by centrifugation. The efficiency of the treatment was assessed by comparing the Cq values of RNA samples treated with DNase with those of untreated samples. The difference between the Cq values was approximately three PCR cycles (data not shown).

### DNA Extraction and Quantification

All lab areas were cleaned with DNAZap (Ambion, AB) prior to DNA extraction. Total DNA from fresh-frozen occipital cortex sections was extracted using PureGene reagents (Qiagen). DNA was quantified by spectrophotometry (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific) and purity was assessed using the 260/280 OD ratio. The mean purity ratios of DNA are given in Supplementary Table I. One sample from the MDD group was discarded due to low DNA purity.

### Protein Extraction and Quantification

Post-mortem brain tissue from the occipital cortex of BD patients and C subjects was used for Western blot analysis due to the

significant differences in gene expression observed in these tissues. The same frozen blocks of occipital cortex were used for DNA and RNA extraction and Western blot experiments. The tissue was homogenized, delipidated, and quantified as we previously described in Roig et al. [2010].

### RT-qPCR for Gene Expression Analyses

Prior to the gene expression experiment, three high RQI RNAs ( $>7.5$ ) were chosen and six serial dilutions of these RNAs were run in triplicate with two objectives: (1) to determine the best quantity of RNA for the experiment and (2) to confirm that amplification efficiencies were approximately 100%. The optimum amount of RNA was 200 pg and the efficiency range was 93.8–114.6% (data not shown).

In the expression analysis of mitochondrial genes, reverse transcription was performed simultaneously with qPCR in a single reaction well using a TaqMan RNA-to- $C_T$  1-Step Kit (AB) and validated TaqMan gene expression assays in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (AB; part numbers are given in Supplementary Table II). The 15 mitochondrial genes (*MT-ATP6*, *MT-ATP8*, *MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3*, *MT-CYB*, *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6*, *MT-RNR1*, and *MT-RNR2*) and the 7S region of the D-loop were analyzed. The geometric mean of four nuclear genes (*GAPDH*, *RPL30*, *RPLP0*, and *RPS17*), which we previously identified as the most suitable of a 32-candidate set [Abasolo et al., 2011], was used as a reference for normalization. Each RT-qPCR reaction contained 4.25  $\mu\text{l}$  of RNA, 0.5  $\mu\text{l}$  of the validated TaqMan assay for the mitochondrial or reference gene, 0.25  $\mu\text{l}$  of RT enzyme mix and 5  $\mu\text{l}$  of TaqMan RNA-to- $C_T$  1-Step Master Mix (AB). All measurements were performed in triplicate in a 10- $\mu\text{l}$  final reaction volume and qPCR data were acquired using Sequence Detector software (SDS version 2.4, AB). Mean quantification cycle (Cq) values (also known as threshold cycle,  $C_t$ , values) were calculated as the average of three replicates if the SD was less than 0.3; otherwise, the individual Cq value was eliminated from the study and the remaining data were reanalyzed. Normalized expression was calculated for individual samples using the  $2^{-\Delta Cq}$  method (DataAssist Software v2.0, AB). Data from 4.6% of the wells were discarded. The non-template sample did not produce a signal in any assay or in the samples without the RT.

### qPCR for DNA Quantification

The qPCR analysis for mtDNA content was performed using the RNase P gene (*RPPH1*) as a reference gene and the 7S region, *MT-ND1* and *MT-ND4* as target genes. *RPPH1* is a single-copy nuclear gene that encodes the RNase P enzyme, the 7S region in the D-loop contains essential elements for mtDNA replication, *MT-ND1* is a rarely deleted gene in mitochondrial diseases and *MT-ND4* is located in the major arc of mtDNA (Fig. 1). Notably, most mtDNA deletions characterized in humans are located in the major arc [Tanhauser and Laipis, 1995; He et al., 2002]. The most frequent deletion is the 5-kb deletion, known as the common deletion, which belongs to the major arc. This deletion removes a 4,977-bp section of mitochondrial DNA that encompasses five

tRNA genes and seven polypeptide genes between nucleotide positions 8470 and 13447, which are *MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO3*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, and *MT-ND5* [Soong and Arnheim, 1996]. As *MT-ND4* has been described to be deleted in 97% of all common deletion molecules [Meissner et al., 2006], we assumed we were testing for the mitochondrial common deletion.

Prior to the experiment, three representative DNA samples were chosen based on good purity (OD 260/280 ratio between 1.7 and 2) and six serial dilutions were run in triplicate to identify the best quantity of DNA to use for the experiment. The optimum amount of DNA was 1 ng and the efficiency range of qPCR was 94.17–108.7% (data not shown). In addition, NCBI Nucleotide BLAST was performed following recent recommendations to ensure that all Taqman probes used to amplify mtDNA genes do not amplify pseudogenes [Malik and Czajka, 2012]. Target and reference genes were amplified in separate wells in quadruplicate. Each reaction included 2 µl of DNA, 0.5 µl of the validated TaqMan assay for each gene, 5 µl of Universal TaqMan PCR master mix (AB) and 2.5 µl of nuclease-free water in a 10-µl final reaction volume. qPCR data were acquired using Sequence Detector software (SDS version 2.4, ABI). Cq values were calculated as the average of four replicates if the SD was less than 0.3; otherwise, the individual Cq value was eliminated from the study and the remaining data were reanalyzed. Gene content data were calculated for individual samples using the  $2^{-\Delta Cq}$  method. The non-template sample did not produce a signal in any assay.

### Western Blot for ND1 Protein Quantification

A 50 µg aliquot of protein per sample was subjected to SDS-PAGE on 4–12% Novex BisTris gels and transferred to a nitrocellulose membrane using an iBlot Dry Blotting System (Invitrogen). The membranes were blocked for 1 hr at room temperature in 1% Tris-buffered saline (TBS) with 4% ECL Advance Blocking Agent (GE HealthCare, Barcelona, Spain). Anti-ND1 antibody (rabbit polyclonal, Abcam ab74257, dilution 1:500) was added to TBS containing 2% ECL Advance Blocking Agent and the blots were incubated at 4°C overnight. The blots were then washed and subsequently incubated with peroxidase-labeled anti-rabbit secondary antibody (1:2,000, Dako, Barcelona, Spain) diluted in TBS containing 2% ECL Advance Blocking Agent for 30 min at room temperature. Then, the blots were developed using an ECL detection system (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) and visualized using the ChemiDoc System (Bio-Rad, Madrid, Spain). Finally, the blots were incubated with Mild Antibody Stripping Solution 1X (Amersham) for 15 min at room temperature and re-blotted with anti-GAPDH antibody (mouse polyclonal, Ambion AM4300, 1:1,000). The process was performed as described above except that the blots were incubated with peroxidase-labeled anti-mouse secondary antibody (1:5,000, Dako).

The bands representing the two proteins of interest were quantified using ImageLab 3.0 (Bio-Rad, Barcelona, Spain). The volume of each ND1 protein band was normalized to the volume of the corresponding GAPDH protein band. The number obtained was referred to as the “normalized ND1 protein level” and was used for the statistical analysis.

### Statistical Analyses

To determine whether mtDNA gene expression or mtDNA content was associated with specimen characteristics, a series of statistical analyses were performed. Distributions for all dependent variables were examined by the Kolmogorov–Smirnov test of normality. Because both mtDNA expression and mtDNA content data did not have a normal distribution, Spearman correlation analyses were conducted between mRNA expression or mtDNA content and RQI, DNA purity, age at death, duration of the disease, age of onset, lifetime quantity of fluphenazine (or equivalent) intake, pH, brain mass, PMI, and storage time.

The *MT-ND4* deletion for each individual was calculated as the ratio between the *MT-ND1* and *MT-ND4* gene content.

The non-parametric Mann–Whitney *U*-test was used to determine whether mtDNA expression, mtDNA content and *MT-ND4* deletion presented statistically significant differences between patients and controls and between each diagnostic group and the control group. The Mann–Whitney *U*-test was also used to compare normalized ND1 protein levels between BD patients and controls. All tests were two-tailed and statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

The Kruskal–Wallis test was performed to determine whether *MT-ND1*, *MT-ND4* and 7S region contents were distributed differently within the patient groups and the C group.

Finally, Spearman correlation analyses were conducted to compare the mRNA expression and mtDNA contents of the *MT-ND1* and *MT-ND4* genes and the 7S region. Likewise, Spearman correlation analyses were conducted to compare the normalized ND1 protein levels and *MT-ND1* mRNA expression.

All statistical analyses were performed with SPSS v19.0 (Chicago, IL).

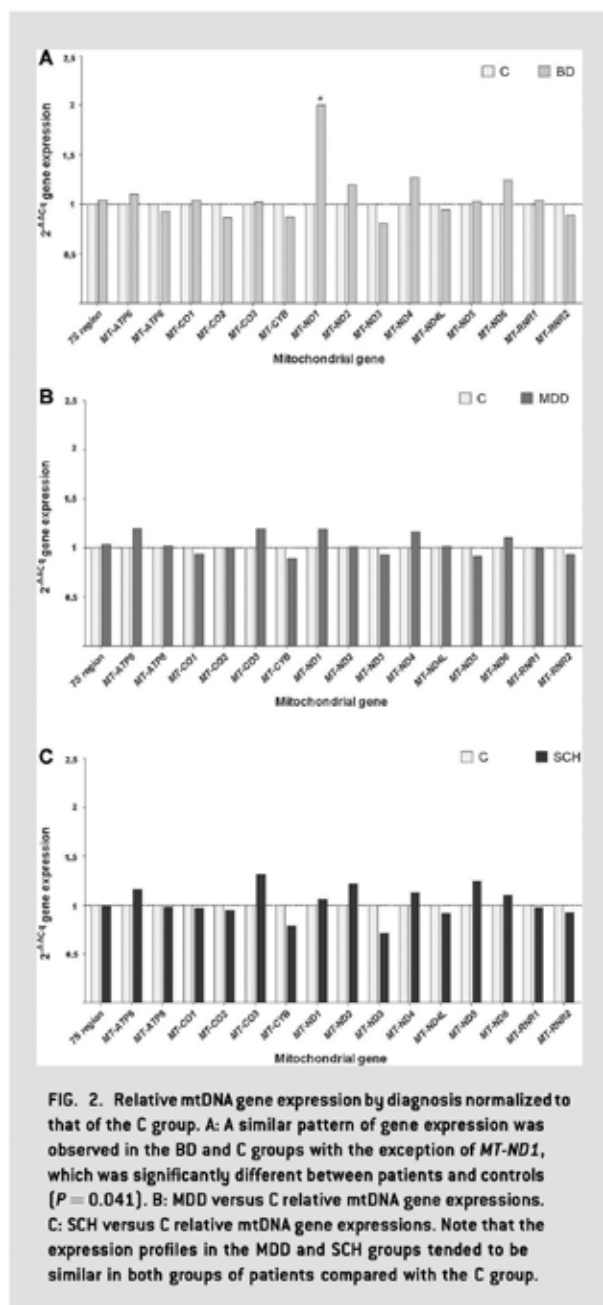
## RESULTS

### Correlation Between mtDNA Gene Expression or Content and Sample Characteristics

After examination of all variables, mtDNA expression was not found to correlate with age at death, duration of the disease, age of onset, lifetime quantity of fluphenazine (or equivalent) intake, brain mass, PMI, or storage time, regardless of the mitochondrial gene analyzed. Gene expression correlated with RQI and pH, but this correlation disappeared when samples with an RQI < 5 were eliminated (data not shown). Similarly, mtDNA content and ND1 protein levels did not correlate with any of these specimen characteristics. In addition, mtDNA expression, mtDNA content and normalized ND1 protein levels did not differ significantly as a function of gender, brain hemisphere, death by suicide or history of substance abuse.

### MtDNA Expression in the SCH, BD, MDD, and C Groups

When considering the gene expression data, *MT-ND1* gene expression was significantly higher in the BD group compared with the C group ( $P = 0.041$ , Fig. 2A). Notably, the *MT-ND1* expression in BD patients differed from that in SCH patients ( $P = 0.012$ ) but not from that in MDD patients ( $P = 0.674$ ). No other significant



**FIG. 2.** Relative mtDNA gene expression by diagnosis normalized to that of the C group. **A:** A similar pattern of gene expression was observed in the BD and C groups with the exception of *MT-ND1*, which was significantly different between patients and controls ( $P = 0.041$ ). **B:** MDD versus C relative mtDNA gene expressions. **C:** SCH versus C relative mtDNA gene expressions. Note that the expression profiles in the MDD and SCH groups tended to be similar in both groups of patients compared with the C group.

association with the diagnoses was observed for any mtDNA gene, however, a similar expression profile was observed in SCH and MDD groups (Fig. 2B,C). In addition, *MT-CYB* and *MT-ND3* tended to be decreased in SCH subjects (Fig. 2C), although no significant differences were found. Apart from those observations, expression levels were very different within the mitochondrial genes, showing high variability in each group and no differences

between groups. For instance, while the *MT-ND1* gene had a very low expression level, ribosomal RNAs (*MT-RNR1* and *MT-RNR2* genes) were highly expressed (Supplementary Fig. 1).

### Correlation Between ND1 Protein Level and *MT-ND1* mRNA Expression in BD Patients

We wanted to determine whether the significant differences in the mRNA expression of the *MT-ND1* gene in BD patients were maintained at the protein level. To this end, we performed a Western blot analysis using lysates from BD patients and C subjects. The ND1 protein level was normalized to the GAPDH protein level in each sample and the value obtained was correlated with the *MT-ND1* mRNA expression. We did not find a correlation between *MT-ND1* mRNA expression and ND1 protein levels ( $r^2 = -0.276$ ;  $P = 0.203$ ). In fact, the median ND1 protein level in BD patients was lower than that in the C group (BD = 0.101; C = 0.130;  $U = 37.5$ ;  $P = 0.079$ ).

### MtDNA Content in the SCH, BD, MDD, and C Groups

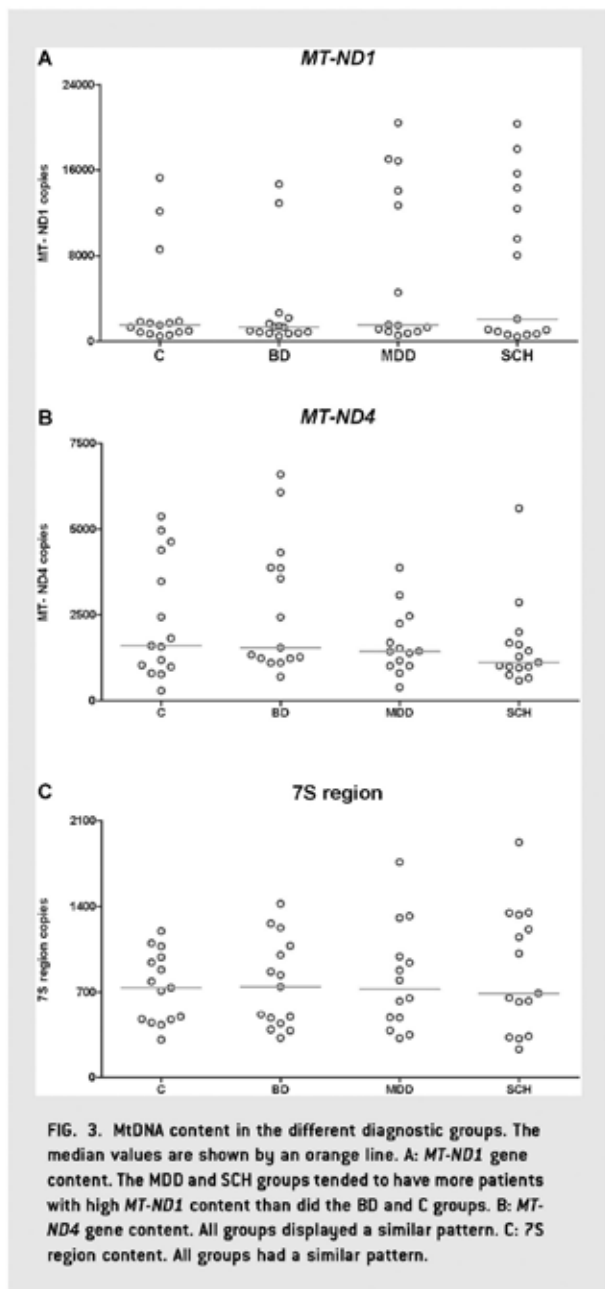
Similar to the mtDNA expression data, there was also high variability in mtDNA content between both inter- and intra-group individuals (Fig. 3). As can be observed, the copy number range was highest for *MT-ND1* (431–20,385 copies), followed by *MT-ND4* (300–6,596 copies) and was lowest in the 7S region (233–1,924 copies). The mtDNA content, however, did not significantly differ according to diagnosis for any of the three genes; that is, the median values were similar in each group, as determined by the Kruskal–Wallis test.

There was no correlation between *MT-ND1*, *MT-ND4*, and 7S region DNA content and their respective RNA expression levels ( $r^2 = 0.298$ ,  $P = 0.062$ ;  $r^2 = 0.039$ ,  $P = 0.781$ ; and  $r^2 = 0.168$ ,  $P = 0.260$ , respectively).

### *MT-ND4* Deletion in the SCH, BD, MDD, and C Groups

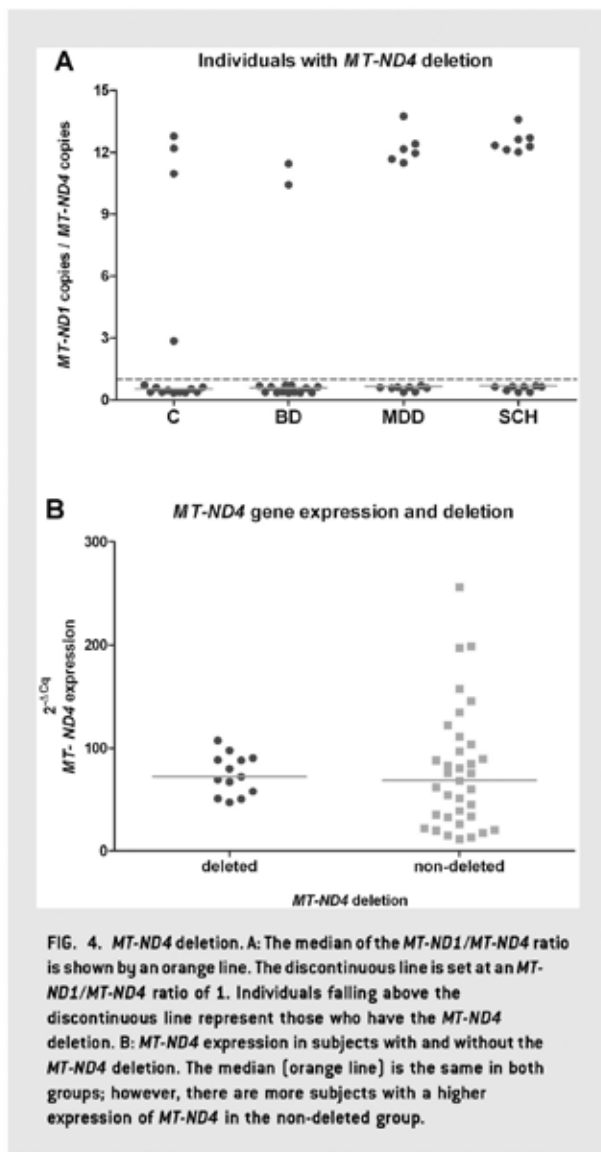
The presence of *MT-ND4* deletion was assessed by comparing the *MT-ND1* and *MT-ND4* contents. A deletion was considered to be present when the ratio *MT-ND1*/*MT-ND4* was  $>1$ . In 18 of 60 individuals, the *MT-ND1* content was 10–14-fold higher than the *MT-ND4* content, indicating a deletion (Fig. 4A). Similar results were obtained when the *MT-ND1*/7S region ratio was calculated and these two ratios showed a significant Spearman correlation ( $r^2 = 0.774$ ,  $P < 0.0001$ ). Although there were no significant differences in the *MT-ND1* and *MT-ND4* content between diagnoses, the SCH and MDD groups tended to have more patients with the *MT-ND4* deletion (six and seven subjects, respectively) than did the BD and C groups (three and two subjects, respectively). However, we did not find any significant differences among the distributions of individuals presenting with the deletion among the diagnostic groups ( $X^2 = 5.426$ ;  $P = 0.143$ ).

*MT-ND4* expression was similar in subjects who had a deletion of this gene and those who did not. Although the median level of gene expression was similar in both groups, the range of *MT-ND4* expression values was wider in the group without the *MT-ND4* deletion than in the group with the deletion (Fig. 4B).



**DISCUSSION**

In the present study, we have tested the hypothesis that the mtDNA gene expression, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion in SCH, BD, and MDD patients differs from that in C subjects and contributes to the mitochondrial dysfunction observed in these illnesses. MtDNA alterations may be a common feature in the complex etiology of these severe mental disorders, as



some patterns of maternal inheritance have been observed in SCH [reviewed in Verge et al., 2011] and BD [McMahon et al., 1995]. Furthermore, matrilineal relatives were significantly more likely to suffer from a mood disorder [Bergemann and Boles, 2010] and SCH [Verge et al., 2012] than non-matrilineal relatives. Therefore, although psychiatric disorders are not maternally linked, there is some evidence that sharing mtDNA with an affected MDD or SCH patient is a risk factor for developing MDD or SCH, respectively.

One of the most frequent central nervous system abnormalities in multisystem mitochondrial disorders is white matter deterioration. It is likely that white matter lesions are due to an underlying defect in the respiratory chain or concomitant oxidative stress that results in neuronal death and the replacement of neurons by glial cells [Finsterer and Mahjoub, 2012]. In addition, a postmortem and

neuroimaging study indicated an increased prevalence of deep white matter lesions in major psychiatric disorders [Regenold et al., 2007]. Therefore, we analyzed the mtDNA expression, content and presence of the common deletion in a myelinated region of the brain in SCH, BD and MDD patients because the mtDNA is vital to the proper function of the respiratory chain [Schapira, 2006] and can be altered in these disorders.

### MtDNA Gene Expression

The implication of mtDNA in mitochondrial disorders is well-known and many studies have tested the role of mtDNA mutations in these illnesses [Bataillard et al., 2001; Sacconi et al., 2002; Salpietro et al., 2003; Guillausseau et al., 2004; Raspall-Chaure et al., 2004; Castagna et al., 2007; Horvath et al., 2007]. However, expression studies of genes encoded by the mitochondrial genome are scarce and those related to major psychiatric disorders are even more scarce. Therefore, the expression of all mitochondrial transcripts in the human occipital cortex was examined in SCH, BD, and MDD patients as well as control subjects. Expression was normalized using a geometric mean of Cq data of four suitable nuclear reference genes. Similarly, only specimens with a minimum RNA quality were considered in all statistical tests. The main finding of this study is that there was an increased expression of *MT-ND1* in BD patients compared with C subjects. The *MT-ND1* gene has been reported as a possible target gene in BD [Munakata et al., 2005, 2007]. Although its function in complex I activity remains unclear, the incorrect expression of *MT-ND1* could alter the normal functioning of this complex. In this sense, decreased complex I activity in the prefrontal cortex has been reported in BD patients but not in MDD or SCH patients [Andreazza et al., 2010]. Furthermore, the up-regulation of mitochondrial- and nuclear-encoded genes implicated in electron chain transport has been described in BD blood cells, including those from complex I [Beech et al., 2010]. This dysfunction in the electron transport chain may be associated with the susceptibility of BD patients to damage through oxidative stress and involves either nuclear- or mitochondrial-encoded genes [Wang, 2007]. These findings along with those of the present study suggest that *MT-ND1* may be implicated somehow in the functional complex I impairment observed in BD. The fact that the *MT-ND1* expression in BD patients differed from that in SCH but not MDD patients suggests that this expression pattern may be a common feature for affective rather than psychotic disorders. Nevertheless, no difference in *MT-ND1* expression between BD patients and C individuals was observed at the protein level. Unfortunately, no ELISA preparation for ND1 protein level detection is available and it is possible that Western blotting is not the ideal technique for the quantitative analysis of this protein. Therefore, we are not able to confirm that the differences detected by RT-qPCR in *MT-ND1* expression are not present at the protein level. On the other hand, it is also possible that *MT-ND1* expression is increased in BD patients while ND1 protein expression is not. Unfortunately, little is known about the molecular processes that regulate mtDNA replication, expression and translation apart from the requirement for several nuclear transcription factors, such as *TFAM*, *TFB1* and *TFB2* [Larsson et al., 1998; Falkenberg et al., 2002]. Furthermore, a recent report indicated that the mtDNA can be damaged directly by

reactive oxygen species, as well as modulated by several epigenetic mechanisms [Chinnery et al., 2012]. We have shown that mtDNA expression levels are distinct for every mtDNA gene and that *MT-ND1* is expressed at the lowest level (Supplementary Fig. 1), despite having the highest mtDNA content (Fig. 3). Therefore, as-yet unknown factors may be involved in the regulation of *MT-ND1* expression in BD patients and future studies will be required to elucidate the relationships between mtDNA content, expression and translation.

In contrast, a significant effect of diagnosis on mtDNA expression was not detected in the SCH and MDD groups. These results, however, are difficult to compare with the scientific literature. Although the hypothesis of mitochondrial involvement in mental disorders is widely accepted, the majority of studies have focused on mitochondrial genes encoded in the nuclear genome. Most of these studies have reported generalized mitochondrial dysfunction in psychiatric disorders and decreased mitochondrial gene expression in the prefrontal cortex of SCH, BD and MDD patients compared with C subjects [Konradi et al., 2004; Iwamoto et al., 2005; Vawter et al., 2006]. There is only one study that tested mtDNA expression in brain samples from patients with major psychiatric disorders [Shao et al., 2008], in which Shao et al. checked mitochondrial gene expression in the dorsolateral prefrontal cortex. Three reference genes were used for normalization, two of which were different from those used in the present study; the brain region examined was also different from that in the present study. In addition, the data in this study were not adjusted for RQI but rather for pH, age, and gender covariates. As a result, these authors found a significant decrease in general mitochondrial gene expression in MDD and SCH but not in BD patients. When the mtDNA expression was normalized using the D-loop as a reference gene, however, they also identified an increased expression of *MT-ND1* and *MT-ND5* in BD patients. Thus, the fact that the present study differs from that of Shao et al. in several methodological respects should be highlighted.

### MtDNA Content

To examine mtDNA content, two mitochondrial genes (*MT-ND1* and *MT-ND4*) and the 7S region were assessed. There were no significant differences between diagnostic groups. Although there was high variability in mtDNA content within subjects from the same group in all cases, there was more variability in the MDD and SCH groups. Only one study in the literature focused on major psychiatric disorders and mtDNA content in human brain samples [Sabunciyan et al., 2007]. Sabunciyan and colleagues quantified mtDNA levels and the 5-kb common mitochondrial deletion (which involves the *MT-ND4* gene) in frontal cortex samples from SCH, BD, and MDD patients and normal subjects. In contrast to our methods, they assessed mtDNA content with primers targeting a different region of the D-loop (HVR2 instead of 7S) and the common deletion with primers that amplify the *MT-ATP8* gene (also involved in the major arc). Similar to the results of the present study, they did not find a significant difference in the mtDNA content or mtDNA common deletion between controls and patients. The mtDNA content, however, may depend on the brain region, as the mtDNA deletion ratio has been shown to depend on it [Soong et al., 1992; Meissner et al., 2008].

Finally, no correlation between *MT-ND1*, *MT-ND4*, and 7S region DNA content and their respective RNA expression levels was found, suggesting that mtDNA expression was not directly related to mtDNA content. It is well-known that mtDNA content varies among different tissues and at different ages in the same individual [Venegas et al., 2011]. Additionally, it has been estimated that approximately 200–300 nuclear genes are required to replicate and express the 13 proteins encoded in the mtDNA. Therefore, nuclear-mitochondrial communication is a highly complex process that is governed by the nucleus; the mtDNA encodes none of the factors required for the replication, transcription and translation of mtDNA genes. Moreover, it is well-known that pathogenic mutations in mtDNA do not exert a major influence on phenotype until the proportion of the mutant mtDNA genomes exceeds a critical threshold, estimated to be approximately 75% of the total molecules [Bogenhagen, 2012]. However, it has been reported that specific mtDNA mutations are mostly associated with an up-regulation of mtDNA transcripts [Reinecke et al., 2009]. Then, it can be hypothesized that mtDNA expression depends more on the mtDNA sequence than on the mtDNA content. Interestingly, the mtDNA sequence was described to interact with the nuclear genome to modify cognition at the phenotypic level in a study on mice by Roubertoux et al. [2003].

## MtDNA Deletion

The hypothesis of the involvement of mtDNA deletions in major psychiatric disorders is widely accepted and it has been investigated more deeply than the involvement of mitochondrial gene expression or content. Although the difference was not statistically significant, there were more patients with the common deletion in the MDD ( $P = 0.093$ ) and SCH ( $P = 0.067$ ) groups than in the BD and C groups. In 1997, Kato et al. [1997] reported an association between BD and the common deletion in cerebral cortex tissue using a small sample size of seven BD patients and nine controls. Kakiuchi et al. [2005] analyzed the mtDNA deletion by comparing the copy numbers of the *MT-ND4* and *MT-ND1* genes in SCH and BD and did not observe an association between mtDNA deletions and these two major mental disorders [Kakiuchi et al., 2005]. Sequeira et al. [2012] have recently reported that the common deletion was increased in BD but not in SCH or MDD patients. They tested the frontal cortex instead of the occipital cortex and it is well-known that the mtDNA deletion ratio differs between brain regions [Meissner et al., 2008]. Similarly, Fuke et al. [2008] assessed the accumulation of the common deletion in post-mortem frontal cortex tissue from SCH and BD patients and C subjects using the same method used in the present study but with different specific primers. They found an age-dependent accumulation of the common mtDNA deletion but no significant association between the common deletion and the two studied major mental disorders. In our study, an association between age and the common deletion was not found in any diagnostic group, likely due to the small age range. Finally, Shao et al. [2008] assessed the ratio of the deletion in the prefrontal cortex of SCH, BD, and MDD patients compared with that of controls. They calculated the deletion ratio by comparing the amount of *MT-ND4* to the amount of D-loop, whereas we compared the amount of *MT-ND4* and *MT-ND1*. However, in contrast

to our methods, they adjusted the data for age and gender and did not compare the mtDNA content to a nuclear gene. As a result, they found higher levels of the deletion in BD than in SCH or MDD patients compared with the controls. These results differed from ours, probably due to methodological differences in terms of calculating gene content. Our results suggest that it is likely that the common deletion also covers the 7S region of the D-loop and, therefore, that the deletion ratio should not be calculated by comparing the *MT-ND4* content and the 7S region. Consequently, several mtDNA regions have been assessed to quantify the mtDNA content and the mtDNA deletion and several nuclear genes have also been used as reference genes to obtain the mtDNA content. We recommend that future studies should use the *MT-ND1* content to assess the number of non-deleted copies and the *MT-ND4* or the 7S region to assess the number of deleted copies.

## Limitations of This Study

The results must be interpreted in the context of several limitations. First, as our primary variables of interest were not normally distributed, our statistical analyses relied on nonparametric tests. This type of test was also necessary because the number of subjects per group was small (15). The results, however, are an approximation of what is happening in the mitochondria of major psychiatric patients and suggest a possible role of this organelle in the etiology of psychiatric disorders. We should stress that the study design and technical analyses meet the criteria of the MIQE guidelines for RT-qPCR and qPCR studies [Bustin et al., 2010]. Furthermore, this study design is particularly useful for mitochondrial genetics because it explores the role of mtDNA itself in major psychiatric disorders. While other studies analyzed nuclear mitochondrial genes and did not pay attention to the mitochondrial DNA content or expression profile, we performed a complete analysis of the transcription of all genes encoded in the mitochondrial genome. We also assessed the copy number of these genomes in patients with different major psychiatric disorders.

Second, although the strength of this study lies in the fact that we worked with brain samples, different neuroimaging studies have shown that functional differences in brain activity in major psychiatric disorders seem to most commonly occur in the frontal lobes, hippocampus and temporal lobes. However, Katsel et al. [2005] showed that the dorsolateral prefrontal cortex presented fewer altered transcripts compared with other brain areas, including the temporal and cingulate cortices and hippocampus. Thus, the importance of the dorsolateral prefrontal cortex above all the other brain regions has not been confirmed. The occipital cortex is involved in visual memory and the interpretation of visual images and can be related to visual hallucinations. In addition, it is a heavily myelinated region that may be implicated in the development of major psychiatric disorders. For all of these reasons, the occipital cortex should not be omitted from studies on major psychiatric disorders.

## CONCLUSIONS

In summary, our study provides data on mtDNA expression and content in occipital cortex samples from SCH, BD and MDD

patients compared with C subjects. Our data suggest that mtDNA may be implicated in the pathophysiology of SCH, BD and MDD. A significant increase in *MT-ND1* expression in the BD group compared with the C group was observed. This result agrees with the incidence of mitochondrial dysfunction in complex I reported in BD patients. In addition, more SCH and MDD patients tended to have the common deletion when compared with C subjects, although no statistical differences were observed. Therefore, this study provides some evidence supporting a possible implication of mtDNA in SCH, BD, and MDD. The role of mtDNA in major psychiatric disorders requires further investigation with larger patient and control groups as well as by analyzing distinct brain regions.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants PI06/1586, PS09/01052, and FEDER from the Instituto de Salud Carlos III of the Ministry of Science and Innovation in Spain. Helena Torrell was funded by an FI-DGR scholarship from the Generalitat de Catalunya. Post-mortem brain tissue was donated by the Stanley Medical Research Institute (SMRI). We would like to acknowledge the technicians from the Biobanc-IISPV for sample management; Esther Rodríguez-Gallego from the Centre de Recerca Biomèdica from Hospital Universitari Sant Joan de Reus for their help in performing the Western blot analysis and Bea Cabot from Applied Biosystems Support for technical assistance.

## REFERENCES

Abasolo N, Torrell H, Roig B, Moyano S, Vilella E, Martorell L. 2011. RT-qPCR study on post-mortem brain samples from patients with major psychiatric disorders: Reference genes and specimen characteristics. *J Psychiatr Res* 45:1411–1418.

Altar CA, Jurata LW, Charles V, Lemire A, Liu P, Bukhman Y, Young TA, Bullard J, Yokoe H, Webster MJ, Knable MB, Brockman JA. 2005. Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biol Psychiatry* 58:85–96.

Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. 2010. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 67:360–368.

Anglin RE, Garside SL, Tarnopolsky MA, Mazurek MF, Rosebush PI. 2012. The psychiatric manifestations of mitochondrial disorders: A case and review of the literature. *J Clin Psychiatry* 73:506–512.

Bataillard M, Chatzoglou E, Rumbach L, Sternberg D, Tournade A, Laforet P, Jardel C, Maisonobe T, Lombes A. 2001. Atypical MELAS syndrome associated with a new mitochondrial tRNA glutamine point mutation. *Neurology* 56:405–407.

Beech RD, Lowthert L, Leffert JJ, Mason PN, Taylor MM, Umlauf S, Lin A, Lee JY, Maloney K, Muralidharan A, Lorberg B, Zhao H, Newton SS, Mane S, Epperson CN, Sinha R, Blumberg H, Bhagwagar Z. 2010. Increased peripheral blood expression of electron transport chain genes in bipolar depression. *Bipolar Disord* 12:813–824.

Ben-Shachar D. 2009. The interplay between mitochondrial complex I, dopamine and Sp1 in schizophrenia. *J Neural Transm* 116:1383–1396.

Bergemann ER, Boles RG. 2010. Maternal inheritance in recurrent early-onset depression. *Psychiatr Genet* 20:31–34.

Bogenhagen DF. 2012. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta* 1819:914–920.

Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. 2010. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 11:74.

Castagna AE, Addis J, McInnes RR, Clarke JT, Ashby P, Blaser S, Robinson BH. 2007. Late onset leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. *Am J Med Genet Part A* 143A: 808–816.

Cataldo AM, McPhie DL, Lange NT, Punzell S, Elmiligy S, Ye NZ, Froimowitz MP, Hassinger LC, Menesale EB, Sargent LW, Logan DJ, Carpenter AE, Cohen BM. 2010. Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. *Am J Pathol* 177:575–585.

Chinnery PF, Elliott HR, Hudson G, Samuels DC, Relton CL. 2012. Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41:177–187.

Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. 2002. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 31:289–294.

Fattal O, Budur K, Vaughan AJ, Franco K. 2006. Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases. *Psychosomatics* 47:1–7.

Fattal O, Link J, Quinn K, Cohen BH, Franco K. 2007. Psychiatric comorbidity in 36 adults with mitochondrial cytopathies. *CNS Spectr* 12:429–438.

Finsterer J, Mahjoub SZ. 2012. Primary mitochondrial arteriopathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22:393–399.

Fuke S, Kametani M, Kato T. 2008. Quantitative analysis of the 4977-bp common deletion of mitochondrial DNA in postmortem frontal cortex from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci Lett* 439:173–177.

Gardner A, Johansson A, Wibom R, Nennesmo I, von Döbeln U, Hagenfeldt L, Hallström T. 2003. Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J Affect Disord* 76:55–68.

Gejman PV, Sanders AR, Kendler KS. 2011. Genetics of schizophrenia: New findings and challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 12: 121–144.

Guillausseau PJ, Dubois-Laforgue D, Massin P, Laloi-Michelin M, Bellanne-Chantelot C, Gin H, Bertin E, Blickle JF, Bauduceau B, Bouhanick B, Cahen-Varsaux J, Casanova S, Charpentier G, Chedin P, Derrien C, Grimaldi A, Guerci B, Kaloustian E, Lorenzini F, Murat A, Olivier F, Paques M, Paquis-Flucklinger V, Tielmans A, Vincenot M, Vialettes B, Timsit J, GEDIAM, Mitochondrial Diabetes French Study Group. 2004. Heterogeneity of diabetes phenotype in patients with 3243 bp mutation of mitochondrial DNA (maternally inherited diabetes and deafness or MIDD). *Diabetes Metab* 30:181–186.

He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM. 2002. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e68.

Horvath R, Kley RA, Lochmüller H, Vorgerd M. 2007. Parkinson syndrome, neuropathy, and myopathy caused by the mutation A8344G (MERRF) in tRNALys. *Neurology* 68:56–58.

Huang J, Perlis RH, Lee PH, Rush AJ, Fava M, Sachs GS, Lieberman J, Hamilton SP, Sullivan P, Sklar P, Purcell S, Smoller JW. 2010. Cross-disorder genome-wide analysis of schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am J Psychiatry* 167:1254–1263.



- Iwamoto K, Bundo M, Kato T. 2005. Altered expression of mitochondrial-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet* 14:241–253.
- Kakiuchi C, Ishiwata M, Kametani M, Nelson C, Iwamoto K, Kato T. 2005. Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletions in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:515–522.
- Kato T, Kato N. 2000. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2:180–190.
- Kato T, Stine OC, McMahon FJ, Crowe RR. 1997. Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brain of patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 42:871–875.
- Kato M, Nakamura M, Ichiba M, Tomiyasu A, Shimo H, Higuchi I, Ueno S, Sano A. 2011. Mitochondrial DNA deletion mutations in patients with neuropsychiatric symptoms. *Neurosci Res* 69:331–336.
- Katsel P, Davis KL, Gorman JM, Haroutunian V. 2005. Variations in differential gene expression patterns across multiple brain regions in schizophrenia. *Schizophr Res* 77:241–252.
- Koene S, Kozicz TL, Rodenburg RJ, Verhaak CM, de Vries MC, Wortmann S, van de Heuvel L, Smeitink JA, Morava E. 2009. Major depression in adolescent children consecutively diagnosed with mitochondrial disorder. *J Affect Disord* 114:327–332.
- Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S. 2004. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 61:300–308.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231–236.
- Malik AN, Czajka A. 2012. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* 12:1567–7249:00232–00232.
- Mancuso M, Ricci G, Choub A, Filosto M, DiMauro S, Davidzon G, Tessa A, Santorelli FM, Murri L, Siciliano G. 2008. Autosomal dominant psychiatric disorders and mitochondrial DNA multiple deletions: Report of a family. *J Affect Disord* 106:173–177.
- Manji H, Kato T, DiProspero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, Chen G. 2012. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13:293–307.
- McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A. 2003. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry* 60:497–502.
- McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, DePaulo JR. 1995. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 56:1277–1286.
- Meissner C, Bruse P, Oehmichen M. 2006. Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age. *Exp Gerontol* 41:518–524.
- Meissner C, Bruse P, Mohamed SA, Schulz A, Warnk H, Storm T, Oehmichen M. 2008. The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: A useful biomarker or more? *Exp Gerontol* 43:645–652.
- Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kunugi H, Tadokoro K, Ozaki N, Inada T, Sakamoto K, Fukunaga T, Iijima Y, Iwata N, Tatsumi M, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T. 2004. Mitochondrial DNA 3644T->C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics* 84:1041–1050.
- Munakata K, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. 2005. Mitochondrial DNA 3243A > G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 57:525–532.
- Munakata K, Fujii K, Nanko S, Kunugi H, Kato T. 2007. Sequence and functional analyses of mtDNA in a maternally inherited family with bipolar disorder and depression. *Mutat Res* 617:119–124.
- Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JTJ, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Trachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S. 2004. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry* 9:684–697.
- Raspall-Chaure M, Solano A, Vazquez E, Macaya-Ruiz A, del Toro-Riera M, Cabezuolo-Briones A, Montoya J, Andreu A, Roig-Quilis M. 2004. A patient with bilateral lesion in the striatum and slowly progressive dystonia secondary to T14487C mutation in the ND6 gene of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *Rev Neurol* 39:1129–1132.
- Regenold WT, Phatak P, Marano CM, Gearhart L, Viens CH, Hisley KC. 2007. Myelin staining of deep white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and unipolar major depression. *Psychiatry Res* 151:179–188.
- Reinecke F, Smeitink JA, van der Westhuizen FH. 2009. OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* 1792:1113–1121.
- Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. 2009. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res* 34:1021–1029.
- Roig B, Franco-Pons N, Martorell L, Tomàs J, Vogel WF, Vilella E. 2010. Expression of the tyrosine kinase discoidin domain receptor 1 (DDR1) in human central nervous system myelin. *Brain Res* 1336:22–29.
- Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Wallace DC, Bunney WE, Vawter MP. 2009. Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS ONE* 4:e4913.
- Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, Marcet B, Maarouf-Veray F, Cherif C, Marican C, Arrechi P, Godin F, Jamon M, Verrier B, Cohen-Salmon C. 2003. Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet* 35:65–69.
- Ryu JS, Lee SJ, Sung IY, Ko TS, Yoo HL. 2009. Depressive episode with catatonic features in a case of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *J Child Neurol* 24:1307–1309.
- Sabuncuyan S, Kirches E, Krause G, Bogerts B, Mawrin C, Llenos IC, Weis S. 2007. Quantification of total mitochondrial DNA and mitochondrial common deletion in the frontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *J Neural Transm* 114:665–674.
- Sacconi S, Salviati L, Gooch C, Bonilla E, Shanske S, DiMauro S. 2002. Complex neurologic syndrome associated with the G1606A mutation of mitochondrial DNA. *Arch Neurol* 59:1013–1015.
- Salpietro CD, Briuglia S, Merlino MV, Di Bella C, Rigoli L. 2003. A mitochondrial DNA mutation (A3243G mtDNA) in a family with cyclic vomiting. *Eur J Pediatr* 162:727–728.
- Scaglia F. 2010. The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease. *Dev Disabil Res Rev* 16:136–143.
- Schapira AH. 2006. Mitochondrial disease. *Lancet* 368:70–82.
- Schoenfeld R, Wong A, Silva J, Li M, Itoh A, Horiuchi M, Itoh T, Pleasure D, Cortopassi G. 2010. Oligodendroglial differentiation induces mitochondrial genes and inhibition of mitochondrial function represses oligodendroglial differentiation. *Mitochondrion* 10:143–150.

- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. 2006. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3.
- Sequeira A, Martin MV, Rollins B, Moon EA, Bunney WE, Macciardi F, Lupoli S, Smith EN, Kelsoe J, Magnan CN, van Oven M, Baldi P, Wallace DC, Vawter MP. 2012. Mitochondrial mutations and polymorphisms in psychiatric disorders. *Front Genet* 3:103.
- Shao L, Martin MV, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Bunney WE, Vawter MP. 2008. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Ann Med* 40:281–295.
- Smoller JW, Finn CT. 2003. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 123C: 48–58.
- Soong NW, Arnheim N. 1996. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions. *Methods Enzymol* 264:421–431.
- Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. 1992. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat Genet* 2:318–323.
- Tanhauser SM, Laipis PJ. 1995. Multiple deletions are detectable in mitochondrial DNA of aging mice. *J Biol Chem* 270:24769–24775.
- Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6:389–402.
- Taylor MA, Berenbaum SA, Jampala VC, Cloninger CR. 1993. Are schizophrenia and affective disorder related? Preliminary data from a family study. *Am J Psychiatry* 150:278–285.
- Torrey EF, Webster M, Knable M, Johnston N, Yolken RH. 2000. The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium. *Schizophr Res* 44:151–155.
- Tsuang MT, Winokur G, Crowe RR. 1980. Morbidity risks of schizophrenia and affective disorders among first degree relatives of patients with schizophrenia, mania, depression and surgical conditions. *Br J Psychiatry* 137:497–504.
- Vawter MP, Tomita H, Meng F, Bolstad B, Li J, Evans S, Choudary P, Atz M, Shao L, Neal C, Walsh DM, Burmeister M, Speed T, Myers R, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney WE. 2006. Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state: Implications for brain disorders. *Mol Psychiatry* 11:663–679.
- Venegas V, Wang J, Dimmock D, Wong LJ. 2011. Real-time quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 19:Unit19.7.
- Verge B, Alonso Y, Valero J, Miralles C, Vilella E, Martorell L. 2011. Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur Psychiatry* 26: 45–56.
- Verge B, Alonso Y, Miralles C, Valero J, Vilella E, Boles RG, Martorell L. 2012. New evidence for the involvement of mitochondrial inheritance in schizophrenia: Results from a cross-sectional study evaluating the risk of illness in relatives of schizophrenia patients. *J Clin Psychiatry* 73:684–690.
- Wallace DC, Lott MT, Shoffner JM, Brown MD. 1992. Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. *J Inher Metab Dis* 15: 472–479.
- Wang JF. 2007. Defects of mitochondrial electron transport chain in bipolar disorder: Implications for mood-stabilizing treatment. *Can J Psychiatry* 52:753–762.
- Washizuka S, Ikeda A, Kato N, Kato T. 2003. Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 6:421–424.
- Wray NR, Pergadia ML, Blackwood DH, Penninx BW, Gordon SD, Nyholt DR, Ripke S, Macintyre DJ, McGhee KA, Maclean AW, Smit JH, Hottenga JJ, Willemsen G, Middeldorp CM, de Geus EJ, Lewis CM, McGuffin P, Hickie IB, van den Oord EJ, Liu JZ, Macgregor S, McEvoy BP, Byrne EM, Medland SE, Statham DJ, Henders AK, Heath AC, Montgomery GW, Martin NG, Boomsma DI, Madden PA, Sullivan PF. 2012. Genome-wide association study of major depressive disorder: New results, meta-analysis, and lessons learned. *Mol Psychiatry* 17:36–48.

# Mitochondrial DNA (mtDNA) Variants do not play a major Role in Schizophrenia

Helena Torrell, Antonio Salas, Nerea Abasolo, Constanza Morén, Glòria Garrabou, Joaquín Valero, Yolanda Alonso, Elisabet Vilella, Javier Costas, Lourdes Martorell

It has been reported that certain genetic factors involved in schizophrenia could be located in the mitochondrial DNA (mtDNA). Therefore, we hypothesized that mtDNA mutations and/or variants would be present in schizophrenia patients and may be related to schizophrenia characteristics and mitochondrial function. This study was performed in three steps: 1) identification of pathogenic mutations and variants in 14 schizophrenia patients with an apparent maternal inheritance of the disease by sequencing the entire mtDNA; 2) case-control association study of 23 mtDNA variants identified in step 1 in 495 patients and 615 controls; and 3) analyses of the associated variants according to the clinical, psychopathological and neuropsychological characteristics and according to the oxidative and enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain. We did not identify pathogenic mtDNA mutations in the 14 sequenced patients. Two known variants were nominally associated with schizophrenia and were further studied. The MT-RNR2 1811A>G variant likely does not play a major role in schizophrenia, as it was not associated with clinical, psychopathological or neuropsychological variables, and the MT-ATP6 9110T>C variant did not result in differences in the oxidative and enzymatic functions of the mitochondrial respiratory chain. The patients with apparent maternal inheritance of schizophrenia did not exhibit any mutations in their mtDNA. The variants associated with schizophrenia in the present study were not related either to phenotypic characteristics or to mitochondrial function. We did not find evidence pointing to a role for mtDNA sequence variation in schizophrenia.

**Keywords:** Schizophrenia, Mitochondrial DNA, mtDNA, Genetic variant, Mitochondrial respiratory chain

## INTRODUCTION

### Schizophrenia

Schizophrenia is a severe mental disorder characterized by the breakdown of thought processes and a deficit of typical emotional responses. Common symptoms are delusions including paranoia and auditory hallucinations, disorganized thinking reflected in speech and a lack of emotional intelligence. Schizophrenia is accompanied by significant social or vocational dysfunction. Symptom onset typically occurs during adolescence and early adulthood and occurs approximately 4 years earlier in males than females. The median incidence (25 and 75% quantiles) is 15.2 cases (10.2 - 22.0) per 100,000 persons, while the median lifetime prevalence (25 and 75% quantiles) is 4.0 cases (3.0 - 6.6) per 1,000 persons (McGrath et al. 2008). The etiology and pathophysiology remain unknown; however, it is widely accepted that a combination of genetic, environmental and psychosocial factors lead to illness manifestation (van Os and Kapur 2009). Because the heritability of schizophrenia has been estimated at approximately 80%, genetic factors account for most of the etiology, and current knowledge indicates that schizophrenia is a polygenic disorder involving both rare structural and common variants (Sullivan et al. 2012). Most genetic studies have focused on the nuclear genome, and recently, it has been estimated that approximately 8,300 SNPs (accounting for 32% of the variance in liability) contribute to the risk of schizophrenia (Ripke et al. 2013). However, understanding the genetic factors involved in schizophrenia is far from complete.

### Mitochondrial DNA (mtDNA)

In almost all human cells, the genetic information is located in two compartments: the nucleus, which contains the nuclear DNA (nDNA); and the

mitochondria, which contain the mtDNA. The nDNA is a 3.3 billion bp linear molecule that encodes approximately 20,000 protein-coding genes and is inherited from two parents, one male and one female. The mtDNA, which is inherited only from the mother, is a 16,569 bp circular molecule encoding 37 genes, thirteen of which are protein coding. The nDNA has the genetic information necessary for all cellular functions, while the mtDNA only encodes some of the genetic information necessary for the proper functioning of the mitochondrial respiratory chain, which generates energy in the form of ATP. Tissues with high energy demands such as the nervous system have a large number of mitochondria in their cells (up to 2,000), and as each mitochondrion has 5 mtDNA molecules on average (from one to 15) (Satoh and Kuroiwa 1991), the proportion of mtDNA/nDNA could be as high as 30,000:1.

Mutations in mtDNA cause mitochondrial disorders that can present either in infancy or in adulthood. More than 150 genetic mitochondrial syndromes have been described and affect 1 in 5,000 live births (Skladal et al. 2003). Signature traits include lactic acidosis, skeletal myopathy, deafness, blindness, subacute neurodegeneration, intestinal dysmotility and peripheral neuropathy. Although most organ systems can be affected, a highly tissue-specific dysfunction is also possible (Vafai and Mootha 2012). Moreover, it has been hypothesized that mtDNA may also be involved in other complex traits including neurodegenerative disorders, aging and cancer (Schon et al. 2012).

### mtDNA and schizophrenia

Evidence for the involvement of mitochondria and mtDNA in schizophrenia has been widely discussed. Briefly, mitochondrial dysfunction, maternal inheritance and the comorbidity of schizophrenia and mitochondrial disorders related to mtDNA mutations have been reported (Verge et al. 2011; Anglin et al. 2012). It is worth noting that alterations in mitochondria and in mtDNA have been found in schizophrenia. Recently, we have shown that relatives who shared mtDNA with a schizophrenic patient had a higher risk of presenting with schizophrenia than relatives who did not share mtDNA, thus supporting the hypothesis that mtDNA may be involved in schizophrenia (Verge et al. 2012). However, we did not observe any positive association between the common variants of the most common European branches of mtDNA and the risk of developing schizophrenia (Mosquera-Miguel et al. 2012). Therefore, we hypothesized that variants or mutations present in the mtDNA could be associated with the disease. The aims of the present study were as follows: 1) to examine the entire mtDNA sequence of schizophrenia patients with an apparent maternal inheritance of the disease to identify variants and/or pathogenic mutations; 2) to conduct a case-control

study to identify whether the variants found in step 1 were more frequent in schizophrenia patients than in the control subjects; and 3) to analyze the associated variants with either the illness characteristics or mitochondrial function.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Universitari Sant Joan in Reus, Catalonia, Spain. All patients provided written informed consent for the study after a thorough explanation of the procedures, in accordance with the Declaration of Helsinki as revised 1989.

In the first stage of the study, we selected 14 unrelated schizophrenia patients with apparent maternal inheritance of the disease (i.e., the mother was also diagnosed with schizophrenia) and sequenced their entire mtDNA. In the second stage, we studied 495 unrelated schizophrenia patients and 615 unrelated healthy controls. The patient group comprised white males and females between 19 and 85 years of age whose parents and grandparents were born in Spain and who attended the Hospital Universitari Institut Pere Mata in Reus, Catalonia, Spain. All patients were diagnosed with schizophrenia according to the DSM-IV criteria. The patients who had been admitted to a psychiatric hospital for more than six months were diagnosed by two independent, experienced psychiatrists, whereas patients who were admitted for less than six months were diagnosed using the Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry interview (Vazquez-Barquero et al. 1994). The control group was selected from a population-based sample that was recruited from a geographic region matching that of the patients. The control group consisted of white males and females between 18 and 77 years of age whose parents and grandparents were also born in Spain. We selected mentally healthy subjects through medical interviews who scored less than 7 in the Goldberg General Health Questionnaire (GHQ), on a scale of 28 (Goldberg and Hillier 1979; Lobo et al. 1986).

### Obtaining total DNA and mtDNA

Total DNA was obtained from the peripheral blood, isolated using the Gentra® PureGene reagents (Qiagen, Barcelona, Spain), and quantified through spectrophotometry (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). The entire mtDNA was amplified using the REPLI-g Mitochondrial DNA Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The PCR products were purified using the QiAquick PCR Purification kit (Qiagen).

### mtDNA sequencing

Purified REPLI-g PCR products were amplified using 42 overlapping fragments, 38 of which used previously described primers (Bamne et al. 2008); the remaining four primer pairs were designed using the Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). The PCR conditions and primer information are provided in Supplementary Table S1. mtDNA sequences are present in the nDNA; therefore, to confirm primer specificity for the mitochondrial genome, DNA from rho zero cells (cells lacking mtDNA) was used as a negative control. Rho zero cells were obtained by treating the human osteosarcoma 143B TK<sup>-</sup> cell line (European Collection of Cell Cultures, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) with low doses of ethidium bromide (King and Attardi 1996). The 42 mtDNA fragments were successfully amplified from the DNA of the schizophrenia patients but not from the DNA of the rho zero cells.

The PCR products from the schizophrenia patients were purified using Multiscreen™-PCR<sub>96</sub> Filter Plates (Montage, Millipore Ibérica S.A., Barcelona, Spain). We used the dye-labeled Dideoxy Terminator Cycle Sequencing kit (CEQ™ DTCS, Beckman Coulter, Madrid, Spain) to sequence the fragments, and the PCR products were purified through ethanol precipitation and were analyzed using a CEQ8000 DNA Analysis System (Beckman Coulter). The sequences were aligned with the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) (Andrews et al. 1999) using the Sequencher 5.0 Software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). The mtDNA genomes of each participant were allocated into haplogroups according to Phylotree Build 15 (<http://www.phylotree.org/>) (van Oven and Kayser 2009).

### Case-control study of mtDNA variants

From the 14 mtDNA genomes that were sequenced, we selected 23 variants to study in a larger sample consisting of 495 schizophrenia and 615 control subjects (Table 2), including: 16 missense variants present in complexes I, III, IV and V; three variants present in the two ribosomal genes, *MT-RNR1* and *MT-RNR2*; and four variants present in three transfer RNAs, *MT-TT* coding for threonine, *MT-TE* coding for glutamic acid and *MT-TC* coding for cysteine. The variants were genotyped using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) using a previously described protocol (Cerezo et al. 2009) and the MassARRAY SNP genotyping system (Sequenom, San Diego, CA, USA).

### Psychopathological and neuropsychological evaluation

The Spanish version of the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) (Peralta and Cuesta 1994) was

used to evaluate symptoms. Neuropsychological evaluation was conducted soon after the psychopathological interview after clinical stabilization. The following neuropsychological tests were conducted in a pre-fixed order: the Stroop Color-Word Test; the Wisconsin Card Sorting Test; the Trail-Making Test A and B; the Visual Reproduction subtest of the Wechsler Memory Scale, Revised; and the Continuous Performance Test. General intellectual function was estimated using the Vocabulary subtest of the Wechsler Adult Intelligence Scale-Third Edition (WAIS-III) (Wechsler, 1997). The patients with a scalar score of less than 7 in the WAIS-III subtest were excluded (Lezak, 1997). Sex, age, level of education, age of onset, duration of illness, marital status, handedness, drug abuse and daily medication dose (converted into chlorpromazine equivalents) were other variables collected during this study. Further details are reported elsewhere (Martorell et al. 2007).

### Oxidative and enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain

Fresh peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) from 8 schizophrenia patients and 13 healthy controls were used to assess the ability of their electron transport chains to consume oxygen. Four of the schizophrenia patients presented with the 9110C variant, whereas the rest did not. The carriers and non-carriers were age, gender and medication-matched. Briefly, three of the four enzymatic complexes of the mitochondrial respiratory chain were selectively stimulated, and oxygen consumption was detected using a Clark's polarograph, as described elsewhere (Chretien et al. 1994). The oxygen consumption rate was determined by measuring pyruvate malate oxidation (PMox) and glutamate malate oxidation (GMox) for complex I, succinate oxidation (Sox) for complex II and glyceraldehyde 3-phosphate oxidation (G3Pox) for complex III. However, the first analysis of oxidation was performed using intact cells as an indicator of the global endogenous substrate consumption (Cellox). These oxidative activities were expressed as nmols of consumed oxygen per minute and milligram of protein.

In addition, the enzymatic activity of ATP synthase, which is responsible for ATP generation, was also assessed in the PMBCs of the same subjects using the ATP synthase Enzyme Activity Microplate Assay kit (ab109714, Abcam, Cambridge, United Kingdom) according to the manufacturer's protocol. Briefly, ATP synthase from each subject was selectively immunocaptured, and its ability to synthesize ATP was determined by detecting the change in absorbance using a microplate reader (Synergy HT, BioTek, VT, USA). These activities were expressed as a change in absorbance per minute and mg of protein.

Total protein concentrations were measured using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol.

### Statistical analyses

Regarding the case-control study for the 23 variants tested, the statistical power would be above 80% when considering a significance level of 0.05, a minimum allele frequency of 0.2 and an OR > 2 and when applying multiple test corrections (5,000 simulations), according to mitPower (Pardo-Seco et al. 2013). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of the data. Pearson's  $\chi^2$  test was used to compare the allele frequencies between the schizophrenia patients and the control individuals. Pearson's  $\chi^2$  test and the Mann-Whitney U test were also used to compare categorical and quantitative data, respectively, between the patients presenting with the 1811A variant and the patients presenting with the 1811G variant. With regard to the neuropsychological features, we analyzed four cognitive abilities: cognitive flexibility; working memory; interference control; and sustained attention. The details of the statistical analyses used to obtain these cognitive processes are given in Supplementary Text S2. The sustained attention index was obtained as previously described (Mulet et al. 2007).

The univariate general linear model, which was adjusted for age, gender and medication (antipsychotic potency as chlorpromazine-equivalent doses), was used to compare the subjects according to the 1811A>G variant on the general indices of psychopathological symptoms (positive, negative, general and total score), and the same test adjusted for age, gender, medication and years of education was used to compare the subjects on cognitive performance (cognitive flexibility, working memory, interference control and sustained attention).

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0 (Armonk, NY: IBM Corp.). Boxplots were created using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

## RESULTS

### Analyses of the mtDNA of the 14 schizophrenia patients

The analyses of the 14 mtDNA sequences did not identify any new or reported pathogenic mutations that could be implicated in schizophrenia. Table 1 shows the main characteristics of the patients, the haplogroup to which their mtDNA genomes belonged and the missense variants that were present compared with the

rCRS. Aligned mtDNA sequences are shown in Supplementary Figure S3.

### Case-control analyses

The 23 selected variants present in the 14 schizophrenia patients were compared to case-control samples with a common European genetic background/ancestry obtained from the same geographical region. The Pearson's  $\chi^2$  exact test revealed that the frequencies of two of these variants were significantly different between the 495 patients and the 615 controls based on a nominal *P*-value < 0.05 (Table 2). The associated variants, *MT-RNR2* 1811A>G and *MT-ATP6* 9110T>C, were further studied to identify their possible roles in schizophrenia.

### Results according to the 1811A>G variant

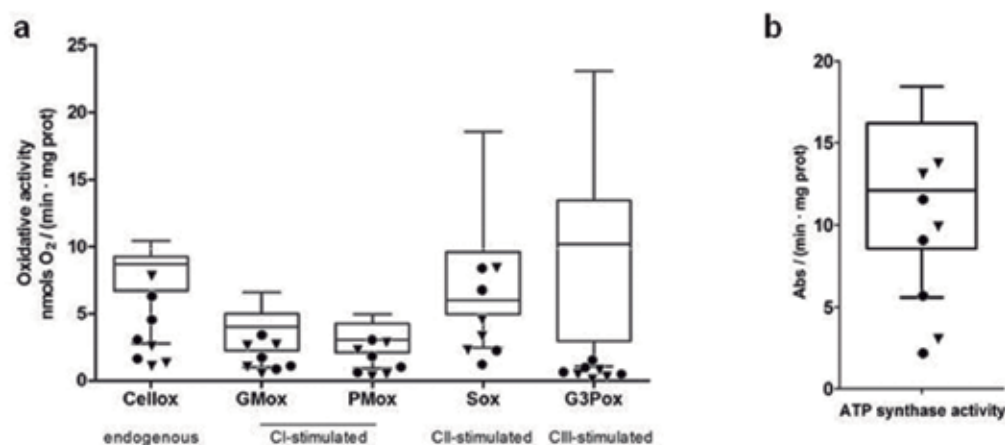
The 1811A>G variant is located at nucleotide position 141 of the *MT-RNR2* gene, which encodes the 16S ribosomal RNA subunit. In a typical European population, this variant is generally present in individuals carrying the haplogroups H1b1, J1c3d, U2'3'4'7'8'9, U8b1b and K1a4a1b2. In the studied sample, the 1811G variant was overrepresented in the schizophrenia patients compared with the control subjects. The odds ratio for this variant was 1.7, with a confidence interval ranging from 1.2 to 2.5. We hypothesized that this variant may be related to the clinical, symptomatological or neuropsychological characteristics present in schizophrenia patients. Therefore, we studied the possible implications of this variant in the phenotypical expression of schizophrenia. Table 3 indicates that the presence of the 1811G variant, however, was not related to the clinical characteristics of the patients or to the psychopathological or neuropsychological measures. The general linear model, including confounding variables such as age, gender, medication, years of evolution and educational level, did not identify a significant model in which the variant contributed to the variance of the dependent variables. We also observed that the 1811G variant was overrepresented in left-handed individuals.

### Results according to the 9110T>C variant

The 9110T>C variant is located in the second nucleotide position in an ATT codon in the *MT-ATP6* gene. The variant leads to a missense mutation of amino acid 195, resulting in a change from an isoleucine to a threonine in the F0 subunit of ATP synthase (complex V). This variant was identified in a male patient with apparent maternal schizophrenia and was later found in 5 schizophrenia patients but in none of the control subjects. Because of the low frequency of this variant, we could not study the relationship between this variant and the phenotypic characteristics of schizophrenia. Moreover, we analyzed the oxidative and enzymatic capacities of the mitochondria in 4

available patients presenting with the 9110C variant and compared these activities to 4 patients presenting with the ancestral 9110T variant (matched for age, gender and medication) as well as a group of healthy subjects (matched for age and gender). Figure 1 shows that there were no differences in the oxidative and enzymatic activities between the patients presenting with 9110T and those carrying the 9110C variant. However, we observed that some of the patients

exhibited lower ATPase enzymatic activity than the control subjects. According to the oxidative capacity, some patients exhibited low oxidative activity values corresponding to global endogenous, complex I and complex II, compared with the control subjects. Interestingly, all of the patients exhibited lower complex III oxidative capacities compared with healthy subjects.



**Figure 1** Mitochondrial respiratory chain function

Panel a shows the different endogenous or stimulated oxygen consumption activities. Panel b indicates the ATPase enzymatic activity. The boxplots represent the values of the control subjects in both of the panels; the dots represent the schizophrenia patients carrying the 9110C variant, and the triangles represent the patients carrying the 9110T variant

## DISCUSSION

### *Sequencing analyses of mtDNA in maternal schizophrenia*

The present study aimed to identify mtDNA sequence variations in patients who presented with apparent maternal inheritance of the disease; however, we did not find any new or reported mutation that, by itself, represented a good candidate for further study. Although mtDNA mutations may be an underlying mechanism for developing schizophrenia, few studies have succeeded in attributing mtDNA variants to the risk of schizophrenia; in the cases where such associations were found, the results could not be replicated (Lindholm et al. 1997; Odawara et al. 1998; Gentry and Nimgaonkar 2000; Kazuno et al. 2005; Martorell et al. 2006; Bamne et al. 2008; Rollins et al. 2009; Ueno et al. 2009; Ichikawa et al. 2012; Sequeira et al. 2012). As often observed in medical literature, most of these studies claimed to identify new variants; however, most of these variants had been previously identified in control subjects and incorporated into different databases (e.g., Mitomap; <http://www.mitomap.org/MITOMAP>) (Bandelt et al. 2006; Bandelt et al. 2009; Bandelt et al. 2008). One

explanation for the failure to identify changes in the mtDNA of schizophrenia patients might be the presence of tissue-specific mutations. The brain is the organ involved in schizophrenia, and analyzing blood cells may lead to false negative results. It is likely that some compromising variants are inherited from the mother but differentially segregate during embryogenesis. These variants could be present in higher percentages in the brain tissue but may be difficult to detect in blood cells. However, the two studies that sequenced the entire mtDNA from the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia patients did not find any mutation or variant that was significantly more common in the patients than in the controls (Rollins et al. 2009; Sequeira et al. 2012). Interestingly, Rollins and colleagues reported that synonymous base pair substitutions were 22% higher in schizophrenia patients than in the controls, a result that was also previously reported using the blood mtDNA of schizophrenia patients (Bamne et al. 2008). The authors hypothesized that this excessive substitution could be the result of a defect in the nuclear *POLG* gene, which encodes the catalytic subunit of the mtDNA polymerase.

**TABLE 1. Missense variants identified in the 14 schizophrenia patients with apparent maternal disease transmission**

| Patient | Present age | Gender  | Age of onset | Haplo-group | Nucleotide position | Base change | Gene    | Amino acid position | Amino acid change | Grantham value <sup>a</sup> | Number of patients that have the variant | Frequency in GenBank (18,363 sequences) |
|---------|-------------|---------|--------------|-------------|---------------------|-------------|---------|---------------------|-------------------|-----------------------------|--|---|
| 1       | 37          | Female  | 21           | H4a1a3a     | 3992                | C > T       | MT-ND1  | 229                 | Thr > Met         | 81                          | 1  | 154                                     |
|         |             |         |              |             | 4024                | A > G       | MT-ND1  | 240                 | Thr > Ala         | 58                          | 1  | 131                                     |
|         |             |         |              |             | 13889               | G > A       | MT-ND5  | 518                 | Cys > Tyr         | 194                         | 1  | 30                                      |
|         |             |         |              |             | 14582               | A > G       | MT-ND6  | 31                  | Val > Ala         | 64                          | 1  | 127                                     |
|         |             |         |              |             | 15326               | A > G       | MT-CYTB | 194                 | Thr > Ala         | 58                          | 14                                       | 18,123                                  |
| 2       | 27          | Male    | 16           | V1a         | 4639                | T > C       | MT-ND2  | 57                  | Ile > Thr         | 89                          | 1  | 74                                      |
|         |             |         |              |             | 8869                | A > G       | MT-ATP6 | 115                 | Met > Val         | 21                          | 1  | 57                                      |
|         |             |         |              |             | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 3       | 30          | Male    | 13           | U2e1c       | 12346               | C > T       | MT-ND5  | 4                   | His > Tyr         | 83                          | 1  | 135                                     |
|         |             |         |              |             | 14766               | C > T       | MT-CYTB | 7                   | Thr > Ile         | 89                          | 3  | 13,539                                  |
|         |             |         |              |             | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 4       | 37          | Female  | 21           | H1          | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 5       | 28          | Male    | 20           | K1a4a1      | 9055                | G > A       | MT-ATP6 | 177                 | Ala > Thr         | 58                          | 1  | 997                                     |
|         |             |         |              |             | 10398               | A > G       | MT-ND3  | 114                 | Thr > Ala         | 58                          | 3  | 7,972                                   |
|         |             |         |              |             | 14798               | T > C       | MT-CYTB | 18                  | Phe > Leu         | 22                          | 2  | 1,472                                   |
|         |             |         |              |             | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 6       | 56          | Male    | 31           | H1z         | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 7       | 39          | Female  | 26           | H1ap1       | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 8       | 34          | Female  | 17           | T1a1        | 4216                | T > C       | MT-ND1  | 304                 | Tyr > His         | 83                          | 2  | 1,856                                   |
|         |             |         |              |             | 4917                | A > G       | MT-ND2  | 150                 | Asn > Asp         | 23                          | 1  | 922                                     |
|         |             |         |              |             | 10398               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
|         |             |         |              |             | 14766               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
|         |             |         |              |             | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 15452   | C > A       | MT-CYTB | 236          | Leu > Ile   | 5                   | 2           | 1,742   |                     |                   |                             |  |   |
| 4216    |             |         |              |             |                     |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 9       | 28          | Male    | 22           | J1c2        | 8843                | T > C       | MT-ATP6 | 106                 | Ile > Thr         | 89                          | 1  | 90                                      |
|         |             |         |              |             | 10398               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
|         |             |         |              |             | 13708               | G > A       | MT-ND5  | 458                 | Ala > Thr         | 58                          | 1  | 1,315                                   |
|         |             |         |              |             | 14766               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 14798   |             |         |              |             |                     |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 15326   |             |         |              |             |                     |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 15452   |             |         |              |             |                     |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 10      | 63          | Female  | 21           | HV0b        | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 11      | 34          | Male    | 16           | H7          | 11969               | G > A       | MT-ND4  | 404                 | Ala > Thr         | 58                          | 1  | 191                                     |
|         |             |         |              |             | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 12      | 51          | Male    | 24           | H1e         | 6480                | G > A       | MT-COX1 | 193                 | Val > Ile         | 29                          | 1  | 44                                      |
|         |             |         |              |             | 6852                | G > A       | MT-COX1 | 317                 | Gly > Ser         | -                           | 1  | 8                                       |
|         |             |         |              |             | 13802               | C > T       | MT-ND5  | 489                 | Thr > Met         | -                           | 1  | 21                                      |
|         |             |         |              |             | 15326               |             |         |                     |                   |                             |  |   |
| 13      | 62          | Male    | 32           | H3+152C     |                     |             | MT-CYTB | 193                 |                   |                             |  |   |
|         |             |         |              |             | 15326               |             | MT-CYTB | 194                 |                   |                             |  |   |
| 14      | 24          | Male    | 15           | H1e5        | 5460                | G > A       | MT-ND2  | 331                 | Ala > Thr         | 58                          | 1  | 1,004                                   |
|         |             |         |              |             | 9110                | T > C       | MT-ATP6 | 195                 | Ile > Thr         | 89                          | 1  | 33                                      |
|         |             |         |              |             | 15326               |             | MT-CYTB | 194                 |                   |                             |  |   |

The variants present in two or more patients are shaded, and the complete information is only presented the first time it is listed in the Table.

<sup>a</sup> The Grantham value was retrieved from the mSNP database, and it reflects the physicochemical differences between the original and altered amino acid residues (Grantham et al, 1974). Grantham values larger than 50 are described as radical amino acid replacements and those lower than 50 are considered conservative replacements.

The GenBank frequency was derived from 18,363 GenBank sequences with sizes greater than 14 kb that were present in MITOMAP ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) on November 12, 2013.



TABLE 2. The mtDNA variants analyzed in 495 schizophrenia patients and 615 control subjects

| Position | Nucleotide change | Function | Nucleotide position, amino acid change                    | GenBank frequency (of 18,363)       |        | Patient frequency |         | Control frequency |         |      |
|----------|-------------------|----------|---|-------------------------------------|--------|-------------------|---------|-------------------|---------|------|
|          |                   |          |   | N                                   | %      | N                 | %       | N                 | %       |      |
| 15928    | G>A               | MT-TT    | tRNA threonine  | NP 43 located in the anticodon stem | 934    | 5.1               | 46/493  | 9.3               | 64/610  | 10.5 |
| 15904    | C>T               |          |   | NP 17 located in the DHU-loop       | 286    | 1.6               | 18/495  | 3.6               | 22/615  | 3.6  |
| 15452    | C>A               | MT-CYB   | Subunit of ubiquinol-cytochrome c reductase (complex III) | Leu236Ile<br>CTT > ATT              | 1742   | 9.5               | 92/495  | 18.6              | 121/611 | 19.8 |
| 15326    | A>G               |          |   | Thr194Ala<br>ACA > GCA              | 18,123 | 98.7              | 491/495 | 99.2              | 605/611 | 99.0 |
| 14798    | T>C               |          |   | Phe18Leu<br>TTC > CTC               | 1472   | 8.0               | 75/495  | 15.2              | 70/609  | 11.5 |
| 14693    | A>G               | MT-TE    | tRNA glutamic acid  | NP 54 located in the T-loop         | 116    | 0.6               | 1/495   | 0.2               | 0/611   | 0    |
| 14582    | A>G               | MT-ND6   | Subunit of NADH dehydrogenase (complex I)                 | Val31Ala<br>GTA > GCA               | 127    | 0.7               | 7/495   | 1.4               | 16/611  | 2.6  |
| 13889    | G>A               | MT-ND5   | Subunit of NADH dehydrogenase (complex I)                 | Cys518Tyr<br>TGC > TAC              | 30     | 0.2               | 0/495   | 0                 | 1/611   | 0.2  |
| 13802    | C>T               |          |   | Thr489Met<br>ACA > ATA              | 21     | 0.1               | 1/495   | 0.2               | 0/611   | 0    |
| 12346    | C>T               |          |   | His4Tyr<br>CAC > TAC                | 135    | 0.7               | 3/495   | 0.6               | 3/615   | 0.5  |
| 11969    | G>A               | MT-ND4   | Subunit of NADH dehydrogenase (complex I)                 | Ala404Thr<br>GCC > ACC              | 191    | 1.0               | 3/495   | 0.6               | 1/613   | 0.2  |
| 9110     | T>C               | MT-ATP6  | Subunit of ATP synthase (complex V)                       | Ile195Thr<br>ATT > ACT              | 33     | 0.2               | 5/495   | 1.0               | 0/615*  | 0    |
| 8869     | A>G               |          |   | Met115Val<br>ATA > GTA              | 57     | 0.3               | 0/495   | 0                 | 3/614   | 0.5  |
| 8843     | T>C               |          |   | Ile106Thr<br>ATC > ACC              | 90     | 0.5               | 2/495   | 0.4               | 7/607   | 1.1  |
| 6852     | G>A               | MT-CO1   | Subunit of cytochrome c oxidase (complex IV)              | Gly317Ser<br>GGC > AGC              | 8      | 0.0               | 1/494   | 0.2               | 0/615   | 0    |
| 6480     | G>A               | MT-TC    | tRNA cysteine   | Val193Ile<br>GTC > ATC              | 44     | 0.2               | 4/492   | 0.8               | 2/611   | 0.3  |
| 5773     | G>A               |          |   | NP 61 located in the T-stem         | 236    | 1.3               | 2/495   | 0.4               | 2/615   | 0.3  |
| 4917     | A>G               | MT-ND2   | Subunit of NADH dehydrogenase (complex I)                 | Asn150Asp<br>AAC > GAC              | 922    | 5.0               | 44/495  | 8.9               | 64/551  | 11.6 |
| 4639     | T>C               |          |   | Ile57Thr<br>ATC > ACC               | 74     | 0.4               | 1/494   | 0.2               | 2/613   | 0.3  |
| 4024     | A>G               | MT-ND1   | Thr240Ala<br>ACA > GCA                                    | 131                                 | 0.7    | 7/495             | 1.4     | 17/615            | 2.8     |      |
| 1888     | G>A               | MT-RNR2  | 16S rRNA  | NP 218                              | 1,046  | 5.7               | 46/495  | 9.3               | 65/609  | 10.7 |
| 1811     | A>G               |          |   | NP 141                              | 1,450  | 7.9               | 66/494  | 13.4              | 51/614* | 8.3  |
| 709      | G>A               | MT-RNR1  | 12S rRNA  | NP 62                               | 2,404  | 13.1              | 76/495  | 15.4              | 93/614  | 15.1 |

NP: nucleotide; 9110 G>A variant \*  $\chi^2 = 4.191$  ( $P$ -value = 0.04); 1811 A>G variant †  $\chi^2 = 7.404$  ( $P$ -value = 0.007), OR = 1.7 (1.2 - 2.5).

The GenBank frequency was derived from 18,363 GenBank sequences with sizes greater than 14 kb that were present in MITOMAP ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) on November 12, 2013.

**TABLE 3. The demographic, clinical, psychopathological and neuropsychological characteristics of patients according to the mtDNA 1811A>G variant**

|  | 1811A<br>N = 147 | 1811G<br>N = 20 | Statistical test  | P-value |
|--|------------------|-----------------|-------------------|---------|
| Female, N (%)  | 48 (33%)         | 4 (20%)         | $\chi^2 = 1.412$  | 0.243   |
| Age, mean (SD)   | 36.4 (10.4)      | 36.2 (10.4)     | U = 1451.0        | 0.925   |
| Age of onset, median, (IR)   | 22 (9)           | 21.5 (18)       | U = 793.5         | 0.598   |
| Years of evolution, median (IR)                                      | 8 (15)           | 6.3 (9)         | U = 814.0         | 0.703   |
| Admissions to a psychiatric hospital, median (IR)                    | 3 (6)            | 3.5 (5)         | U = 1050          | 0.973   |
| Antipsychotic treatment equivalent to CPZ <sup>a</sup> , median (IR) | 300 (250)        | 375 (312)       | U = 565           | 0.063   |
| <b>Psychopathology, mean (SD)</b>                                    |                  |                 |                   |         |
| PANSS Positive Score   | 22.2 (6.3)       | 23.6 (7.2)      | U = 943.0         | 0.248   |
| PANSS Negative Score   | 17.8 (6.9)       | 18.9 (6.7)      | U = 1034.5        | 0.547   |
| PANSS General Score  | 37.6 (6.9)       | 40.3 (7.2)      | U = 901.5         | 0.160   |
| TOTAL PANSS  | 77.6 (12.2)      | 82.8 (13.0)     | U = 893.0         | 0.145   |
| <b>Neuropsychology, mean (SD)</b>                                    |                  |                 |                   |         |
| Cognitive flexibility  | 37.3 (10.3)      | 38.0 (12.1)     | U = 1114.0        | 0.904   |
| Working memory   | 21.9 (5.5)       | 20.9 (5.9)      | U = 1216.5        | 0.717   |
| Interference control   | 38.6 (7.2)       | 38.4 (9.6)      | U = 1042.5        | 0.547   |
| Sustained attention  | 60.1 (14.6)      | 61.0 (13.8)     | U = 1084.0        | 0.763   |
| <b>Laterality</b>  |                  |                 |                   |         |
| Edinburgh test, median (IR)  | 18.0 (8)         | 22 (10)         | U = 638.0         | 0.001   |
| Laterality coefficient   | 80.0 (40.5)      | 66.7 (88.5)     | U = 816.0         | 0.016   |
| Right-handed, N (%)  | 77 (59.2)        | 8 (42.0)        | $\chi^2 = 14.801$ | 0.001   |
| Mix-handed, N (%)  | 52 (40.0)        | 8 (42.0)        |                   |         |
| Left-handed, N (%)   | 1 (0.8)          | 3 (15.8)        |                   |         |

IR: interquartile range; <sup>a</sup> chlorpromazine dose in mg/day; PANSS: Positive and Negative Syndrome Scale.

mother but differentially segregate during embryogenesis. These variants could be present in higher percentages in the brain tissue but may be difficult to detect in blood cells. However, the two studies that sequenced the entire mtDNA from the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia patients did not find any mutation or variant that was significantly more common in the patients than in the controls (Rollins et al. 2009; Sequeira et al. 2012). Interestingly, Rollins and colleagues reported that synonymous base pair substitutions were 22% higher in schizophrenia patients than in the controls, a result that was also previously reported using the blood mtDNA of schizophrenia patients (Bamne et al. 2008). The authors hypothesized that this excessive substitution could be the result of a defect in the nuclear *POLG* gene, which encodes the catalytic subunit of the mtDNA polymerase.

### Analyses of mtDNA variants

As we did not identify any mtDNA alterations that could be directly involved in schizophrenia, we selected a group of variants present in the 14 schizophrenia patients to be assessed using a case-control study and to be explored according to schizophrenia characteristics or mitochondrial function. We selected 16 missense variants located in polypeptides of the mitochondrial respiratory chain, two variants located in the ribosomal subunits and three variants located in transfer RNAs. We found two variants that were significantly more common in the schizophrenia patients than in the controls; therefore, these variants were studied further.

Even though no pathognomonic symptoms or signs exist for schizophrenia, psychopathological symptoms and cognitive deficit are key features of the disease. Psychopathology is typically measured on the Positive and Negative Syndrome Scale, and several neuropsychological tests measure distinct cognitive abilities. Interestingly, in a study that crossed different mouse strains with distinct mtDNA origins, it was observed that the mtDNA, in combination with the nDNA, modifies learning, exploration, sensory development and the anatomy of the brain involved in cognitive functioning (Roubertoux et al. 2003). Therefore, the mtDNA 1811A>G variant could be involved in the cognitive function of schizophrenia patients. However, we did not find evidence that the 1811A>G variant was involved in either psychopathology or cognitive function. Therefore, our results are in agreement with those of (Byrne et al. 2009), who did not identify mtDNA variants related to cognitive performance. In addition, we found that the laterality coefficient, as assessed by the Edinburgh Handedness Inventory and calculated as previously described (Dragovic 2004), was significantly different between the patients with the 1811G variant and those with the 1811A, as there were an excess of left-handed

individuals presenting with the 1811G variant. To the best of our knowledge, there has been only one study conducted on mouse strains with distinct mtDNA origins that assessed the role of mtDNA in laterality. The authors found evidence that mtDNA may be implicated in the direction and degree of laterality under certain conditions involving fore and hind paw preference or performance and body orientation (Maarouf et al. 1999).

Regarding oxidative activity and ATP synthesis capacity, this is the first study to determine whether a given mtDNA variant impaired the oxygen consumption or ATP synthase activity of schizophrenic patients or healthy subjects. We did not identify any influence of the *MT-ATP6* 9110 T>C variant, in either the oxidative activity of the mitochondrial respiratory chain or ATP synthesis, as the patients with the variant and the reference allele did not differ in oxygen consumption or ATP production. It has been suggested that mtDNA variability is responsible for individual changes in the energy production system that might be directly related to health (Ruiz-Pesini et al. 2007). Therefore, mtDNA variants should also be related to oxygen consumption; however, the results have been contradictory. Two studies have reported the association of mitochondrial genetic background with oxygen consumption (Bouchard et al. 1998; Marcuello et al. 2009), whereas others have not (Rivera et al. 1998; Murakami et al. 2002). Nevertheless, it has recently been reported that certain mtDNA polymorphisms could affect oxygen consumption and, therefore, account for the different efficiencies of mitochondrial ATP production (Szczepanowska et al. 2012). Studies on cybrids, enucleated cells harboring wild type or altered mtDNA of interest that have been fused with rho cells in which the endogenous mtDNA has been depleted, demonstrated dramatic drops in mitochondrial ATP synthesis when different case mutations associated with the MERFF and MELAS syndromes were introduced (Pallotti et al. 2004). However, we did not find any differences in oxygen consumption or ATP production due to the 9110 T>C substitution. Therefore, other variants, rather than the 9110 T>C variant, might be involved in oxygen consumption and ATP synthesis. Interestingly, we observed that the endogenous oxidative activity of some of the schizophrenia patients appeared to be below that of the control individuals. Moreover, when complex III was stimulated, all of the schizophrenia patients exhibited a reduced oxidative capacity compared with the control subjects. A decrease in mitochondrial complex I enzymatic activity has been recently reported in the PBMCs of schizophrenic patients (Gubert et al. 2013); such dysfunction could lead to deficient ATP synthesis as well as oxidative stress. In addition, neuroleptics are among the several mitochondrion-toxic agents that interfere with the

mitochondrial respiratory chain function (Finsterer and Segall 2010); specifically, it has been reported that complex I is the complex that is most impaired by neuroleptics, particularly by the classic antipsychotics (Casademont et al. 2007).

## CONCLUSIONS

We did not identify any variation in the mtDNA that could be involved in schizophrenia in a group of patients with apparent maternal inheritance of the disease. Furthermore, even though two variants were found to be associated with schizophrenia (nominal *P*-value below 0.05) we did not identify any relationship between these variants and the phenotypic expression of schizophrenia or the enzymatic and oxidative activities of their mitochondria.

The present study provides evidence that mtDNA variants or mutations are not involved in schizophrenia.

### Limitations and implications for future work

A limitation of the present study may be the number of patients analyzed when attempting to identify the possible role of the mtDNA variants 1811A>G and 9110T>C with regard to the phenotypic characteristics of schizophrenia and the enzymatic and oxidative activities. With regard to the 1811A>G variant, distinct phenotypic measures were analyzed, and no significant *P*-values were observed for these associations.

We hypothesize that the mitochondrial dysfunction observed in schizophrenia patients may be related to mtDNA content rather than the mtDNA sequence. Therefore, future work should focus on the mtDNA content.

As neuroleptics are mitochondrion-toxic agents, future studies should assess the mitochondrial oxidative and enzymatic activities of schizophrenia patients and determine their relationships with the mtDNA sequence and/or mtDNA content in, ideally, non-treated patients or by taking into account the patient's medication.

## REFERENCES

- Andrews RM, Kubacka J, Chinnery PF, et al. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23:147. doi: 10.1038/13779
- Anglin RE, Tarnopolsky MA, Mazurek MF, Rosebush PI (2012) The psychiatric presentation of mitochondrial disorders in adults. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 24:394–409. doi: 10.1176/appi.neuropsych.11110345; 10.1176/appi.neuropsych.11110345
- Bamne MN, Talkowski ME, Moraes CT, et al. (2008) Systematic association studies of mitochondrial DNA variations in schizophrenia: focus on the ND5 gene. *Schizophr Bull* 34:458–65. doi: 10.1093/schbul/sbm100
- Bouchard C, Daw EW, Rice T, et al. (1998) Familial resemblance for VO<sub>2</sub>max in the sedentary state: the HERITAGE family study. *Med Sci Sports Exerc* 30:252–8.
- Byrne EM, McRae AF, Duffy DL, et al. (2009) Association study of common mitochondrial variants and cognitive ability. *Behav Genet* 39:504–12. doi: 10.1007/s10519-009-9276-x
- Casademont J, Garrabou G, Miro O, et al. (2007) Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol* 27:284–288. doi: 10.1097/JCP.0b013e318054753e
- Cerezo M, Cerný V, Carracedo A, Salas A (2009) Applications of MALDI-TOF MS to large-scale human mtDNA population-based studies. *Electrophoresis* 30:3665–73. doi: 10.1002/elps.200900294
- Chretien D, Rustin P, Bourgeron T, et al. (1994) Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clin Chim Acta* 228:53–70.
- Dragovic M (2004) Towards an improved measure of the Edinburgh Handedness Inventory: a one-factor congeneric measurement model using confirmatory factor analysis. *Laterality* 9:411–9. doi: 10.1080/13576500342000248
- Finsterer J, Segall L (2010) Drugs interfering with mitochondrial disorders. *Drug Chem Toxicol* 33:138–51. doi: 10.3109/01480540903207076
- Goldberg DP, Hillier VF (1979) A scaled version of the General Health Questionnaire. *Psychol Med* 9:139–45.
- Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, et al. (2013) Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res* 47:1396–402. doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.06.018
- King MP, Attardi G (1996) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 264:304–13.
- Lobo A, Pérez-Echeverría MJ, Artal J (1986) Validity of the scaled version of the General Health Questionnaire (GHQ-28) in a Spanish population. *Psychol Med* 16:135–40.
- Maarouf FD, Roubertoux PL, Carlier M (1999) Is mitochondrial DNA involved in mouse behavioral laterality? *Behav Genet* 29:311–8.
- Marcuello A, Martínez-Redondo D, Dahmani Y, et al. (2009) Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion* 9:27–30. doi: 10.1016/j.mito.2008.10.002
- Martorell L, Valero J, Mulet B, et al. (2007) M129V variation in the prion protein gene and psychotic disorders: relationship to neuropsychological and psychopathological measures. *J Psychiatr Res* 41:885–92. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.07.003
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J (2008) Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 30:67–76. doi: 10.1093/epirev/mxn001
- Mosquera-Miguel A, Torrell H, Abasolo N, et al. (2012) No evidence that major mtDNA European haplogroups confer risk to schizophrenia. *Am J Med Genet B*

- Neuropsychiatr Genet 159B:414–21. doi: 10.1002/ajmg.b.32044
- Mulet B, Valero J, Gutiérrez-Zotes A, et al. (2007) Sustained and selective attention deficits as vulnerability markers to psychosis. *Eur Psychiatry* 22:171–6. doi: 10.1016/j.eurpsy.2006.07.005
- Murakami H, Ota A, Simojo H, et al. (2002) Polymorphisms in control region of mtDNA relates to individual differences in endurance capacity or trainability. *Jpn J Physiol* 52:247–56.
- Van Os J, Kapur S (2009) Schizophrenia. *Lancet* 374:635–45. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60995-8
- Van Oven M, Kayser M (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30:E386–94. doi: 10.1002/humu.20921; 10.1002/humu.20921
- Pallotti F, Baracca A, Hernandez-Rosa E, et al. (2004) Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 384:287–93. doi: 10.1042/BJ20040561
- Peralta V, Cuesta M (1994) Psychometric properties of the positive and negative syndrome scale (PANSS) in schizophrenia. *Psychiatry Res* 53:31–40.
- Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, et al. (2013) Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet* 45:1150–9. doi: 10.1038/ng.2742
- Rivera MA, Wolfarth B, Dionne FT, et al. (1998) Three mitochondrial DNA restriction polymorphisms in elite endurance athletes and sedentary controls. *Med Sci Sports Exerc* 30:687–90.
- Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, et al. (2003) Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet* 35:65–69. doi: 10.1038/ng1230
- Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, et al. (2007) An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* 35:D823–8. doi: 10.1093/nar/gkl927
- Satoh M, Kuroiwa T (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 196:137–40.
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M (2012) Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 13:878–90. doi: 10.1038/nrg3275
- Skladal D, Halliday J, Thorburn DR (2003) Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 126:1905–12. doi: 10.1093/brain/awg170
- Sullivan PF, Daly MJ, O'Donovan M (2012) Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. *Nat Rev Genet* 13:537–51. doi: 10.1038/nrg3240
- Szczepanowska J, Malinska D, Wieckowski MR, Duszynski J (2012) Effect of mtDNA point mutations on cellular bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1817:1740–6. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.028
- Vafai SB, Mootha VK (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491:374–83. doi: 10.1038/nature11707
- Vazquez-Barquero JL, Gaité L, Artal Simon J, et al. (1994) Development and verification of the Spanish version of the “scanning system” psychiatric interview (“Questionnaires for clinical evaluation in neuropsychiatry”). *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines* 22:109–120.
- Verge B, Alonso Y, Miralles C, et al. (2012) New evidence for the involvement of mitochondrial inheritance in schizophrenia: results from a cross-sectional study evaluating the risk of illness in relatives of schizophrenia patients. *J Clin Psychiatry* 73:684–90. doi: 10.4088/JCP.10m06718
- Verge B, Alonso Y, Valero J, et al. (2011) Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur Psychiatry* 26:45–56. doi: 10.1016/j.eurpsy.2010.08.008
- Wechsler, D. (1997). Wechsler Adult Intelligence Scale—3rd Edition (WAIS-3®) San Antonio, TX: Harcourt Assessment.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

# *Conclusions*

---



## *conclusions*

- 1) En els estudis d'expressió gènica en teixit cerebral, la identificació dels gens de referència idonis i el control de l'efecte de l'RQI són tan importants com el control de les variables pre i post mortem. En les mostres de còrtex occipital de pacients d'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major i d'individus control, els gens de referència idonis són GAPDH, RPLP0, RPL30, RPS17 i TFRC.
- 2) Els pacients amb trastorn bipolar analitzats en aquest estudi presenten una major expressió del gen MT-ND1 que els controls.
- 3) No s'han pogut detectar canvis en els nivells d'expressió dels altres transcrits mitocondrials, en el contingut d'ADNmt, ni en la presència de delecions en pacients d'esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major en comparació amb individus control.
- 4) Les variants 1.811A>G i 9.110T>C de l'ADNmt han resultat significativament associades a l'esquizofrènia, però no estan relacionades amb les característiques psicopatològiques i neuropsicològiques ni amb la funcionalitat de la cadena respiratòria mitocondrial, respectivament.

## *perspectives de futur*

- 1) Cal treballar per establir criteris metodològics validats i consensuats que aconseguixin resultats fiables i comparables entre estudis que emprin la qPCR i l'RT-qPCR.
- 2) Cal explorar si altres pacients amb trastorn bipolar també presenten nivells més elevats del transcrit MT-ND1.
- 3) Per conèixer si l'ADNmt està implicat en el trastorn mental greu calen més estudis que analitzin un major nombre de mostres biològiques i també altres regions cerebrals en referència al contingut d'ADNmt, deleció i expressió dels transcrits mitocondrials.
- 4) Tal com s'ha fet en l'estudi de variants localitzades en el genoma nuclear, cal avançar cap a estudis d'associació de variants mitocondrials que analitzin nombres de mostres procedents de casos i de controls adequades que permetin identificar i/o descartar variants de risc de l'ADNmt que puguin contribuir al desenvolupament del trastorn mental greu.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

# Glossari

## a

### **Activitat enzimàtica:**

Nombre de molècules de substrat que són transformades per minut per una molècula d'enzim sota control de les condicions específiques de pH i temperatura. La mesura de les activitats enzimàtiques dels complexos mitocondrials s'emptra per a detectar disfunció mitocondrial.

### **Activitat oxidativa:**

Nombre de molècules d'oxigen que són consumides per minut per la cadena transportadora d'electrons. La determinació de l'activitat enzimàtica s'efectua addicionant en un medi de respiració diversos substrats i inhibidors de la cadena respiratòria mitocondrial per tal d'observar el descens en el contingut d'oxigen del medi mitjançant un elèctrode de Clark.

### **Afectivitat:**

Capacitat natural de l'individu per a experimentar afectes. Les principals formes de l'afectivitat són el sentiment, l'emoció, la passió i l'humor. Les persones amb un trastorn de l'estat d'ànim tenen una afectivitat alterada.

### **Al·lel:**

Cadascuna de les formes alternatives que pot presentar un gen que ocupa el mateix locus en un cromosoma determinat o en dos cromosomes homòlegs, i que sovint expressa diferentment un mateix caràcter.

### **Al·lucinació:**

Percepció d'un objecte o d'un estímul extern inexistents, considerats pel subjecte com a reals. En els trastorns psicòtics, les al·lucinacions auditives són les més freqüents.

### **Angoixa:**

Malestar profund alhora físic i psíquic, determinat per la impressió d'un perill imminent, indeterminat, davant el qual es resta impotent.

### **Apoptosi:**

Mecanisme de mort cel·lular programada genèticament que permet l'eliminació de cèl·lules envellides, malmeses o sobreres. N'existeixen dos mecanismes per a induir-la: l'extrínsec (promogut per senyals extracel·lulars) i l'intrínsec (promogut per senyals intercel·lulars i en el que participa el mitocondri).

### **Arítmia:**

Pertorbació del ritme de les contraccions cardíaques.

### **Asincronia:**

Absència de simultaneïtat en la duplicació de les dues cadenes de l'ADN, ja que un cromosoma es duplica abans o després que el seu homòleg. En el cas de l'ADNmt, és una cadena la que es duplica abans que l'altra.

### **Atàxia:**

Trastorn caracteritzat per la manca o l'alteració de la coordinació dels moviments.

## b

### **Bioespècimen:**

Mostra biològica o part d'un teixit destinada a donar una idea del restant.

### **Biomarcador:**

Substància química emprada com a indicador d'un estat biològic (relacionat amb la salut, amb processos fisiològics, amb una malaltia, etc) que pot ser objectivament mesurat en un teixit o fluid corporal.

### **Bioxip d'ADN:**

Un bioxip és un suport sòlid de petites dimensions, generalment de vidre, plàstic o silici, preparat per a la disposició ordenada, formant files i columnes, d'un gran nombre de mostres biològiques, sovint molècules, destinades a anàlisi. El xip d'ADN és una superfície sòlida separada en diversos forats microscòpics en els que hi ha adherits diferents fragments d'ADN d'una sola cadena. Els bioxips són molt emprats en els estudis d'expressió, en els quals es detecta el nivell d'expressió de diversos gens per complementarietat dels ADNc als ADN adherits al xip, i mitjançant la detecció de fluorescència.

## c

### **Cadena respiratòria mitocondrial:**

Acoblament de la cadena transportadora d'electrons (complexos I, II, III i IV) amb el sistema de fosforilació oxidativa (complex V).

### **Catatonía:**

1) Síndrome psicomotora caracteritzada per la inèrcia i la pèrdua d'iniciativa motora, a vegades interrompuda per impulsions brusques de caràcter incoercible. 2) Hipertonía i rigidesa d'una part del cos (generalment una extremitat), que es manté molta estona en una postura fixa sense fatiga aparent.

### **Cetosi:**

Situació, caracteritzada per una cetonèmia elevada i per cetonúria, originada per l'excés de producció de cossos cetònics en l'organisme com a conseqüència d'una manca d'hidrats de carboni per produir energia i de la utilització dels lípids per tal d'obtenir ATP.

### **Ciències òmiques:**

Conjunt de ciències i tècniques dedicades a l'estudi integral del genoma d'un organisme i el transcriptoma, proteoma i metaboloma d'un teixit. Els avenços tecnològics del segle XXI estan promovent l'aparició de les ciències òmiques en general, que permeten generar grans volums de dades amb molt poc temps i a baix cost. El gran repte actual és el de desenvolupar eines per integrar i analitzar aquest volum de dades.

**Citocrom c:**

Hemoproteïna monomèrica hidrosoluble, associada a la membrana mitocondrial interna mitjançant forces electrostàtiques, que participa en el transport d'electrons de la cadena respiratòria mitocondrial.

**Coenzim Q:**

Concretament el coenzim Q10 és una benzoquinona liposoluble present, sobre tot, a la membrana interna mitocondrial. Té capacitat de reducció i oxidació i per això participa en el transport d'electrons de la cadena respiratòria mitocondrial.

**Cognició:**

Aptitud dels éssers de processar informació a partir de la percepció, el coneixement adquirit i característiques subjectives que permeten valorar i considerar certs aspectes en detriment d'altres. El llenguatge, la memòria, l'aprenentatge i la resolució de problemes són processos cognitius.

**Coll d'ampolla:**

Fenomen que es duu a terme en l'embriogènesi, en el que el nombre de còpies de l'ADNmt es redueix considerablement.

**Comorbiditat:**

Concurrència en un sol pacient de dues o més patologies.

**Cosegregació:**

Transmissió conjunta de dos o més loci lligats en un mateix cromosoma. En la investigació genètica ha permès identificar gens relacionats amb malalties en observar en una família o conjunt de famílies la cosegregació de la malaltia i un marcador genètic conegut.

**Cromosoma:**

Estructura cel·lular formada per ADN i proteïnes associades que transporta la informació genètica. En l'ésser humà, cada cel·lula (excepte les cel·lules germinals) conté 46 cromosomes, 23 provinents del progenitor matern i 23 del patern.

---

## *d*

***de novo*:**

Locució llatina que significa "des del començament" o "des de zero". En genètica es parla de mutacions *de novo* per fer referència a aquelles que apareixen en una cel·lula sense haver estat heretades.

**Deleció comuna:**

Deleció més freqüent en l'ADNmt que engloba 4.977 pb i va des del gen MT-ATP8 fins al gen MT-ND5.

**Deleció:**

Variante o mutació que causa la pèrdua de material genètic en una cel·lula.

**Deliri:**

Pensaments il·lògics sense base real, no fonamentats en cap creença cultural compartida i que no es poden rebatre amb argumentació lògica. En els trastorns psicòtics, els deliris més comuns són les idees de persecució.

**Disàrtria:**

Grau moderat d'anàrtria que consisteix en l'alteració de la funció motora que no permet articular les paraules, però no de les funcions superiors de comprensió i de creació d'idees.

**Disfàgia:**

Deglució difícil deguda a un trastorn del pas dels aliments en un punt situat entre la boca i l'estómac.

**Disfunció mitocondrial:**

Pèrdua de la capacitat de dur a terme les funcions específiques del mitocondri. Generalment, el terme disfunció mitocondrial fa referència a un descens en l'eficiència de la producció d'energia i es sol establir amb les mesures d'activitat enzimàtica dels complexos mitocondrials i d'activitat oxidativa de la cadena transportadora d'electrons.

---

**e****ELISA:**

De l'anglès, enzyme-linked immunosorbent assay, és una tècnica bioquímica per a detectar i quantificar proteïnes que es basa en l'ús d'antígens o anticossos complementaris a la proteïna d'interès. Un dels components (antigen o anticòs) està marcat amb un enzim i insolubilitzat sobre un suport, de tal manera que la reacció antigen-anticòs queda immobilitzada. Un cop immobilitzada, pot ser mesurada mitjançant l'addició d'un substrat específic que en interactuar amb l'enzim produirà un color visible a simple vista i quantificable mitjançant l'ús d'un espectrofotòmetre o un colorímetre.

**Embriogènesi:**

Formació i desenvolupament de l'embrió, des del moment de la fecundació fins a la fi del tercer mes de gestació.

**Encebador:**

Segment d'ADN o d'ARN que és reconegut per l'ADN polimerasa per a engegar la replicació de l'ADN.

**Encefalomiopatia:**

Malaltia que cursa amb afectació de l'encèfal i dels músculs.

**Encefalopatia:**

Malaltia de l'encèfal de qualsevol etiologia: vascular, metabòlica, tumoral, traumàtica, etc.

**Endosimbiosi:**

Associació física prolongada entre dos organismes de diferents espècies un dels quals viu totalment dins el citosol de l'altre.

**Epigenètica:**

Branca de la genètica que estudia els canvis hereditaris que condicionen l'expressió gènica però que no estan codificats en la seqüència del genoma. Els principals mecanismes epigenètics són la metilació de citosines de les illes CpG i la modificació d'alguns residus aminoacídics de les histones que empaqueten l'ADN.

**Epilèpsia:**

Trastorn repetitiu i paroxismal de la funció cerebral caracteritzat per atacs o crisis, sobtats i breus, d'alteració de la consciència, de l'activitat motriu o de fenòmens sensitius anormals.

**Error de tipus I:**

També anomenat error de tipus alfa o fals positiu és l'error que es comet quan en un contrast d'hipòtesis, es rebutja la hipòtesi nul·la quan aquesta és vertadera. L'investigador arriba a la conclusió que hi ha una diferència quan en realitat no existeix.

**Error de tipus II:**

També anomenat error de tipus beta o fals negatiu es comet quan en un contrast d'hipòtesis, s'accepta la hipòtesi nul·la quan aquesta és falsa. L'investigador arriba a la conclusió que ha estat incapaç de trobar una diferència que existeix en la realitat.

**Espais intergènics:**

Regions de la seqüència d'ADN no codificants, ubicades entre les regions codificants. La seva funció és desconeguda, però la tendència actual de la literatura científica els assigna una funció reguladora de la transcripció.

**Factor genètic:**

Entitat genètica, per exemple, gen, ARN, número de còpies, mutació o variant que es pot detectar o quantificar mitjançant una tècnica d'anàlisi genètica.

**Fisiopatologia:**

Conjunt de funcions alterades en un organisme emmalaltit.

**Estrès oxidatiu:**

Fenomen causat per un desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen i la capacitat d'un sistema biològic de detoxificar ràpidament els reactius intermedis o reparar els danys produïts.

**Etiologia:**

Branca de la medicina que té per objecte estudiar les causes de les malalties.

**Exoma:**

Part del genoma formada pels exons, és a dir, de totes les regions codificants.

**Extrem CAP 5':**

Nucleòtid de guanina metilat situat a l'extrem 5' dels ARNm que és necessari per al reconeixement d'aquests per part dels ribosomes. Els transcrits de l'ADNmt no presenten aquest extrem CAP.

*f*

---

**Foliculogenèsi:**

Procés de maduració del fol·licle ovàric, que és una estructura composta per cèl·lules de la granulosa que envolta l'òcit i dins la qual es desenvolupa l'ovogènesi o divisió meiótica de l'òcit.

**Força protó-motriu:**

Suma d'un gradient transmembrana de concentració de protons (pH) amb el potencial elèctric (o gradient de voltatge).



## g

### **Gen de referència:**

En els anàlisis d'expressió gènica, gen emprat per a la quantificació relativa dels nivells d'expressió d'un gen diana; i escollit per la seva poca variabilitat d'expressió en el bioespècimen d'estudi.

### **Genòmica:**

Conjunt de ciències i tècniques dedicades a l'estudi integral del funcionament, contingut i evolució dels genomes. És una de les àrees més avanguardistes de la biologia molecular i engloba coneixements derivats de la biologia, l'estadística, la informàtica i les matemàtiques. L'objectiu principal és el de predir la funció dels gens en base a la seva seqüència així com poder-los relacionar amb patologies i malalties.

### **Genotip:**

Constitució genètica (conjunt d'al·lels) pròpia d'un individu.

### **Genotipat:**

Tècnica d'anàlisi genètica que permet determinar els al·lels específics d'un locus concret per a un o més individus.

## h

### **Haplogrup mitocondrial:**

Conjunt de seqüències de l'ADNmt relacionades entre sí per la seva descendència i definides per variants d'un sol nucleòtid, estables i antigues.

### **Haplotip:**

Combinació d'al·lels presents en diversos locus lligats d'un cromosoma que s'hereta com un tot d'un dels progenitors. En la aquest treball, el cromosoma al que fem referència és l'ADN mitocondrial.

### **Herència materna:**

Transmissió d'un conjunt de caràcters genètics a través, únicament, de la mare. En la natura, aquest fet ocorre únicament en la transmissió de l'ADNmt.

### **Heretabilitat:**

Proporció de la variabilitat fenotípica d'una població que és deguda a diferències genètiques. Es calcula fent el quocient entre la variació causada genèticament i la variació total (la causada genèticament sumada a l'ambiental).

### **Heteroplàsmia:**

En l'ADNmt, presència de diferents molècules d'ADNmt en la mateixa cèl·lula, teixit o organisme.

### **Hiperactivitat:**

Activitat anormalment augmentada, hipercinèsia.

**Hipotonia muscular:**

Disminució de la tonicitat del múscul per interrupció de l'arc reflex espinal, a causa de xoc neural, de lesions diverses (cerebrals, de la corea, etc) o de la degeneració primària dels músculs.

**Hipòxia:**

Disminució de l'oxigen respirable en les cèl·lules o els teixits d'un organisme.

**Histona:**

Nom genèric d'un grup de proteïnes simples, hidrosolubles que posseeixen una gran proporció d'aminoàcids bàsics (arginina i lisina). Les histones H1, H2, H3, H4 i H5 formen la cromatina juntament amb l'ADN i formen les unitats conegudes com a nucleosomes. Les histones també participen en la regulació del genoma atès que experimenten fenòmens epigenètics.

**Homeòstasi:**

Tendència al manteniment de l'equilibri i de l'estabilitat interns en els diferents sistemes biològics, des d'una cèl·lula o un organisme fins a un ecosistema.

**Homoplàsmia:**

En l'ADNmt, presència de molècules d'ADNmt idèntiques entre elles en una mateixa cèl·lula, teixit o organisme.

---

## i

---

**Illes CpG:**

Regió genòmica d'aproximadament 200 parelles de bases en les que més del 50% són citosines i guanines, que es troba en el 40% dels promotors de tot el genoma. La metilació d'aquestes illes forma part dels mecanismes epigenètics que regulen la transcripció gènica.

***in vitro*:**

experiment realitzat fora de l'organisme viu.

***in vivo*:**

experiment realitzat en un organisme viu.

**Interval post mortem:**

Període de temps comprès entre la mort d'un individu i el moment d'anàlisi del cos, en la present tesi, el moment de conservació del teixit cerebral.

**Intolerància a l'exercici:**

Incapacitat de realitzar exercici físic d'una intensitat i durada que no hauria de ser problemàtica. Sovint, cursa amb dolor, malestar i fatiga en cas d'haver realitzat exercici.

**Incidència:**

Nombre de persones que emmalalteixen (o de casos d'una malaltia) en una població específica durant un període de temps.

---

## L

### **Locus / loci:**

Posició ocupada per un gen en el cromosoma.

## M

### **Malaltia:**

Pertorbació de la funció fisiològica normal d'un organisme, eventualment amb la mort d'aquest com a resultat final, causada per modificacions d'origen exogen (infeccions, mutilacions, etc) o endogen (malformacions, tumors, etc).

### **Manierisme:**

Moviments i gesticulacions supèrflues o desproporcionades que es traslladen a les accions i comportaments diaris (com caminar o escriure).

### **Meganàlisi:**

Metanàlisi de metanàlisis.

### **Metabòmica:**

Conjunt de ciències i tècniques destinades a l'estudi complet del conjunt de metabòlits, metabòlits intermediaris, metabòlits secundaris, hormones i altres molècules de senyalització. És un sistema d'anàlisi dinàmic, ja que el metaboloma d'un teixit canvia al llarg del temps.

### **Metanàlisi:**

Mètodes centrats en contrastar i combinar els resultats de diferents estudis per tal d'identificar resultats comuns entre ells, interaccions o discrepàncies. L'objectiu general d'una metanàlisi és estimar amb més força la veritable magnitud de l'efecte en comparació amb una mida de l'efecte menys precís derivat en un sol estudi.

### **MicroARN:**

Petites cadenes d'ARN no codificants. Una de les seves funcions conegudes és la regulació postranscripcional de l'expressió de gens mitjançada per la hibridació d'aquests microARN les regions UTR dels ARNm diana.

### **Microcefàlia:**

Petitesa del crani, que coincideix amb una atrofia del cervell.

### **Mioclònia:**

Fenomen consistent en contraccions musculars clòniques, no sistematitzades, que es repeteixen a intervals variables.

### **Miopatia:**

Afecció del sistema muscular esquelètic.

### **Mitjana geomètrica:**

També anomenada mitjana proporcional, la mitjana geomètrica d'una quantitat finita de  $n$  nombres és l'arrel  $n$ -èsima del producte de tots els nombres. Se sol utilitzar per variables amb una distribució no normal.

### **Mitochondrial Medicine Society:**

Societat internacional fundada per Richard Haas i Robert Naviaux i formada per metges, investigadors i clínics amb l'objectiu de treballar per un diagnòstic i tractament millors de les malalties mitocondrials.

**Mitosi:**

Procés de divisió de les cèl·lules somàtiques dels eucariotes, que consisteix, fonamentalment, en una divisió longitudinal dels cromosomes i en una divisió del citoplasma, i que origina dues cèl·lules filles genèticament iguals.

**Mutació:**

Les mutacions són canvis permanents en l'ADN que es transmeten a la descendència, que poden ser causades per agents exògens o endògens. També es pot produir per errades en la replicació i en la reparació de l'ADN. Les principals causes de variabilitat genètica, i conseqüentment de l'evolució de les espècies són les mutacions i les recombinacions meiótiques; encara que també poden produir o induir patologies. Malgrat aquesta n'és la definició estricta, en la literatura científica hi ha certa controvèrsia quant al seu ús. Actualment s'està tendint a restringir-lo a aquells canvis poc freqüents en el material genètic que tenen un efecte nociu en l'organisme que els conté.

**Mutació causant:**

Mutació estrictament lligada a l'aparició d'una malaltia o trastorn.

**Mutació germinal:**

Mutació que apareix en les cèl·lules productores de gàmetes i que per tant, es transmeten a la descendència.

**Mutació patològica:**

Mutació que comporta un efecte nociu per a la cèl·lula que la conté.

**Mutació somàtica:**

Coneguda també com mutació no heretada o mutació adquirida, que apareix al llarg de la vida de l'organisme que la conté i que no es troba en les cèl·lules germinals.

---

## n

**National Institutes of Health:**

Centre de recerca biomèdica dels més grans del món, localitzat a Bethesda (Maryland) que comprèn fins a 27 centres i instituts. És una institució del govern dels Estats Units.

**Neuroimatge:**

Conjunt de tècniques que permeten veure imatges in vivo del sistema nerviós central i del cervell. Existeixen tècniques de neuroimatge estructural (ressonància magnètica nuclear i tomografia axial computeritzada) i tècniques de neuroimatge funcional (ressonància magnètica funcional, tomografia d'emissió de positrons i tomografia computeritzada de emissió monofotònica).

**Neuropathology Consortium of the Stanley****Brain Foundation:**

L'Stanley foundation brain collection és una col·lecció de teixits cerebrals (recollits amb el consentiment corresponent de les famílies i posteriorment conservats) per tal de complementar les col·leccions ja existents i promoure estudis en esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major. El Neuropathology Consortium és un subconjunt de 60 exemplars de la col·lecció, comprès per quatre grups dignòstics (esquizofrènia, trastorn bipolar, depressió major i subjectes control) de 15 mostres cadascun. A data d'avui, s'han enviat més de 75.000 seccions d'aquests teixits cerebrals a 50 grups de recerca de tot el món, que han dut a terme una àmplia varietat

d'avaluacions, entre elles, les explicades en la present tesi. L'objectiu final és el d'integrar aquestes dades per proporcionar una imatge més completa de la neuropatologia d'aquests trastorns.

**Neuropatia:**

Afecció del sistema nerviós.

**Neuropsicologia:**

Disciplina de la psicologia que estudia la relació entre la funció cerebral i els processos cognitius, psicològics, emocionals i del comportament.

**Neurotransmissor:**

Agents químics produïts per les cèl·lules presinàptiques, per efecte d'una excitació neuronal que travessa la sinapsi i estimula o inhibeix la cèl·lula postsinàptica.

**Oftalmoplegia:**

Paràlisi dels músculs de l'ull.

**Oportunitat relativa (OR):**

Mesura estadística utilitzada fonamentalment en epidemiologia analítica per quantificar la força de l'associació estadística entre una exposició i una malaltia. L'oportunitat relativa és la raó entre dos quocients (l'oportunitat que un esdeveniment tingui lloc en un grup i l'oportunitat que tingui lloc en un altre grup), essent cadascun d'ells la raó entre la probabilitat que allò succeeixi i la probabilitat que no succeeixi. Si l'OR és igual a 1, la probabilitat de l'esdeveniment és igual en els dos grups. Si l'OR és més gran que 1, la probabilitat que ocorri l'esdeveniment és major en el primer grup (p. ex.: la presència d'un SNP és més probable en casos que

**Nistagme:**

Espasme clònic dels músculs motors del globus ocular que produeix moviments involuntaris d'aquest en diferents sentits.

**Nucleoides:**

Complexos nucleoproteics associats a l'ADNmt formats per diverses proteïnes i factors de transcripció relacionats amb la maquinària de transcripció i replicació de l'ADNmt. Es troben a la membrana interna del mitocondri.

**Nutracèutic:**

Dit del producte elaborat a partir de substàncies naturals pròpies dels aliments, que es presenta sota una forma farmacèutica determinada (comprimit, xarop, pòlvores, etc.) i al qual s'atribueix un efecte beneficiós per a l'organisme i la capacitat de contribuir a la prevenció o al tractament d'algunes malalties.

---

## O

en controls). Si l'OR és inferior a 1, la probabilitat que ocorri l'esdeveniment és més petita en el primer grup (p. ex.: la presència d'un SNP és menys probable en casos que en controls).

**Organització Mundial de la Salut:**

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) és una agència de l'Organització de les Nacions Unides (ONU) amb seu a Ginebra que actua com a autoritat coordinadora en temes de salut pública internacional i està especialitzada a gestionar les polítiques de prevenció, promoció i intervenció en salut a nivell mundial. Els 193 Estats Membres de l'OMS governen l'Organització per mitjà de l'Assemblea Mundial de la Salut.

#### **Origen de replicació:**

Lloc del cromosoma en el que s'inicia la replicació de la cadena d'ADN format per una determinada seqüència de nucleòtids a partir de la qual es forma la forqueta de replicació. En els cromosomes de l'ADNn hi ha diversos orígens de replicació repartits al llarg de la seqüència. L'ADNmt té dos orígens de replicació, un a la cadena lleugera i un a la pesada.

#### **Oxidació $\beta$ :**

Descomposició dels àcids grassos en forma de molècules d'acetil-CoA que són incorporades al cicle de Krebs per tal d'obtenir-ne energia en forma d'ATP mitjançant la cadena respiratòria mitocondrial.

## P

#### **Pancitopènia:**

Disminució del nombre d'eritròcits, de leucòcits i de plaquetes a la sang perifèrica.

#### **PCR:**

La reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès Polymerase Chain Reaction) és una tècnica de biologia molecular que permet obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment d'ADN concret a partir d'una quantitat mínima mitjançant uns encebadors específics i uns intervals de temperatura establerts. El procés fou descobert l'any 1983 per Kary Banks Mullis i és àmpliament emprat actualment tant en recerca com en diagnòstic.

#### **Pirimidina:**

Compost heretocíclic d'un sol cicle consistent en un anell semblant al benzè amb dos àtoms de nitrogen en l'anell aromàtic. És l'estructura bàsica dels nucleòtids timidina, citosina i uracil.

#### **Polimorfisme genètic:**

Presència en una mateixa població de dos o més variants al·lèliques per a un locus determinat, cadascuna amb una freqüència superior a 0,01, que no pot ésser mantinguda únicament per mutació. Els SNP (de l'anglès *single nucleotide polymorphism*), són un tipus de polimorfisme molt freqüent en el genoma humà, 1 cada 1000 bases. S'anomenen mtSNP els específics del mitocondri.

#### **Poliplàsmia:**

En l'ADNmt, presència moltes còpies de genoma mitocondrial en la mateixa cèl·lula.

#### **Prevalença:**

Proporció d'individus afectats per una mateixa malaltia en una població determinada i durant un temps determinat.

#### **Projecte del Genoma Humà:**

Projecte de recerca científica, desenvolupat entre l'any 1990 i 2002, creat amb l'objectiu de determinar la seqüència consens de nucleòtids de l'esser humà així com d'identificar i localitzar els prop de 25.000 gens presents en aquest genoma.

#### **Projecte HapMap:**

Projecte iniciat el 2002 amb l'objectiu de desenvolupar un mapa amb els haplotips del genoma humà. La seva tasca és la d'identificar els polimorfismes genètics del genoma humà, la seva distribució i els diferents blocs de desequilibri de lligament. Tota la informació es troba recollida al seu portal web públic, i s'hi poden trobar gens relacionats amb malalties, amb la resposta a medicaments o amb factors mediambientals.

#### **Promotor:**

Seqüència de DNA situada a 5' de la regió codificant d'un gen a la qual s'uneix l'ARN polimerasa i que determina el lloc d'inici de la transcripció.

#### **Proteòmica:**

Conjunt de ciències i tècniques destinades a l'estudi integral del nombre de proteïnes, la seva distribució i la seva interacció en un teixit.

#### **Psicopatologia:**

Descripció i anàlisi dels símptomes i signes de malaltia mental presents en un subjecte.

#### **Psychiatric Genomics Consortium:**

Consorti creat amb l'objectiu de realitzar metanàlisis de les dades de GWAS relacionades amb malalties psiquiàtriques, tot i que se centra, sobretot en esquizofrènia, trastorn bipolar, depressió major, trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat i autisme. En aquestes metanàlisis s'aconsegueix aplegar milers de mostres de cada categoria diagnòstica de tal manera que s'adquireix la potència estadística necessària per a detectar variants de baix risc associades a aquestes malalties.

#### **Ptosi:**

Caiguda d'un òrgan o d'una part d'un òrgan, especialment desplaçament d'una víscera com a conseqüència del relaxament dels seus mitjans de fixació.

#### **Purina:**

Compost heterocíclic d'estructura bicíclica consistent en un anell de pirimidina unit per un costat a un d'imidazole, l'esquelet del qual intervé en l'estructura d'un gran nombre de compostos naturals d'interès biològic, entre ells l'ADN. És l'estructura bàsica dels nucleòtids adenina i guanina.

## *r*

#### **Regions UTR:**

Regions no traduïdes dels ARNm situades a ambdós extrems d'aquest i que participen en la regulació de la transcripció gènica.

#### **Replicació:**

Procés de síntesi de l'ADN que fa possible la transmissió de la informació genètica entre generacions cel·lulars. En aquest procés, la doble hèlix d'ADN es va desenrotllant de tal manera que se separen les dues cadenes senzilles, cadascuna de les quals serveix de motlle per a l'elongació d'una nova cadena d'ADN que es va sintetitzant. Al final es formen dues noves dobles hèlixs idèntiques a la d'ADN original i que contenen exactament la mateixa informació genètica.

#### **Repositori del GenBank:**

Base de dades en constant actualització de seqüències genètiques públiques i disponibles que pertany a l'NIH (National Institutes of Health, dels Estats Units). Està formada per la base de dades d'ADN del Japó (DNA DataBank of Japan (DDBJ)), el Laboratori Europeu de Biologia Molecular (European Molecular Biology Laboratory (EMBL)), i el GenBank de l'NCBI (National Center for Biotechnology Information).

#### **Ritme circadiari:**

Dit del ritme biològic que té un cicle aproximat de vint-i-quatre hores.

## **S**

---

#### **Segregació mitòtica:**

Separació aleatòria dels mitocondris en les dues cèl·lules filles fruit de la divisió cel·lular.

Seqüenciació de l'ADN: Conjunt de mètodes i tècniques específiques que permeten determinar l'ordre dels nucleòtids d'un fragment concret del genoma o del genoma complet. El desenvolupament de les tècniques de seqüenciació ha aportat molta informació a la biologia i a la medicina, sobretot mitjançant el Projecte del Genoma Humà.

#### **Seqüenciació de nova generació:**

De l'anglès, next-generation sequencing, també anomenada seqüenciació d'alt rendiment o seqüenciació massiva en paral·lel és la metodologia de seqüenciació que permet la producció simultània de seqüències de diversos fragments d'ADN, reduint significativament el temps i el cost d'aquest procés. Actualment al mercat existeixen diversos mètodes, entre ells el semiconductor Ion Torrent de Life Technologies, el seqüenciador òptic d'Illumina, la piroseqüenciació de Roche i la seqüenciació per lligació de Life Technologies.

#### **Seqüenciació per Sanger:**

Mètode de seqüenciació que es basa en la PCR i en l'ús de didesoxinucleòtids trifosfat. Aquests, són nucleòtids que els manca un grup OH de tal manera que trunquen l'elongació de la nova cadena en la replicació d'un fragment d'ADN. Aquests didesoxinucleòtids incorporen una molècula fluorescent que emet longituds d'ona diferent en funció de si es tracta d'una adenina, una timina, una citosina o una guanina. La truncació seqüencial de les cadenes que s'elonguen a la PCR seguida d'una electroforesi i la detecció posterior de la fluorescència fruit d'aquest truncament, són els elements que permeten determinar la seqüència. Malgrat és una tècnica acurada, és costosa i requereix molt de temps.

#### **Significació estadística:**

Referida en el text com "diferències estadísticament significatives", és un concepte estadístic emprat en el contrast d'hipòtesis que implica el rebuig de la hipòtesi nul·la perquè els valors observats no són fruit de l'atzar. El valor  $p$  és la mesura que es fa servir per decidir si es rebutja la hipòtesi nul·la o no, en aquest treball es rebutja la hipòtesi nul·la si  $p < 0,05$ , per tant, que hi ha més d'un 95% de probabilitats que les diferències observades no siguin fruit de l'atzar.



### **Sonda Taqman:**

Oligonucleòtids curts emprats en la qPCR per a detectar l'amplificació seqüencial d'un fragment concret d'ADN mitjançant la detecció de l'increment de fluorescència. Aquests oligonucleòtids estan marcats amb un fluorocrom en un extrem i amb un extintor de fluorescència en l'altre extrem que quan està prop del fluorocrom capta la fluorescència que aquest emet. Aquestes sondes s'uneixen als gens diana que es volen

analitzar i durant l'elongació de la nova cadena d'ADN durant la PCR, es trenquen i els extintors s'alliberen. En aquest trencament de l'oligonucleòtid Taqman, s'allibera fluorescència que és simultàniament detectada per un aparell específic. Aquesta fluorescència s'incrementa a cada cicle de la PCR i permet quantificar de manera absoluta i de manera relativa l'ADN inicial.

## t

### **Termociclador:**

Aparell emprat en biologia molecular que permet realitzar de forma automàtica i programada els cicles de temperatures necessaris per a una reacció en cadena de la polimerasa d'amplificació d'ADN.

### **Transcripció:**

Procés pel qual la informació genètica codificada en una fibra d'ADN (en un gen estructural o un operó) és copiada en una fibra d'ARN missatger mitjançant la seqüència de nucleòtids que el componen.

### **Traducció:**

Procés mitjançant el qual es tradueix una determinada seqüència de nucleòtids de l'ARNm en una determinada seqüència d'aminoàcids (codi genètic) gràcies al concurs dels ribosomes.

### **Transcriptòmica:**

Conjunt de ciències i tècniques destinades a l'estudi integral del transcriptoma, és a dir, del conjunt d'ARN presents en un teixit.

### **Trastorn:**

Malaltia que compromet el normal funcionament d'un ésser humà, però de la qual no es coneix l'etiologia ni la fisiopatologia.

## v

### **Variant comuna:**

Canvi permanent en l'ADN en una freqüència superior a l'1% en la població. Cada individu de l'espècie humana comparteix el 99% de la seqüència amb la resta de persones de tot el món. L'1% restant correspon a les variants comunes.

### **Variant de risc:**

Variante que, malgrat no ser causant, està associada a un determinat fenotip o confereix risc a desenvolupar una malaltia.

**Variant definidora d'haplogrup:**

Variant en l'ADNmt que forma part d'un conjunt de variants relacionades entre sí per la seva descendència.

**Variant en el número de còpies:**

Coneguda en la literatura científica com CNV (de l'anglès copy number variation), és un canvi en el nombre de repeticions d'una seqüència concreta del genoma. Pot ser per un augment d'aquest nombre de repeticions (duplicacions) o per una pèrdua (delecions). El 0,4% de les variacions entre les persones corresponen a variants de canvi en el número de còpies.

**Variant genètica:**

Una variant genètica es pot referir a 1) un SNP, un canvi d'un únic nucleòtid freqüent en la població; 2) a una mutació o variant rara; o 3) a una CNV, un canvi del número de còpies d'una determinada regió de l'ADN.

**Variant rara:**

Variant, d'un sol nucleòtid o estructural, present en una freqüència inferior a l'1% en la població.

**Variant/mutació amb canvi de sentit:**

Variant/mutació d'un sol nucleòtid que ocasiona un canvi en el codó de l'ARNm de tal manera que aquest codifica per un aminoàcid diferent.

**Variant/mutació d'un sol nucleòtid:**

Canvi d'un únic nucleòtid de la seqüència d'ADN i que implica la presència en una mateixa població de dos o més variants, i per tant, d'al·lels, per a un locus determinat.

**Variant/mutació estructural:**

Reorganització del material genètic que produeix una alteració en l'estructura cromosòmica. Si bé les més freqüents són les CNVs, també s'inclouen en aquest grup les delecions, insercions i translocacions. Les variants estructurals són la principal font de variabilitat genètica en l'espècie humana.

**Variant/mutació nova:**

Variant no descrita anteriorment en la literatura científica.

**Variant/mutació sinònima:**

Variant/mutació d'un sol nucleòtid que si bé origina un canvi en el codó de l'ARNm, aquest no ocasiona un canvi en l'aminoàcid pel qual codifica.

---

## W

**Western Blot:**

Tècnica que permet la identificació immunològica de proteïnes concretes havent-les separat prèviament mitjançant un gel d'electroforesi.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ANÀLISI DE L'ADN MITOCONDRIAL EN EL TRASTORN MENTAL GREU  
Helena Torrell Galceran  
DL: T 1110-2014

---

## Referències

### a

- Abasolo**, N., Torrell, H., Roig, B., Moyano, S., Vilella, E., Martorell, L. (2011). RT-qPCR study on post-mortem brain samples from patients with major psychiatric disorders: Reference genes and specimen characteristics. *Journal of Psychiatric Research*. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.06.00
- Abdoimaleky**, H. M., Cheng, K.-H., Faraone, S. V., Wilcox, M., Glatt, S. J., Gao, F., Smith, C.L., Shafa, R., Aeali, B., Carnevale, J., Pan, H., Papageorgis, P., Ponte, J.F., Sivaraman, V., Tsuang, M.T., Thiagalingam, S. (2006). Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Human Molecular Genetics*, 15(21), 3132–3145. doi:10.1093/hmg/ddl253
- Adzhubei**, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4):248-9. doi: 10.1038/nmeth0410-248
- Ahqvist**, K. J., Hämäläinen, R. H., Yatsuga, S., Uutela, M., Terzioglu, M., Götz, A., Forsström, S., Salven, P., Angers-Loustau, A., Kopra, O.H., Tynismaa, H., Larsson, N.G., Wartiovaara, K., Prolla, T., Trifunovic, A., Suomalainen, A. (2012). Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in Polg mutator mice. *Cell Metabolism*, 15(1), 100–109. doi:10.1016/j.cmet.12.11.2011
- Alberts**, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., Roberts K. (2002). *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition*. Routledge
- Altar**, C. A., Jurata, L. W., Charles, V., Lemire, A., Liu, P., Bukhman, Y., Young, T.A., Bullard, J., Yokoe, H., Webster, M.J., Knable, M.B., Brockman, J. A. (2005). Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biological Psychiatry*, 58(2), 85–96. doi:10.1016/j.biopsych.31.03.2005
- Amar**, S., Shamir, A., Ovadia, O., Blanaru, M., Reshef, A., Kremer, I., Rietsche, I. M., Schulze, T.G., Maier, W., Belmaker, R.H., Ebstein, R.P., Agam, G., Mishmar, D. (2007). Mitochondrial DNA HV lineage increases the susceptibility to schizophrenia among Israeli Arabs. *Schizophrenia Research*, 94(1-3), 354–358. doi:10.1016/j.schres.20.04.2007
- American Psychiatric Association**. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4a ed., text rev.)*
- Ameur**, A., Stewart, J. B., Freyer, C., Hagström, E., Ingman, M., Larsson, N.-G., Gyllensten, U. (2011). Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: mutational patterns and their origins. *PLoS Genetics*, 7(3), e1002028. doi:10.1371/journal.pgen.1002028
- Anderson**, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., Bruijn, M. H. de, Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465.

---

**Andreazza, A. C.** (2012). Combining redox-proteomics and epigenomics to explain the involvement of oxidative stress in psychiatric disorders. *Molecular bioSystems*, 8(10), 2503–2512. doi:10.1039/c2mb25118c; 10.1039/c2mb25118c

**Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., Howell, N.** (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23(2), 147. doi:10.1038/13779

**Anglin, R. E., Garside, S. L., Tarnopolsky, M. A., Mazurek, M. F., Rosebush, P. I.** (2012a). The psychiatric manifestations of mitochondrial disorders: a case and review of the literature. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 73(4), 506–512. doi:10.4088/JCP.11r07237; 10.4088/JCP.11r07237

**Anglin, R. E. S., Mazurek, M. F., Tarnopolsky, M. A., Rosebush, P. I.** (2012b). The mitochondrial genome and psychiatric illness. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 159B(7), 749–59. doi:10.1002/ajmg.b.32086

**Anglin, R. E., Rosebush, P. I., Mazurek, M. F.** (2010). Treating psychiatric illness in patients with mitochondrial disorders. *Psychosomatics*, 51(2), 179; author reply 179–180. doi:10.1176/appi.psy.51.2.179

**Arendt, M., Mortensen, P. B., Rosenberg, R., Pedersen, C. B., Waltoft, B. L.** (2008). Familial predisposition for psychiatric disorder: comparison of subjects treated for cannabis-induced psychosis and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 65(11), 1269–1274. doi:10.1001/archpsyc.65.11.1269

**Ashley, M. V., Laipis, P. J., Hauswirth, W. W.** (1989). Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 17(18), 7325–7331.

**Attardi, G., Schatz, G.** (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell Biology*, 4, 289–333. doi:10.1146/annurev.cb.04.110188.001445

## b

**Balaban, R. S.** (1990). Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *The American Journal of Physiology*, 258(3 Pt 1), C377–389.

**Balaban, R. S., Nemoto, S., Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483–495. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001

**Balhara, Y. P., Verma, R.** (2012). Schizophrenia and suicide. *East Asian Archives of Psychiatry: Official Journal of the Hong Kong College of Psychiatrists*, 22(3), 126–133.

**Bamne, M. N., Talkowski, M. E., Moraes, C. T., Manuck, S. B., Ferrell, R. E., Chowdari, K. V., Nimgaonkar, V. L.** (2008). Systematic association studies of mitochondrial DNA variations in schizophrenia: focus on the ND5 gene. *Schizophrenia Bulletin*, 34(3), 458–465. doi:10.1093/schbul/sbm100

**Bandelt, H. J., Yao, Y. G., Kivisild, T.** (2005). Mitochondrial genes and schizophrenia? *Schizophrenia Research*, 72(2-3):267-9

**Baran, C. P., Zeigler, M. M., Tridandapani, S., Marsh, C. B.** (2004). The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Current Pharmaceutical Design*, 10(8), 855–866.

- Bartosz**, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*, 77(8), 1303–1315. doi:10.1016/j.bcp.09.11.2008
- Bartzokis**, G. (2011). Neuroglialpharmacology: white matter pathophysiology and psychiatric treatments. *Frontiers in Bioscience*. 16:2695-2733
- Beech**, R. D., Lowthert, L., Leffert, J. J., Mason, P. N., Taylor, M. M., Umlauf, S., Lin, A., Lee, J.Y., Maloney, K., Muralidharan, A., Lorberg, B., Zhao, H., Newton, S.S., Mane, S., Epperson, C.N., Sinha, R., Blumberg, H., Bhagwagar, Z. (2010). Increased peripheral blood expression of electron transport chain genes in bipolar depression. *Bipolar Disorders*, 12(8), 813–824. doi:10.1111/j.1399-5618.2010.00882.x
- Ben-Shachar**, D., Karry, R. (2008). Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS One*, 3(11), e3676. doi:10.1371/journal.pone.0003676
- Ben-Shachar**, D., Zuk, R., Gazawi, H., Reshef, A., Sheinkman, A., Klein, E. (1999). Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2(4), 245–253. doi:10.1017/S1461145799001649
- Bergemann**, E. R., Boles, R. G. (2010). Maternal inheritance in recurrent early-onset depression. *Psychiatric Genetics*, 20(1), 31–34. doi:10.1097/YPG.0b013e3283351153
- Bernier**, F. P., Boneh, A., Dennett, X., Chow, C. W., Cleary, M. A., Thorburn, D. R. (2002). Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology*, 59(9):1406-11.
- Birdsill**, A. C., Walker, D. G., Lue, L., Sue, L. I., Beach, T. G. (2011). Postmortem interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell and Tissue Banking*, 12(4), 311–318. doi:10.1007/s10561-010-9210-8
- Bogenhagen**, D. F., Wang, Y., Shen, E. L., Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(11), 1205–1216. doi:10.1074/mcp.M300035-MCP200
- Boles**, R. G., Burnett, B. B., Gleditsch, K., Wong, S., Guedalia, A., Kaariainen, A., Eloed, J., Stern, A., Brumm, V. (2005). A high predisposition to depression and anxiety in mothers and other matrilineal relatives of children with presumed maternally inherited mitochondrial disorders. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 137B(1), 20–24. doi:10.1002/ajmg.b.30199
- Bouchard**, C., Daw, E. W., Rice, T., Pérusse, L., Gagnon, J., Province, M. A., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J. H. (1998). Familial resemblance for VO2max in the sedentary state: the HERITAGE family study. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(2), 252–258.
- Bowmaker**, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A., Holt, I. J. (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50961–50969. doi:10.1074/jbc.M308028200
- Bratic**, A., Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951–957. doi:10.1172/JCI64125
- Brown**, A. S., Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *The American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09030361
- Buchsbaum**, M. S., Buchsbaum, B. R., Hazlett, E. A., Haznedar, M. M., Newmark, R., Tang, C. Y., Hof, P. R. (2007). Relative glucose metabolic rate higher in white matter in patients with schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 164(7), 1072–1081. doi:10.1176/appi.ajp.164.7.1072

**Burk, A.**, Douzery, E.J.P., Springer, M.S. (2002). The Secondary Structure of Mammalian Mitochondrial 16S rRNA Molecules: Refinements Based on a Comparative Phylogenetic Approach. *Journal of Mammalian Evolution*, 9(3).

**Burmeister, M.**, McInnis, M. G., Zöllner, S. (2008). Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nature Reviews Genetics*, 9(7), 527–540. doi:10.1038/nrg2381

**Bustin, S A.**, Beaulieu, J. F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S., Olsvik, P. A., Penning, L. C., Toegel, S. (2010). MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, 11:74.

**Byrne, E. M.**, McRae, A. F., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Martin, N. G., Wright, M. J., Montgomery, G.W., Visscher, P. M. (2009). Association study of common mitochondrial variants and cognitive ability. *Behavior Genetics*, 39(5), 504–512. doi:10.1007/s10519-009-9276-x

## C

**Cann, R. L.**, Stoneking, M., Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325(6099), 31–36. doi:10.1038/325031a0

**Cardellach, F.**, Alonso, J. R., López, S., Casademont, J., Miró, O. (2003). Effect of smoking cessation on mitochondrial respiratory chain function. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 41(3), 223–8.

**Carr, C. P.**, Martins, C. M. S., Stingel, A. M., Lemgruber, V. B., Juruena, M. F. (2013). The role of early life stress in adult psychiatric disorders: a systematic review according to childhood trauma subtypes. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 201(12), 1007–1020. doi:10.1097/NMD.000000000000049

**Casademont, J.**, Garrabou, G., Miro, O., Lopez, S., Pons, A., Bernardo, M., Cardellach, F. (2007). Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 27(3), 284–288. doi:10.1097/JCP.0b013e318054753e

**Cataldo, A. M.**, McPhie, D. L., Lange, N. T., Punzell, S., Elmilly, S., Ye, N. Z., Froimowitz, M.P., Hassinger, L.C., Menesale, E.B., Sargent, L.W., Logan, D.J., Carpenter, A.E., Cohen, B. M. (2010). Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. *The American Journal of Pathology*, 177(2), 575–585. doi:10.2353/ajpath.2010.081068

**Cavelier, L.**, Jazin, E. E., Eriksson, I., Prince, J., Båve, U., Orelund, L., Gyllenstein, U. (1995). Decreased cytochrome-c oxidase activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics. *Genomics*, 29(1), 217–224. doi:10.1006/geno.1995.1234

**Chanock, S. J.**, Manolio, T., Boehnke, M., Boerwinkle, E., Hunter, D. J., Thomas, G., Hirschhorn, J.N., Abecasis, G., Altshuler, D., Bailey-Wilson, J.E., Brooks, L.D., Cardon, L.R., Daly, M., Donnelly, P., Fraumeni, J.F. Jr., Freimer, N.B., Gerhard, D.S., Gunter, C., Guttmacher, A.E., Guyer, M.S., Harris, E.L., Hoh, J., Hoover, R., Kong, C.A., Merikangas, K.R., Morton, C.C., Palmer, L.J., Phimister, E.G., Rice, J.P., Roberts, J., Rotimi, C., Tucker, M.A., Vogan, K.J., Wacholder, S., Wijsman, E.M., Winn, D.M., Collins, F. S. (2007). Replicating genotype-phenotype associations. *Nature*, 447(7145), 655–660. doi:10.1038/447655a

**Chevyreva**, I., Faull, R. L. M., Green, C. R., Nicholson, L. F. B. (2008). Assessing RNA quality in postmortem human brain tissue. *Experimental and Molecular Pathology*, 84(1), 71–77. doi:10.1016/j.yexmp.2007.08.019

**Chinnery**, P. F. (2006). Mitochondrial DNA in Homo sapiens. A: Bandelt H.J., Macaulay V., Richards M., eds. Human mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. Springer, 2006. p.3-13

**Chinnery**, P. F. (2010). Mitochondrial Disorders Overview. A: Pagon, R.A., Adam, M.P., Bird, T.D., Dolan, C.R., Fong, C., Smith, R.J.H., Stephens K., eds. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014

**Chinnery**, P. F., DiMauro, S., Shanske, S., Schon, E. A., Zeviani, M., Mariotti, C., Carrara, F., Lombes, A., Laforet, P., Ogier, H., Jaksch, M., Lochmüller, H., Horvath, R., Deschauer, M., Thorburn, D.R., Bindoff, L.A., Poulton, J., Taylor, R.W., Matthews, J.N., Turnbull, D. M. (2004). Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet*, 364(9434), 592–596. doi:10.1016/S0140-6736(04)16851-16857

**Chinnery**, P. F., Thorburn, D. R., Samuels, D. C., White, S. L., Dahl, H. M., Turnbull, D. M., Lightowlers, R.N., Howell, N. (2000). The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends in Genetics*, 16(11), 500–505.

**Ciafaloni**, E., Ricci, E., Shanske, S., Moraes, C. T., Silvestri, G., Hirano, M., Simonetti, S., Angelini, C., Donati, M.A., Garcia, C. (1992). MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Annals of Neurology*, 31(4), 391–398. doi:10.1002/ana.410310408

**Copeland**, W. C. (2008). Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annual Review of Medicine*, 59, 131–146. doi:10.1146/annurev.med.59.053006.104646

**Cousins**, D. A., Butts, K., Young, A. H. (2009). The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, 11(8), 787–806. doi:10.1111/j.1399-5618.2009.00760.x

**Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium**; Genetic Risk Outcome of Psychosis (GROUP) Consortium (2013). Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. (2013). *Lancet*, 381(9875), 1371–1379. doi:10.1016/S0140-6736(12)62129-1 |

**Crowley**, J. J., Hilliard, C. E., Kim, Y., Morgan, M. B., Lewis, L. R., Muzny, D. M., Hawes, A.C., Sabo, A., Wheeler, D.A., Lieberman, J.A., Sullivan, P.F., Gibbs, R. A. (2013). Deep resequencing and association analysis of schizophrenia candidate genes. *Molecular Psychiatry*, 18(2), 138–140. doi:10.1038/mp.2012.28

**Cruceanu**, C., Ambalavanan, A., Spiegelman, D., Gauthier, J., Lafrenière, R. G., Dion, P. A., Alda, M., Turecki, G., Rouleau, G. A. (2013). Family-based exome-sequencing approach identifies rare susceptibility variants for lithium-responsive bipolar disorder. *Genome / National Research Council Canada*, 56(10), 634–640.



---

*d*

**Dantzer**, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56. doi:10.1038/nrn2297

**Delisi**, L. E., Razi, K., Stewart, J., Relja, M., Shields, G., Smith, A. B., Wellman, N., Larach, V.W., Loftus, J., Vita, A., Comazzi, M., Crow, T. J. (2000). No evidence for a parent-of-origin effect detected in the pattern of inheritance of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 48(7), 706–709.

**Dimauro**, S., Davidzon, G. (2005). Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine*, 37(3), 222–232. doi:10.1080/07853890510007368

**Dimauro**, S., Schon, E. A. (1998). Nuclear power and mitochondrial disease. *Nature Genetics*, 19(3), 214–215. doi:10.1038/883

**Doyle**, G. A., Dahl, J. P., Bloch, P. J., Weller, A. E., Lohoff, F. W., Ferraro, T. N., Berrettini, W. H. (2011). Association study of polymorphisms in the autosomal mitochondrial complex I subunit gene, NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, and bipolar disorder. *Psychiatric Genetics*, 21(1), 51–52. doi:10.1097/YPG.0b013e328341333f

**Dror**, N., Klein, E., Karry, R., Sheinkman, A., Kirsh, Z., Mazor, M., Tzukerman, M., Ben-Shachar, D. (2002). State-dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 7(9), 995–1001. doi:10.1038/sj.mp.4001116

*e*

**Edgar**, D., Shabalina, I., Camara, Y., Wredenberg, A., Calvaruso, M. A., Nijtmans, L., Nedergaard, J., Cannon, B., Larsson, N.G., Trifunovic, A. (2009). Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metabolism*, 10(2), 131–138. doi:10.1016/j.cmet.10.06.2009

**El-Hattab**, A. W., Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics*, 10(2), 186–198. doi:10.1007/s13311-013-0177-6; 10.1007/s13311-013-0177-6



- Fattal**, O., Budur, K., Vaughan, A. J., Franco, K. (2006). Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases. *Psychosomatics*, 47(1), 1–7. doi:10.1176/appi.psy.47.1.1
- Fattal**, O., Link, J., Quinn, K., Cohen, B. H., Franco, K. (2007). Psychiatric comorbidity in 36 adults with mitochondrial cytopathies. *CNS Spectrums*, 12(6), 429–438.
- Fernández-Caggiano**, M., Barallobre-Barreiro, J., Rego-Pérez, I., Crespo-Leiro, M. G., Paniagua, M. J., Grillé, Z., Blanco, F.J., Doménech, N. (2013). Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion*, 13(4), 263–268. doi:10.1016/j.mito.05.03.2013
- Fernández-Silva**, P., Enriquez, J. A., Montoya, J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology*, 88(1), 41–56
- Fineberg**, A. M., Ellman, L. M. (2013). Inflammatory cytokines and neurological and neurocognitive alterations in the course of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 73(10), 951–966. doi:10.1016/j.biopsych.01.01.2013
- Finsterer**, J. (2004). Mitochondriopathies. *European Journal of Neurology*, 11(3), 163–186.
- Finsterer**, J., Mahjoub, S. Z. (2012). Primary mitochondrial arteriopathy. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 22(5), 393–399. doi:10.1016/j.numecd.02.01.2012
- Finsterer**, J., Segall, L. (2010). Drugs interfering with mitochondrial disorders. *Drug and Chemical Toxicology*, 33(2), 138–151. doi:10.3109/01480540903207076
- Frey**, B. N., Stanley, J. A., Nery, F. G., Monkul, E. S., Nicoletti, M. A., Chen, H.H., Hatch, J.P., Caetano, S.C., Ortiz, O., Kapczinski, F., Soares, J. C. (2007). Abnormal cellular energy and phospholipid metabolism in the left dorsolateral prefrontal cortex of medication-free individuals with bipolar disorder: an in vivo 1H MRS study. *Bipolar Disorders*, 9 Suppl 1, 119–127. doi:10.1111/j.1399-5618.2007.00454.x
- Fromer**, M., Pocklington, A.J., Kavanagh, D.H., Williams, H.J., Dwyer, S., Gormley, P., Georgieva, L., Rees, E., Palta, P., Ruderfer, D.M., Carrera, N., Humphreys, I., Johnson, J.S., Roussos, P., Barker, D.D., Banks, E., Milanova, V., Grant, S.G., Hannon, E., Rose, S.A., Chambert, K., Mahajan, M., Scolnick, E.M., Moran, J.L., Kirov, G., Palotie, A., McCarroll, S.A., Holmans, P., Sklar, P., Owen, M.J., Purcell, S.M., O'Donovan, M.C. (2014). De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*, Epub ahead of print doi: 10.1038/nature12929.
- Fujimoto**, T., Nakano, T., Takano, T., Hokazono, Y., Asakura, T., Tsuji, T. (1992). Study of chronic schizophrenics using 31P magnetic resonance chemical shift imaging. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 86(6), 455–462.
- Fuke**, S., Kametani, M., Kato, T. (2008). Quantitative analysis of the 4977-bp common deletion of mitochondrial DNA in postmortem frontal cortex from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 439(2), 173–177. doi:10.1016/j.neulet.2008.05.009



- Gardner**, A., Boles, R. G. (2011). Comment on treatment of psychiatric illness in patients with mitochondrial disease. *Psychosomatics*, 52(5), 497–498. doi:10.1016/j.psymb.25.01.2011
- Gardner**, A., Johansson, A., Wibom, R., Nennesmo, I., von Döbeln, U., Hagenfeldt, L., Hallström, T. (2003). Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *Journal of Affective Disorders*, 76(1-3), 55–68
- Garesse**, R., Vallejo, C. G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*, 263(1-2), 1–16.
- Garrido**, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A. M., Spelbrink, J. N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Molecular Biology of the Cell*, 14(4), 1583–1596. doi:10.1091/mbc.E02-07-0399
- Gawryluk**, J. W., Wang, J.-F., Andrezza, A. C., Shao, L., Young, L. T. (2011). Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(1), 123–130. doi:10.1017/S1461145710000805
- Gentry**, K. M., Nimgaonkar, V. L. (2000). Mitochondrial DNA variants in schizophrenia: association studies. *Psychiatric Genetics*, 10(1), 27–31.
- Gershon**, E. S., Badner, J. A., Detera-Wadleigh, S. D., Ferraro, T. N., Berrettini, W. H. (1996). Maternal inheritance and chromosome 18 allele sharing in unilineal bipolar illness pedigrees. *American Journal of Medical Genetics*, 67(2):202-7
- Giles**, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6715–6719
- Girard**, S. L., Gauthier, J., Noreau, A., Xiong, L., Zhou, S., Jouan, L., Dionne-Laporte, A., Spiegelman, D., Henrion, E., Diallo, O., Thibodeau, P., Bachand, I., Bao, J.Y., Tong, A.H., Lin, C.H., Millet, B., Jaafari, N., Joober, R., Dion, P.A., Lok, S., Krebs, M.O., Rouleau, G. A. (2011). Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nature Genetics*, 43(9), 860–863. doi:10.1038/ng.886
- Giusti-Rodríguez**, P., Sullivan, P. F. (2013). The genomics of schizophrenia: update and implications. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(11), 4557–4563 doi:10.1172/JCI66031
- Gladyshev**, V. N. (2014). The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxidants Redox Signaling*, 20(4), 727–731. doi:10.1089/ars.2013.5228
- Glancy**, B., Balaban, R. S. (2012). Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*, 51(14), 2959–2973. doi:10.1021/bi2018909
- Goldstein**, J. M., Faraone, S. V., Chen, W. J., Tsuang, M. T. (1992). Gender and the familial risk for schizophrenia. Disentangling confounding factors. *Schizophrenia Research*, 7(2), 135–140.
- Goto**, Y., Nonaka, I., Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 348(6302), 651–653. doi:10.1038/348651a0

---

**Gottesman, I. I., Bertelsen, A.** (1989). Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Risks in the offspring of Fischer's Danish identical and fraternal discordant twins. *Archives of General Psychiatry*, 46(10), 867–872

**Grigoriou-Serbanescu, M., Martinez, M., Nöthen, M. M., Propping, P., Milea, S., Mihailescu, R., Marinescu, E.** (1998). Patterns of parental transmission and familial aggregation models in bipolar affective disorder. *American Journal of Medical Genetics*, 81(5), 397–404

**Gu, F., Chauhan, V., Kaur, K., Brown, W. T., LaFauci, G., Weigiel, J., Chauhan, A.** (2013). Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Translational Psychiatry*, 3, e299. doi:10.1038/tp.2013.68

**Gubert, C., Stertz, L., Pfaffenseller, B., Panizzutti, B. S., Rezin, G. T., Massuda, R., Streck, E. L., Gama, C. S., Kapczynski, F., Kunz, M.** (2013). Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *Journal of Psychiatric Research*, 47(10), 1396–402. doi:10.1016/j.jpsychires.2013.06.018

**Guo, Z., Yang, H., Wang, C., Liu, S.** (2012). Mitochondrial DNA haplogroup M is associated with late onset of hepatocellular carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(3), 499–502. doi:10.3892/etm.2011.434

## h

**Hao, H., Bonilla, E., Manfredi, G., DiMauro, S., Moraes, C. T.** (1995). Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *American Journal of Human Genetics*, 56(5), 1017–1025.

**Harman, D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300

**He, L., Chinnery, P. F., Durham, S. E., Blakely, E. L., Wardell, T. M., Borthwick, G. M., Taylor, R. W., Turnbull, D. M.** (2002). Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(14), e68.

**Hirano, M., Shtilbans, A., Mayeux, R., Davidson, M. M., DiMauro, S., Knowles, J. A., Schon, E. A.** (1997). Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus-embedded mtDNA pseudogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14894–14899

**Holsboer, F.** (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *Journal of Affective Disorders*, 62(1-2), 77–91

**Holt, I. J., Harding, A. E., Morgan-Hughes, J. A.** (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331(6158), 717–719. doi:10.1038/331717a0

---

**Holt**, I. J., Lorimer, H. E., Jacobs, H. T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 100(5), 515–524

**Hong**, C. J., Liou, Y. J., Liao, D. L., Hou, S. J., Yen, F. C., Tsai, S. J. (2007). Association study of polymorphisms in the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 (aralar) gene with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31(7), 1510–1513. doi:10.1016/j.pnpbp.10.07.2007

*i*

**Ichikawa**, T., Arai, M., Miyashita, M., Arai, M., Obata, N., Nohara, I., Oshima, K., Niizato, K., Okazaki, Y., Doi, N., Itokawa, M. (2012). Schizophrenia: maternal inheritance and heteroplasmy of mtDNA mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 105(1), 103–109. doi:10.1016/j.ymgme.2011.09.034

**International Schizophrenia Consortium**. (2008). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. (2008). *Nature*, 455(7210), 237–241. doi:10.1038/nature07239.

**Inuwa**, I. M., Peet, M., Williams, M. A. (2005). QSAR modeling and transmission electron microscopy stereology of altered mitochondrial ultrastructure of white blood cells in patients diagnosed as schizophrenic and treated with antipsychotic drugs. *Biotechnic & Histochemistry*, 80(3-4), 133–137. doi:10.1080/10520290500303349

*j*

**Jenuth**, J. P., Peterson, A. C., Fu, K., Shoubridge, E. A. (1996). Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 14(2), 146–151. doi:10.1038/ng1096-146

**Hosak**, L. (2013). New findings in the genetics of schizophrenia. *World Journal of Psychiatry*, 3(3), 57–61. doi:10.5498/wjp.v3.i3.57

**Iritani**, S. (2013). What happens in the brain of schizophrenia patients?: an investigation from the viewpoint of neuropathology. *Nagoya Journal of Medical Science*, 75(1-2), 11–28

**Iwamoto**, K., Bundo, M., Kato, T. (2005). Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Human Molecular Genetics*, 14(2), 241–253 doi:10.1093/hmg/ddi022

**Jones**, I., Kent L., Craddock N. (2004) Genetics of affective disorder. A: McGuffin P., Owen M.J., Gottesman I.I., eds. *Psychiatric genetics and genomics*. Oxford: Oxford University Press. 2004; p.211-245

---

## k

**Kakiuchi**, C., Ishiwata, M., Kametani, M., Nelson, C., Iwamoto, K., Kato, T. (2005). Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletions in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8(4), 515–522. doi:10.1017/S1461145705005213

**Karry**, R., Klein, E., Ben Shachar, D. (2004). Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a postmortem study. *Biological Psychiatry*, 55(7), 676–684. doi:10.1016/j.biopsych.12.12.2003

**Kato**, T., Kunugi, H., Nanko, S., Kato, N. (2000). Association of bipolar disorder with the 5178 polymorphism in mitochondrial DNA. *American Journal of Medical Genetics*, 96(2), 182–186.

**Kato**, T., Kunugi, H., Nanko, S., Kato, N. (2001). Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*, 62(3), 151–64.

**Kato**, T., Stine, O. C., McMahon, F. J., Crowe, R. R. (1997). Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brain of patients with bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, 42(10), 871–875. doi:10.1016/S0006-3223(97)00012-7

**Kato**, T., Takahashi, Y. (1996). Deletion of leukocyte mitochondrial DNA in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*, 37(2-3), 67–73

**Kato**, T., Winokur, G., Coryell, W., Keller, M. B., Endicott, J., Rice, J. (1996). Parent-of-origin effect in transmission of bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics*, 67(6), 546–50.

**Kay**, S. R., Fiszbein, A., Opler, L. A. (1987). The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 13(2), 261–276

**Kazuno**, A., Munakata, K., Mori, K., Nanko, S., Kunugi, H., Nakamura, K., Mori, N., Yamada, K., Yoshikawa, T., Kato, N., Kato, T. (2009). Mitochondrial DNA haplogroup analysis in patients with bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 150B(2), 243–247. doi:10.1002/ajmg.b.30804

**Kazuno**, A., Munakata, K., Nagai, T., Shimozono, S., Tanaka, M., Yoneda, M., Kato, N., Miyawaki, A., Kato, T. (2006). Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. *PLoS Genetics*, 2(8), e128. doi:10.1371/journal.pgen.0020128

**Kazuno**, A. A., Munakata, K., Mori, K., Tanaka, M., Nanko, S., Kunugi, H., Umekage, T., Tochigi, M., Kohda, K., Sasaki, T., Akiyama, T., Washizuka, S., Kato, N., Kato, T. (2005). Mitochondrial DNA sequence analysis of patients with "atypical psychosis". *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 59(4), 497–503. doi:10.1111/j.1440-1819.2005.01404.x

**Kegeles**, L. S., Humaran, T. J., Mann, J. J. (1998). In vivo neurochemistry of the brain in schizophrenia as revealed by magnetic resonance spectroscopy. *Biological Psychiatry*, 44(6), 382–398

**Kendler**, K.S. (2013). What psychiatric genetics has taught us about the nature of psychiatric illness and what is left to learn. *Molecular Psychiatry*, 18(10):1058-1066. doi: 10.1038/mp.2013.50.

**Khemka**, D., Ali, J. A., Koch, C. A. (2011). Primary hypothyroidism associated with acute mania: case series and literature review. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 119(8), 513–517. doi:10.1055/s-0031-1277137

- Kim, M.-Y., Lee, J.-W., Kang, H.-C., Kim, E., Lee, D.-C.** (2011). Leukocyte mitochondrial DNA (mtDNA) content is associated with depression in old women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 53(2), e218–221. doi:10.1016/j.archger.2010.11.019
- Kirk, R., Furlong, R. A., Amos, W., Cooper, G., Rubinsztein, J. S., Walsh, C., Paykel, E.S., Rubinsztein, D. C.** (1999). Mitochondrial genetic analyses suggest selection against maternal lineages in bipolar affective disorder. *American Journal of Human Genetics*, 65(2), 508–518. doi:10.1086/302507
- Kivisild, T., Shen, P., Wall, D. P., Do, B., Sung, R., Davis, K., Passarino, G., Underhill, P.A., Scharfe, C., Torroni, A., Scozzari, R., Modiano, D., Coppa, A., Knijff, P. de, Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L., Oefner, P. J.** (2006). The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*, 172(1), 373–387. doi:10.1534/genetics.105.043901
- Klengel, T., Binder, E. B.** (2013). Gene-environment interactions in major depressive disorder. *Canadian Journal of Psychiatry*, 58(2), 76–83
- Kmiec, B., Woloszynska, M., Janska, H.** (2006). Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics*, 50(3), 149–159. doi:10.1007/s00294-006-0082-1
- Koene, S., Kozicz, T. L., Rodenburg, R. J., Verhaak, C. M., de Vries, M. C., Wortmann, S., van de Heuvel, L., Smeitink, J.A., Morava, E.** (2009). Major depression in adolescent children consecutively diagnosed with mitochondrial disorder. *Journal of Affective Disorders*, 114(1-3), 327–332. doi:10.1016/j.jad.23.06.2008
- Kofink, D., Boks, M. P. M., Timmers, H. T. M., Kas, M. J.** (2013). Epigenetic dynamics in psychiatric disorders: environmental programming of neurodevelopmental processes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(5), 831–845. doi:10.1016/j.neubiorev.20.03.2013
- Kolomeets, N. S., Uranova, N. A.** (1999). Synaptic contacts in schizophrenia: studies using immunocytochemical identification of dopaminergic neurons. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 29(2), 217–221
- Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Wong, W.S., Sigurdsson, G., Walters, G.B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D.F., Helgason, A., Magnusson, O.T., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K.** (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, 488(7412), 471–475. doi:10.1038/nature11396
- Konradi, C., Eaton, M., MacDonald, M. L., Walsh, J., Benes, F. M., Heckers, S.** (2004). Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Archives of General Psychiatry*, 61(3), 300–308. doi:10.1001/archpsyc.61.3.300
- Kraus, R. P., Phoenix, E., Edmonds, M. W., Nicholson, I. R., Chandarana, P. C., Tokmakejian, S.** (1997). Exaggerated TSH responses to TRH in depressed patients with "normal" baseline TSH. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 58(6), 266–270
- Kulkarni, J., Hayes, E., Gavrilidis, E.** (2012). Hormones and schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*, 25(2), 89–95.
- Kung, L., Roberts, R. C.** (1999). Mitochondrial pathology in human schizophrenic striatum: a postmortem ultrastructural study. *Synapse* (New York, N.Y.), 31(1), 67–75.
- Kunz, M., Gama, C. S., Andreatza, A. C., Salvador, M., Ceresés, K. M., Gomes, F. A., Belmonte-de-Abreu, P.S., Berk, M., Kapczinski, F.** (2008). Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(7), 1677–1681.



**Lapointe, J., Hekimi, S.** (2010). When a theory of aging ages badly. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(1), 1–8. doi:10.1007/s00018-009-0138-8

**Lau, C. I., Wang, H. C., Hsu, J. L., Liu, M. E.** (2013). Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia? *Reviews in the Neurosciences*, 24(4), 389–400. doi:10.1515/revneuro-2013-0011

**Leboyer, M., Henry, C., Paillere-Martinot, M.-L., Bellivier, F.** (2005). Age at onset in bipolar affective disorders: a review. *Bipolar Disorders*, 7(2), 111–118. doi:10.1111/j.1399-5618.2005.00181.x

**Levinson, D. F., Duan, J., Oh, S., Wang, K., Sanders, A. R., Shi, J., Zhang, N., Mowry, B.J., Olincy, A., Amin, F., Cloninger, C.R., Silverman, J.M., Buccola, N.G., Byerley, W.F., Black, D.W., Kendler, K.S., Freedman, R., Dudbridge, F., Pe'er, I., Hakonarson, H., Bergen, S.E., Fanous, A.H., Holmans, P.A., Gejman, P. V.** (2011). Copy number variants in schizophrenia: confirmation of five previous findings and new evidence for 3q29 microdeletions and VIPR2 duplications. *The American Journal of Psychiatry*, 168(3), 302–316. doi:10.1176/appi.ajp.2010.10060876

**Li, W. H., Wu, C. I., Luo, C. C.** (1984). Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *Journal of Molecular Evolution*, 21(1), 58–71

**Lim, C., Chong, S. A., Keefe, R. S. E.** (2009). Psychosocial factors in the neurobiology of schizophrenia: a selective review. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 38(5), 402–406

**Lin, L. C., Sibille, E.** (2013). Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Frontiers in Pharmacology*, 4, 110. doi:10.3389/fphar.2013.00110

**Lindholm, E., Cavellier, L., Howell, W. M., Eriksson, I., Jalonen, P., Adolfsson, R., Jazin, E. E.** (1997). Mitochondrial sequence variants in patients with schizophrenia. *European Journal of Human Genetics*, 5(6), 406–412

**Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., Darnell, J.** (2005). *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana

**Longley, M. J., Nguyen, D., Kunkel, T. A., Copeland, W. C.** (2001). The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38555–38562. doi:10.1074/jbc.M105230200

**López-Lluch, G., Irusta, P. M., Navas, P., Cabo, R. de** (2008). Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Experimental Gerontology*, 43(9), 813–819. doi:10.1016/j.exger.14.06.2008

**Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., Afzelius, B.** (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *The Journal of Clinical Investigation*, 41, 1776–1804. doi:10.1172/JCI104637



---

## M

- Magri, C.**, Gardella, R., Barlati, S. D., Valsecchi, P., Sacchetti, E., Barlati, S. (2007). Mitochondrial DNA haplogroups and age at onset of schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 144B(4), 496–501. doi:10.1002/ajmg.b.30496
- Mahgoub, M.**, Monteggia, L. M. (2013). Epigenetics and psychiatry. *Neurotherapeutics*, 10(4), 734–741. doi:10.1007/s13311-013-0213-6
- Maier, W.**, Lichtermann, D., Minges, J., Franke, P., Heun, R., Hallmayer, J. (1993). Concordance for gender in sib pairs affected with schizophrenia and related disorders. *Schizophrenia Research*, 9(1), 71–76
- Malik, A.N.**, Czajka, A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*, (5):481-492. doi: 10.1016/j.mito.11.10.2012
- Manji, H.**, Kato, T., Di Prospero, N. A., Ness, S., Beal, M. F., Krams, M., Chen, G. (2012). Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(5), 293–307. doi:10.1038/nrn3229; 10.1038/nrn3229
- Marchbanks, R. M.**, Ryan, M., Day, I. N. M., Owen, M., McGuffin, P., Whatley, S. A. (2003). A mitochondrial DNA sequence variant associated with schizophrenia and oxidative stress. *Schizophrenia Research*, 65(1), 33–38
- Marcuello, A.**, Martínez-Redondo, D., Dahmani, Y., Casajús, J. A., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., López-Pérez, M.J., Díez-Sánchez, C. (2009). Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion*, 9(1), 27–30. doi:10.1016/j.mito.02.10.2008
- Margulis, L.** (1970). Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animals Cells on the Precambrian Earth. Yale University Press, New Haven, Connecticut
- Martens, P. J.**, Chochinov, H. M., Prior, H. J. (2013). Where and how people with schizophrenia die: a population-based, matched cohort study in Manitoba, Canada. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 74(6), e551–557. doi:10.4088/JCP.12m08234
- Martorell, L.**, Segués, T., Folch, G., Valero, J., Joven, J., Labad, A., Vilella, E. (2006). New variants in the mitochondrial genomes of schizophrenic patients. *European Journal of Human Genetics*, 14(5), 520–528. doi:10.1038/sj.ejhg.5201606
- Maurer, I.**, Zierz, S., Moller, H. (2001). Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 48(1), 125–136
- McGrath, J. J.** (2006). Variations in the incidence of schizophrenia: data versus dogma. *Schizophrenia Bulletin*, 32(1), 195–197. doi:10.1093/schbul/sbi052
- McGrath, J. J.**, Burne, T. H., Féron, F., Mackay-Sim, A., Eyles, D. W. (2010). Developmental vitamin D deficiency and risk of schizophrenia: a 10-year update. *Schizophrenia Bulletin*, 36(6), 1073–1078. doi:10.1093/schbul/sbq101
- McGrath, J.**, Saha, S., Chant, D., Welham, J. (2008). Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiologic Reviews*, 30, 67–76. doi:10.1093/epirev/mxn001

- McMahon**, F. J., Chen, Y. S., Patel, S., Kokoszka, J., Brown, M. D., Torroni, A., DePaulo, J.R., Wallace, D. C. (2000). Mitochondrial DNA sequence diversity in bipolar affective disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 157(7), 1058–1064
- McMahon**, F. J., Stine, O. C., Meyers, D. A., Simpson, S. G., DePaulo, J. R. (1995). Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *American Journal of Human Genetics*, 56(6), 1277–1286.
- Mehler-Wex**, C., Duvigneau, J. C., Hartl, R. T., Ben-Shachar, D., Warnke, A., Gerlach, M. (2006). Increased mRNA levels of the mitochondrial complex I 75-kDa subunit. A potential peripheral marker of early onset schizophrenia? *European Child & Adolescent Psychiatry*, 15(8), 504–507. doi:10.1007/s00787-006-0560-5
- Meissner**, C., Bruse, P., Mohamed, S. A., Schulz, A., Warnk, H., Storm, T., Oehmichen, M. (2008). The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more? *Experimental Gerontology*, 43(7), 645–652. doi:10.1016/j.exger.2008.03.004
- Mexal**, S., Berger, R., Adams, C. E., Ross, R. G., Freedman, R., Leonard, S. (2006). Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles. *Brain Research*, 1106(1), 1–11. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.043
- Middleton**, F. A., Mirnics, K., Pierri, J. N., Lewis, D. A., Levitt, P. (2002). Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *The Journal of Neuroscience*, 22(7), 2718–2729. doi:20026209
- Mill**, J., Tang, T., Kaminsky, Z., Khare, T., Yazdanpanah, S., Bouchard, L., Jia, P., Assadzadeh, A., Flanagan, J., Schumacher, A., Wang, S.C., Petronis, A. (2008). Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *American Journal of Human Genetics*, 82(3), 696–711. doi:10.1016/j.ajhg.2008.01.008
- Mishmar**, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A. G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M. D., Sukernik, R. I., Olckers, A., Wallace, D. C. (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1):171-6
- Mitchell**, P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* (NovaYork, N.Y.), 206(4423), 1148–1159
- Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis**, Haas, R. H., Parikh, S., Falk, M. J., Saneto, R. P., Wolf, N. I., Darin, N., Wong, L. J., Cohen, B. H., Naviaux, R. K. (2008). The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 94(1):16-37. doi: 10.1016/j.ymgme.2007
- Montoya**, J., Ojala, D., Attardi, G. (1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, 290(5806), 465–470
- Mosquera-Miguel**, A., Torrell, H., Abasolo, N., Arrojo, M., Paz, E., Ramos-Ríos, R., Agra, S., Páramo, M., Brenlla, J., Martínez, S., Vilella, E., Valero, J., Gutiérrez-Zotes, A., Martorell, L., Costas, J., Salas, A. (2012). No evidence that major mtDNA European haplogroups confer risk to schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics part B Neuropsychiatric Genetics*, 159B(4):414-21. doi: 10.1002/ajmg.b.32044
- Mowry**, B. J., Gratten, J. (2013). The emerging spectrum of allelic variation in schizophrenia: current evidence and strategies for the identification and functional characterization of common and rare variants. *Molecular Psychiatry*, 18(1), 38–52. doi:10.1038/mp.2012.34

**Mulcrone**, J., Whatley, S. A., Ferrier, I. N., Marchbanks, R. M. (1995). A study of altered gene expression in frontal cortex from schizophrenic patients using differential screening. *Schizophrenia Research*, 14(3), 203–213

**Munakata**, K., Fujii, K., Nanko, S., Kunugi, H., Kato, T. (2007). Sequence and functional analyses of mtDNA in a maternally inherited family with bipolar disorder and depression. *Mutation Research*, 617(1-2), 119–124. doi:10.1016/j.mrfmm.06.01.2007

**Naneishvili**, B. R., Zurabashvili, Z. A. (1976). The ultrastructure of formed white blood elements (neutrophils) in schizophrenia. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*, 117(4):617-22

**Nardelli**, C., Labruna, G., Liguori, R., Mazzaccara, C., Ferrigno, M., Capobianco, V., Pezzuti, M., Castaldo, G., Farinaro, E., Contaldo, F., Buono, P., Sacchetti, L., Pasanisi, F. (2013). Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *BioMed Research International*, 2013, 631082. doi:10.1155/2013/631082

**Nass**, M. M. K., Nass S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *Journal of Cell biology*, 19:593-611

**Naydenov**, A. V., MacDonald, M. L., Ongur, D., Konradi, C. (2007). Differences in lymphocyte electron transport gene expression levels between subjects with bipolar disorder and normal controls in response to glucose deprivation stress. *Archives of General Psychiatry*, 64(5), 555–564. doi:10.1001/archpsyc.64.5.555

**Munakata**, K., Iwamoto, K., Bundo, M., Kato, T. (2005). Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 57(5), 525–532. doi:10.1016/j.biopsych.2004.11.041

**Munakata**, K., Tanaka, M., Mori, K., Washizuka, S., Yoneda, M., Tajima, O., Akiyama, T., Nanko, S., Kunugi, H., Tadokoro, K., Ozaki, N., Inada, T., Sakamoto, K., Fukunaga, T., Iijima, Y., Iwata, N., Tatsumi, M., Yamada, K., Yoshikawa, T., Kato, T. (2004). Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics*, 84(6), 1041–1050. doi:10.1016/j.ygeno.15.08.2004

## n

**Need**, A. C., McEvoy, J. P., Gennarelli, M., Heinzen, E. L., Ge, D., Maia, J. M., Shianna, K.V., He, M., Cirulli, E.T., Gumbs, C.E., Zhao, Q., Campbell, C.R., Hong, L., Rosenquist, P., Putkonen, A., Hallikainen, T., Repo-Tiihonen, E., Tiihonen, J., Levy, D.L., Meltzer, H.Y., Goldstein, D. B. (2012). Exome sequencing followed by large-scale genotyping suggests a limited role for moderately rare risk factors of strong effect in schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, 91(2), 303–312. doi:10.1016/j.ajhg.18.06.2012

**Nelson**, D.L., Lehninger, A.L., Cox, M.M. (2008). Freeman W.H., ed. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Edició il·lustrada.

**Newton-Cheh**, C., Hirschhorn, J. N. (2005). Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutation Research*, 573(1-2), 54–69. doi:10.1016/j.mrfmm.06.01.2005

---

O

**O'Brien**, T. W. (2002). Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene*, 286(1), 73–79

**Odawara**, M., Arinami, T., Tachi, Y., Hamaguchi, H., Toru, M., Yamashita, K. (1998). Absence of association between a mitochondrial DNA mutation at nucleotide position 3243 and schizophrenia in Japanese. *Human Genetics*, 102(6), 708–709

**Ojala**, D., Montoya, J., Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290(5806), 470–474

P

**Pallotti**, F., Baracca, A., Hernandez-Rosa, E., Walker, W. F., Solaini, G., Lenaz, G., Melzi D'Eril, G.V., Dimauro, S., Schon, E.A., Davidson, M. M. (2004). Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *The Biochemical Journal*, 384(Pt 2), 287–293. doi:10.1042/BJ20040561

**Pardo-Seco**, J., Amigo, J., González-Manteiga, W., Salas, A. (2013). A Generalized Model to Estimate the Statistical Power in Mitochondrial Disease Studies Involving 2×k Tables. *PLoS One*, 8(9), e73567. doi:10.1371/journal.pone.0073567

**Peralta**, V., Cuesta, M. (1994). Psychometric properties of the positive and negative syndrome scale (PANSS) in schizophrenia. *Psychiatry Research*, 53(1), 31–40

**Pfeffer**, G., Majamaa, K., Turnbull, D. M., Thorburn, D., Chinnery, P. F. (2012). Treatment for mitochondrial disorders. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4, CD004426. doi:10.1002/14651858.CD004426.pub3

**Piper**, M., Beneyto, M., Burne, T. H. J., Eyles, D. W., Lewis, D. A., McGrath, J. J. (2012). The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: convergent clues from epidemiology and neuropathology. *The Psychiatric Clinics of North America*, 35(3), 571–584. doi:10.1016/j.psc.02.06.2012

**Plomin**, R., Owen, M. J., McGuffin, P. (1994). The genetic basis of complex human behaviors. *Science* (Nova York, N.Y.), 264(5166), 1733–1739

**Prabakaran**, S., Swatton, J. E., Ryan, M. M., Huffaker, S. J., Huang, J. T., Griffin, J. L., Wayland, M., Freeman, T., Dudbridge, F., Lilley, K.S., Karp, N.A., Hester, S., Tkachev, D., Mimmack, M.L., Yolken, R.H., Webster, M.J., Torrey, E.F., Bahn, S. (2004). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Molecular Psychiatry*, 9(7), 643,684–697. doi:10.1038/sj.mp.4001511

**Prezant**, T. R., Agopian, J. V., Bohlman, M. C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W. Q., Arnos, K.S., Cortopassi, G.A., Jaber, L., Rotter, J. I. (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genetics*, 4(3), 289–294. doi:10.1038/ng0793-289

**Prince, J. A.,** Blennow, K., Gottfries, C. G., Karlsson, I., Oreland, L. (1999). Mitochondrial function is differentially altered in the basal ganglia of chronic schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*, 21(3), 372–379. doi:10.1016/S0893-133X(99)00016-0

**Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group.** (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. (2011). *Nature Genetics*, 43(10), 977–983. doi:10.1038/ng.943

## *r*

**Regenold, W. T.,** Phatak, P., Marano, C. M., Gearhart, L., Viens, C. H., Hisley, K. C. (2007). Myelin staining of deep white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and unipolar major depression. *Psychiatry Research*, 151(3), 179–188. doi:10.1016/j.psychres.19.12.2006

**Réthelyi, J. M.,** Benkovits, J., Bitter, I. (2013). Genes and environments in schizophrenia: The different pieces of a manifold puzzle. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(10 Pt 1), 2424–37. doi:10.1016/j.neubiorev.10.04.2013

**Richards, M. B.,** Macaulay, V. A., Bandelt, H. J., Sykes, B. C. (1998). Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Annals of Human Genetics*, 62(Pt 3), 241–260. doi:10.1046/j.1469-1809.1998.6230241.x

**Ripke, S.,** O'Dushlaine, C., Chambert, K., Moran, J. L., Kähler, A. K., Akterin, S., Bergen, S.E., Collins, A.L., Crowley, J.J., Fromer, M., Kim, Y., Lee, S.H., Magnusson, P.K., Sanchez, N., Stahl, E.A., Williams, S., Wray, N.R., Xia, K., Bettella, F., Borglum, A.D., Bulik-Sullivan, B.K., Cormican, P., Craddock, N., Leeuw, C. de, Durmishi, N., Gill, M., Golimbet, V., Hamshere, M.L., Holmans, P., Hougaard, D.M., Kendler, K.S., Lin, K., Morris, D.W., Mors, O., Mortensen, P.B., Neale, B.M., O'Neill, F.A., Owen, M.J., Milovanec, M.P., Posthuma, D., Powell, J., Richards, A.L., Riley, B.P., Ruderfer, D., Rujescu, D., Sigurdsson, E., Silagadze, T., Smit, A.B., Stefansson, H., Steinberg, S., Suvisaari, J., Tosato, S., Verhage,

M., Walters, J.T.; Multicenter Genetic Studies of Schizophrenia Consortium, Levinson, D.F., Gejman, P.V., Kendler, K.S., Laurent, C., Mowry, B.J., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Pulver, A.E., Riley, B.P., Schwab, S.G., Wildenauer, D.B., Dudbridge, F., Holmans, P., Shi, J., Albus, M., Alexander, M., Campion, D., Cohen, D., Dikeos, D., Duan, J., Eichhammer, P., Godard, S., Hansen, M., Lerer, F.B., Liang, K.Y., Maier, W., Mallet, J., Nertney, D.A., Nestadt, G., Norton, N., O'Neill, F.A., Papadimitriou, G.N., Ribble, R., Sanders, A.R., Silverman, J.M., Walsh, D., Williams, N.M., Wormley, B.; Psychosis Endophenotypes International Consortium, Arranz, M.J., Bakker, S., Bender, S., Bramon, E., Collier, D., Crespo-Facorro, B., Hall, J., Iyegbe, C., Jablensky, A., Kahn, R.S., Kalaydjieva, L., Lawrie, S., Lewis, C.M., Lin, K., Linszen, D.H., Mata, I., McIntosh, A., Murray, R.M., Ophoff, R.A., Powell, J., Rujescu, D., Van Os, J., Walshe, M., Weisbrod, M., Wiersma, D.; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Donnelly, P., Barroso, I., Blackwell, J.M., Bramon, E., Brown, M.A., Casas, J.P., Corvin, A.P., Deloukas, P., Duncanson, A., Jankowski, J., Markus, H.S., Mathew, C.G., Palmer, C.N., Pomin, R., Rautanen, A., Sawcer, S.J., Trembath, R.C., Viswanathan, A.C., Wood, N.W., Spencer, C.C., Band, G., Bellenguez, C., Freeman, C., Hellenthal, G., Giannoulatos, E., Pirinen, M., Pearson, R.D., Strange, A., Su, Z., Vukcevic, D., Donnelly, P., Langford, C., Hunt, S.E., Edkins, S., Gwilliam, R., Blackburn, H., Bumpstead, S.J., Dronov, S., Gillman, M., Gray, E., Hammond, N., Jayakumar, A., McCann, O.T., Liddle, J., Potter, S.C., Ravindrarajah, R., Rickerts, M., Tashakkori-Ghanbaria, A., Waller, M.J., Weston, P., Widaa, S., Whittaker, P., Barroso, I., Deloukas, P., Mathew, C.G., Blac-

kwel, J.M., Brown, M.A., Corvin, A.P., McCarthy, M.I., Spencer, C.C., Bramon, E., Corvin, A.P., O'Donovan, M.C., Stefansson, K., Scolnick, E., Purcell, S., McCarroll, S.A., Sklar, P., Hultman, C.M., Sullivan, P. F. (2013a). Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature Genetics*, 45(10), 1150–1159. doi:10.1038/ng.2742

**Ripke, S.**, Wray, N. R., Lewis, C. M., Hamilton, S. P., Weissman, M. M., Breen, G., Byrne, E.M., Blackwood, D.H., Boomsma, D.I., Cichon, S., Heath, A.C., Holsboer, F., Lucae, S., Madden, P.A., Martin, N.G., McGuffin, P., Muglia, P., Noethen, M.M., Penninx, B.P., Pergadia, M.L., Potash, J.B., Rietschel, M., Lin, D., Müller-Myhsok, B., Shi, J., Steinberg S., Grabe, H.J., Lichtenstein, P., Magnusson, P., Perlis, R.H., Preisig, M., Smoller J.W., Stefansson, K., Uher, R., Kutalik, Z., Tansey, K.E., Teumer, A., Viktorin, A., Barnes, M.R., Bettecken, T., Binder, E.B., Breuer, R., Castro, V.M., Churchill, S.E., Coryell, W.H., Craddock, N., Craig, I.W., Czaramara, D., De Geus, E.J., Degenhardt, F., Farmer, A.E., Fava, M., Frank, J., Gainer, V.S., Gallagher, P.J., Gordon, S.D., Goryachev, S., Gross, M., Guipponi, M., Henders, A.K., Herms, S., Hickie, I.B., Hoefels, S., Hoogendijk, W., Hottenga, J.J., Iosifescu, D.V., Ising, M., Jones, I., Jones, L., Jung-Ying, T., Knowles, J.A., Kohane, I.S., Kohli, M.A., Korszun, A., Landen, M., Lawson, W.B., Lewis, G., Macintyre, D., Maier, W., Mattheisen, M., McGrath, P.J., McIntosh, A., McLean, A., Middeldorp, C.M., Middleton, L., Montgomery, G.M., Murphy, S.N., Nauck, M., Nolen, W.A., Nyholt, D.R., O'Donovan, M., Oskarsson, H., Pedersen, N., Scheftner, W.A., Schulz, A., Schulze, T.G., Shyn, S.I., Sigurdsson, E., Slager, S.L., Smit, J.H., Stefansson, H., Steffens, M., Thorgeirsson, T., Tozzi, F., Treutlein, J., Uhr, M., van den Oord, E.J., Van Grootheest, G., Völzke, H., Weilburg, J.B., Willemsen, G., Zitman, F.G., Neale, B., Daly, M., Levinson, D.F., Sullivan, P. F. (2013b). A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 18(4), 497–511. doi:10.1038/mp.2012.21

**Ristow, M.**, Schmeisser, S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(2), 327–336. doi:10.1016/j.freeradbiomed.10.05.2011

**Rivera, M. A.**, Wolfarth, B., Dionne, F. T., Chagnon, M., Simoneau, J. A., Boulay, M. R., Song, T.M., Perusse, L., Gagnon, J., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Keul, J., Bouchard, C. (1998). Three mitochondrial DNA restriction polymorphisms in elite endurance athletes and sedentary controls. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(5), 687–690

**Rollins, B.**, Martin, M. V, Sequeira, P. A., Moon, E. A., Morgan, L. Z., Watson, S. J., Schatzberg, A., Akil, H., Myers, R.M., Jones, E.G., Wallace, D.C., Bunney, W.E., Vawter, M. P. (2009). Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One*, 4(3), e4913. doi:10.1371/journal.pone.0004913

**Rosenfeld, M.**, Brenner-Lavie, H., Ari, S. G.-B., Kavushansky, A., Ben-Shachar, D. (2011). Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 69(10), 980–988. doi:10.1016/j.biopsych.10.01.2011

**Rötig, A.**, Bourgeron, T., Chretien, D., Rustin, P., Munnich, A. (1995). Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Human Molecular Genetics*, 4(8), 1327–1330

**Ruiz-Pesini, E.**, Lott, M. T., Procaccio, V., Poole, J. C., Brandon, M. C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., Wallace, D. C. (2007). An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D823–8. doi:10.1093/nar/gkl927

---

**S**

**Sabunciyani, S.**, Kirches, E., Krause, G., Bogerts, B., Mawrin, C., Llenos, I. C., Weis, S. (2007). Quantification of total mitochondrial DNA and mitochondrial common deletion in the frontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of Neural Transmission*, 114(5), 665–674. doi:10.1007/s00702-006-0581-8

**Sadock, B. J.**, Sadock V. A. (2009) Kaplan and Sadock Sinopsis de Psiquiatria Clínica. Ed. Lippincott Williams & Wilkins

**Sato, M.**, Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(8), 1979–1984. doi:10.1016/j.bbamcr.10.03.2013

**Satoh, M.**, Kuroiwa, T. (1991). Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research*, 196(1), 137–140

**Scaglia, F.** (2010). The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 136–143. doi:10.1002/ddrr.115

**Scarpulla, R. C.** (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(7), 1269–1278. doi:10.1016/j.bbamcr.19.09.2010

**Schaffer, A.**, Levitt, A. J., Boyle, M. (2003). Influence of season and latitude in a community sample of subjects with bipolar disorder. *Canadian Journal of Psychiatry*, 48(4), 277–280

**Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium.** (2011). Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. (2011). *Nature Genetics*, 43(10), 969–976. doi:10.1038/ng.940

**Schon, E. A.**, DiMauro, S., Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews. Genetics*, 13(12), 878–890. doi:10.1038/nrg3275

**Sequeira, A.**, Martin, M. V, Rollins, B., Moon, E. A., Bunney, W. E., Macciardi, F., Lupoli, S., Smith, E.N., Kelsoe, J., Magnan, C.N., van Oven, M., Baldi, P., Wallace, D.C., Vawter, M. P. (2012). Mitochondrial mutations and polymorphisms in psychiatric disorders. *Frontiers in Genetics*, 3, 103. doi:10.3389/fgene.03.01.2012

**Shadel, G. S.**, Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 409–435. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.409

**Sham, P. C.**, Jones, P., Russell, A., Gilvarry, K., Bebbington, P., Lewis, S., Toone, B., Murray, R. (1994). Age at onset, sex, and familial psychiatric morbidity in schizophrenia. Camberwell Collaborative Psychosis Study. *The British Journal of Psychiatry*, 165(4), 466–473

**Shao, L.**, Martin, M. V, Watson, S. J., Schatzberg, A., Akil, H., Myers, R. M., Vawter, M. P. (2008). Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Annals of Medicine*, 40(4), 281–295. doi:10.1080/07853890801923753

**Sheline, Y. I.** (2003). Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biological Psychiatry*, 54(3), 338–352

- 
- Shen, X.,** Carlborg, O. (2013). Beware of risk for increased false positive rates in genome-wide association studies for phenotypic variability. *Frontiers in Genetics*, 4, 93. doi:10.3389/fgene.2013.00093
- Shimizu, A.,** Kurachi, M., Yamaguchi, N., Torii, H., Isaki, K. (1987). Morbidity risk of schizophrenia to parents and siblings of schizophrenic patients. *The Japanese Journal of Psychiatry and Neurology*, 41(1), 65–70
- Shirayama, Y.,** Yano, T., Takahashi, K., Takahashi, S., Ogi-no, T. (2004). In vivo <sup>31</sup>P NMR spectroscopy shows an increase in glycerophosphorylcholine concentration without alterations in mitochondrial function in the prefrontal cortex of medicated schizophrenic patients at rest. *The European Journal of Neuroscience*, 20(3), 749–56. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03524.x
- Shoffner, J. M.,** Lott, M. T., Lezza, A. M., Seibel, P., Ballinger, S. W., Wallace, D. C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, 61(6), 931–937
- Shoubridge, E. A.** (2012). Supersizing the mitochondrial respiratory chain. *Cell Metabolism*, 15(3), 271–272. doi:10.1016/j.cmet.09.02.2012
- Sies, H.** (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91(3C):31S-38S
- Sies, H.** (2008). Oxidative stress. Academic Press. Universitat de Michigan.
- Silberberg, G.,** Baruch, K., Navon, R. (2009). Detection of stable reference genes for real-time PCR analysis in schizophrenia and bipolar disorder. *Analytical Biochemistry*, 391(2), 91–97. doi:10.1016/j.ab.26.05.2009
- Skladal, D.,** Halliday, J., Thorburn, D. R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*, 126(Pt 8), 1905–1912. doi:10.1093/brain/awg170
- Smith, D. J.,** Nicholl, B. I., Cullen, B., Martin, D., Ul-Haq, Z., Evans, J., Gill, J. M., Roberts, B., Gallacher, J., Mackay, D., Hotopf, M., Deary, I., Craddock, N., Pell, J. P. (2013). Prevalence and Characteristics of Probable Major Depression and Bipolar Disorder within UK Biobank: Cross-Sectional Study of 172,751 Participants. *PLoS ONE*, 8(11), e75362. doi:10.1371/journal.pone.0075362
- Söderlund, J.,** Olsson, S. K., Samuelsson, M., Walther-Jallow, L., Johansson, C., Erhardt, S., Landén, M., Engberg, G. (2011). Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-1β in bipolar disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 36(2), 114–118. doi:10.1503/jpn.100080
- Sousa, R. T. de, Uno, M., Zanetti, M. V., Shinjo, S. M. O., Bussatto, G. F., Gattaz, W. F., Machado-Vieira, R.** (2014). Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 48, 32–35. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.09.002
- Splawski, I.,** Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C., Keating, M. T. (2004). Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, 119(1), 19–31. doi:10.1016/j.cell.11.09.2004
- Spremulli, L. L.,** Coursey, A., Navratil, T., Hunter, S. E. (2004). Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 77, 211–261. doi:10.1016/S0079-6603(04)77006-3



- Stefansson**, H., Meyer-Lindenberg, A., Steinberg, S., Magnusdottir, B., Morgen, K., Arnarsdottir, S., Bjornsdottir, G., Walters, G. B., Jonsdottir, G. A., Doyle, O. M., Tost, H., Grimm, O., Kristjansdottir, S., Snorrason, H., Davidsdottir, S. R., Gudmundsson, L. J., Jonsson, G. F., Stefansdottir, B., Helgadóttir, I., Haraldsson, M., Jonsdottir, B., Thygesen, J. H., Schwarz, A. J., Didriksen, M., Stensbøl, T. B., Brammer, M., Kapur, S., Halldorsson, J.G., Hreidarsson, S., Saemundsen, E., Sigurdsson, E., Stefansson, K. (2014). CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature*, 505(7483), 361–366. doi:10.1038/nature12818
- Stewart**, J. B., Naylor, G. J. (1990). Manic-depressive psychosis in a patient with mitochondrial myopathy: A case report. *Medical Science Research*, 18(7), 265-266
- Sullivan**, P. F. (2005). The genetics of schizophrenia. *PLoS Medicine*, 2(7), e212. doi:10.1371/journal.pmed.0020212
- Sullivan**, P. F., Daly, M. J., O'Donovan, M. (2012). Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. *Nature Reviews. Genetics*, 13(8), 537–551. doi:10.1038/nrg3240
- Sullivan**, P. F., Kendler, K. S., Neale, M. C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of General Psychiatry*, 60(12), 1187–1192. doi:10.1001/archpsyc.60.12.1187
- Sun**, X., Wang, J.-F., Tseng, M., Young, L. T. (2006). Down-regulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 31(3), 189–196
- Suomalainen**, A., Majander, A., Haltia, M., Somer, H., Lönnqvist, J., Savontaus, M. L., Peltonen, L. (1992). Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(1), 61–66. doi:10.1172/JCI115856
- Sutovsky**, P., Van Leyen, K., McCauley, T., Day, B. N., Sutovsky, M. (2004). Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reproductive Biomedicine Online*, 8(1), 24–33
- Suzuki**, T., Koizumi, J., Shiraishi, H., Ishikawa, N., Ofuku, K., Sasaki, M., Hori, T., Ohkoshi, N., Anno, I. (1990). Mitochondrial encephalomyopathy (MELAS) with mental disorder. CT, MRI and SPECT findings. *Neuroradiology*, 32(1), 74–76
- Swerdlow**, R. H., Binder, D., Parker, W. D. (1999). Risk factors for schizophrenia. *The New England Journal of Medicine*, 341(5), 371–372
- Szczepanowska**, J., Malinska, D., Wieckowski, M. R., Duszynski, J. (2012). Effect of mtDNA point mutations on cellular bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817(10), 1740–1746. doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.021

---

*t*

---

**Tammiste**, A., Jiang, T., Fischer, K., Mägi, R., Krjutškov, K., Pettai, K., Esko, T., Li, Y., Tansey, K. E., Carroll, L. S., Uher, R., McGuffin, P., Vösa, U., Tšernikova, N., Saria, A., Ng, P. C., Eller, T., Vasar, V., Nutt, D. J., Maron, E., Wang, J., Metspalu, A. (2013). Whole-exome sequencing identifies a polymorphism in the BMP5 gene associated with SSRI treatment response in major depression. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 27(10), 915–920. doi:10.1177/0269881113499829

**Taurines**, R., Thome, J., DuVigneau, J. C., Forbes-Robertson, S., Yang, L., Klampfl, K., Romanos, J., Müller, S., Gerlach, M., Mehler-Wex, C. (2010). Expression analyses of the mitochondrial complex I 75-kDa subunit in early onset schizophrenia and autism spectrum disorder: increased levels as a potential biomarker for early onset schizophrenia. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 19(5), 441–448. doi:10.1007/s00787-009-0074-z

**Taylor**, R. W., Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 6(5), 389–402. doi:10.1038/nrg1606

**Tchurikov**, N. A. (2005). Molecular mechanisms of epigenetics. *Biochemistry*, 70(4), 406–423

**Thalmann**, O., Hebler, J., Poinar, H. N., Pääbo, S., Vigilant, L. (2004). Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Molecular Ecology*, 13(2), 321–335

**Thomeer**, E. C., Verhoeven, W. M., van de Vlasakker, C. J., Klompenhouwer, J. L. (1998). Psychiatric symptoms in MELAS; a case report. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 64(5), 692–693

**Torrell**, H., Montaña, E., Abasolo, N., Roig, B., Gaviria, A. M., Vilella, E., Martorell, L. (2013). Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 162B(2), 213–23. doi:10.1002/ajmg.b.32134

**Torrey**, E. F., Webster, M., Knable, M., Johnston, N., Yolken, R. H. (2000). The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium. *Schizophrenia Research*, 44(2), 151–155. doi:10.1016/S0920-9964(99)00192-9

**Torroni**, A., Sukernik, R. I., Schurr, T. G., Starikorskaya, Y. B., Cabell, M. F., Crawford, M. H., Comuzzie, A. G., Wallace, D. C. (1993). mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 591–608

**Trachootham**, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R.-D. V., Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1343–1374. doi:10.1089/ars.2007.1957

**Tynnismaa**, H., Mjosund, K. P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Paetau, A., Suomalainen, A. (2005). Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17687–17692. doi:10.1073/pnas.0505551102

---

## U

**Ueno, H.**, Nishigaki, Y., Kong, Q.-P., Fuku, N., Kojima, S., Iwata, N., Ozaki, N., Tanaka, M. (2009). Analysis of mitochondrial DNA variants in Japanese patients with schizophrenia. *Mitochondrion*, 9(6), 385–93. doi:10.1016/j.mito.2009.06.003

**Uranova, N. A.**, Casanova, M. F., DeVaughn, N. M., Orlovskaya, D. D., Denisov, D. V. (1996). Ultrastructural alterations of synaptic contacts and astrocytes in postmortem caudate nucleus of schizophrenic patients. *Schizophrenia Research*, 22(1), 81–83

**Uranova, N. A.**, Orlovskaya, D., Vikhрева, O., Zimina, I., Kolomeets, N., Vostrikov, V., Rachmanova, V. (2001). Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Research Bulletin*, 55(5), 597–610

## V

**Vafai, S. B.**, Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, 491(7424), 374–383. doi:10.1038/nature11707

**Valko, M.**, Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 39(1), 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

**Van Os, J.**, Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *Lancet*, 374(9690), 635–645. doi:10.1016/S0140-6736(09)60995-8

**Van Os, J.**, Kenis, G., Rutten, B. P. F. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature*, 468(7321), 203–212. doi:10.1038/nature09563

**Van Oven, M.**, Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), E386–94. doi:10.1002/humu.20921

**Vandesompele, J.**, De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034

**Vawter, M. P.**, Tomita, H., Meng, F., Bolstad, B., Li, J., Evans, S., Choudary, P., Atz, M., Shao, L., Neal, C., Walsh, D. M., Burmeister, M., Speed, T., Myers, R., Jones, E. G., Watson, S. J., Akil, H., Bunney, W. E. (2006). Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state: implications for brain disorders. *Molecular Psychiatry*, 11(7), 615, 663–679. doi:10.1038/sj.mp.4001830

**Verge, B.**, Alonso, Y., Miralles, C., Valero, J., Vilella, E., Boles, R. G., Martorell, L. (2012). New evidence for the involvement of mitochondrial inheritance in schizophrenia: results from a cross-sectional study evaluating the risk of illness in relatives of schizophrenia patients. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 73(5), 684–690. doi:10.4088/JCP.10m06718

**Verge**, B., Alonso, Y., Valero, J., Miralles, C., Vilella, E., Martorell, L. (2011). Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *European Psychiatry*, 26(1), 45–56. doi:10.1016/j.eurpsy.08.08.2010; 10.1016/j.eurpsy.08.08.2010

**Volz**, H. R., Riehemann, S., Maurer, I., Smesny, S., Sommer, M., Rzanny, R., Holstein, W., Czekalla, J., Sauer, H. (2000). Reduced phosphodiesterases and high-energy phosphates in the frontal lobe of schizophrenic patients: a (31)P chemical shift spectroscopic-imaging study. *Biological Psychiatry*, 47(11), 954–961

## W

**Wai**, T., Teoli, D., Shoubridge, E. A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*, 40(12), 1484–1488. doi:10.1038/ng.258

**Walker**, C. (2008). Antioxidant supplements do not improve mortality and may cause harm. *American Family Physician*, 78(9), 1079–1080

**Wallace**, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J., Nikoskelainen, E. K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242(4884), 1427–1430

**Wallace**, D. C., Stuard, C., Murdock, D., Schurr, T., Brown, M. D. (1997). Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: a potential source of errors in identifying pathogenic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14900–14905

**Wang**, J. F. (2007). Defects of mitochondrial electron transport chain in bipolar disorder: implications for mood-stabilizing treatment. *Canadian Journal of psychiatry*, 52(12), 753–762

**Wang**, J.-F., Shao, L., Sun, X., Young, L. T. (2009). Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disorders*, 11(5), 523–529. doi:10.1111/j.1399-5618.2009.00717.x

**Washizuka**, S., Ikeda, A., Kato, N., Kato, T. (2003a). Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 6(4), 421–424. doi:10.1017/S1461145703003778

**Washizuka**, S., Iwamoto, K., Kakiuchi, C., Bundo, M., Kato, T. (2009). Expression of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 in the lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience Research*, 63(3), 199–204. doi:10.1016/j.neures.04.12.2008

**Washizuka**, S., Kakiuchi, C., Mori, K., Kunugi, H., Tajima, O., Akiyama, T., Nanko, S., Kato, T. (2003b). Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 120B(1), 72–78. doi:10.1002/ajmg.b.20041

**Washizuka**, S., Kametani, M., Sasaki, T., Tochigi, M., Ume-kage, T., Kohda, K., Kato, T. (2006). Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with schizophrenia in the Japanese population. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 141B(3), 301–304. doi:10.1002/ajmg.b.30285

**Watson**, E., Forster, P., Richards, M., Bandelt, H. J. (1997). Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *American Journal of Human Genetics*, 61(3), 691–704. doi:10.1086/515503

**Weickert**, C. S., Sheedy, D., Rothmond, D. A., Dedova, I., Fung, S., Garrick, T., Wong, J., Harding, A. J., Sivagnanasundaram, S., Hunt, C., Duncan, C., Sundqvist, N., Tsai, S. Y., Anand, J., Draganic, D., Harper, C. (2010). Selection of reference gene expression in a schizophrenia brain cohort. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 44(1), 59–70. doi:10.3109/00048670903393662

**Weissman**, M. M., Wickramaratne, P., Nomura, Y., Warner, V., Pilowsky, D., Verdelli, H. (2006). Offspring of depressed parents: 20 years later. *The American Journal of Psychiatry*, 163(6), 1001–1008. doi:10.1176/appi.ajp.163.6.1001

**Werner**, F.-M., Coveñas, R. (2010). Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in major depression: a review. *The International Journal of Neuroscience*, 120(7), 455–470. doi:10.3109/00207454.2010.483651

**Xu**, B., Ionita-Laza, I., Roos, J. L., Boone, B., Woodrick, S., Sun, Y., Levy, S., Gogos, J. A., Karayiorgou, M. (2012). De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia. *Nature Genetics*, 44(12), 1365–1369. doi:10.1038/ng.2446

**Xu**, B., Roos, J. L., Dexheimer, P., Boone, B., Plummer, B., Levy, S., Gogos, J. A., Karayiorgou, M. (2011). Exome sequencing supports a de novo mutational paradigm for schizophrenia. *Nature Genetics*, 43(9), 864–868. doi:10.1038/ng.902

**Whatley**, S. A., Curti, D., Marchbanks, R. M. (1996). Mitochondrial involvement in schizophrenia and other functional psychoses. *Neurochemical Research*, 21(9), 995–1004

**World Health Organization**, The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization, Geneva, 2008.

**Wockner**, L. F., Noble, E. P., Lawford, B. R., Young, R. M., Morris, C. P., Whitehall, V. L. J., Voisey, J. (2014). Genome-wide DNA methylation analysis of human brain tissue from schizophrenia patients. *Translational Psychiatry*, 4, e339. doi:10.1038/tp.2013.111

**Woischnik**, M., Moraes, C. T. (2002). Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Research*, 12(6), 885–893. doi:10.1101/gr.227202. Article published online before print in May 2002

**Wolyniec**, P. S., Pulver, A. E., McGrath, J. A., Tam, D. (1992). Schizophrenia: gender and familial risk. *Journal of Psychiatric Research*, 26(1), 17–27



**Xu**, C., Li, P. P., Kennedy, J. L., Green, M., Hughes, B., Cooke, R. G., Parikh, S. V., Warsh, J. J. (2008). Further support for association of the mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 with bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, 10(1), 105–110. doi:10.1111/j.1399-5618.2008.00535.x

## y

---

**Yu, H., Bi, W., Liu, C., Zhao, Y., Zhang, J.F., Zhang, D., Yue, W. (2014).** A hypothesis-driven pathway analysis reveals myelin-related pathways that contribute to the risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Epub ahead of print. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.01.006.

## z

---

**Zahn-Waxler, C., McKnew, D. H., Cummings, E. M., Davenport, Y. B., Radke-Yarrow, M. (1984).** Problem behaviors and peer interactions of young children with a manic-depressive parent. *The American Journal of Psychiatry*, 141(2), 236–240

**Zeviani, M., Moraes, C. T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E. A., Rowland, L. P. (1988).** Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 51(6), 1525 and 8 pages following.

**Zhang, D., Cheng, L., Qian, Y., Alliey-Rodriguez, N., Kelsoe, J. R., Greenwood, T., Nievergelt, C., Barrett, T. B., McKinney, R., Schork, N., Smith, E. N., Bloss, C., Nurnberger, J., Edenberg, H.J., Foroud, T., Sheftner, W., Lawson, W. B., Nwulia, E. A., Hipolito, M., Coryell, W., Rice, J., Byerley, W., McMahon, F., Schulze, T. G., Berrettini, W., Potash, J.B., Belmonte, P. L., Zandi, P. P., McInnis, M. G., Zöllner, S., Craig, D., Szelinger, S., Koller, D., Christian, S. L., Liu, C., Gershon, E. S. (2009).** Singleton deletions throughout the genome increase risk of bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 14(4), 376–380. doi:10.1038/mp.2008.144

**Zhang, Y., Spremulli, L. L. (1998).** Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1443(1-2), 245–250

# *Anàlisi de l'ADN mitocondrial en el trastorn mental greu*

---

*Tesi doctoral:*

Helena Torrell Galceran

No es coneix encara què causa l'esquizofrènia, el trastorn bipolar, la depressió major i altres trastorns mentals greus, però els factors genètics hi tenen un paper rellevant. La majoria d'estudis genètics han buscat mutacions o variants de risc associades a la malaltia en el genoma nuclear, però pocs estudis han tingut en compte el paper de l'ADN mitocondrial (ADNmt).

El present treball de tesi analitza la implicació de l'ADNmt en tres trastorns mentals greus: esquizofrènia, trastorn bipolar i depressió major a partir de dues hipòtesis. La primera, és que l'ADNmt pot acumular mutacions somàtiques al llarg de la vida que augmentin el risc de patir algun trastorn mental greu. El treball Torrell H, et al. *American Journal of Medical Genetics* (2013) presenta els resultats de l'anàlisi de l'ADNmt en teixit cerebral *post mortem* d'individus amb diagnòstic d'esquizofrènia, trastorn bipolar o depressió major en comparació amb individus control, convertint-se en el segon estudi que analitza l'expressió dels transcrits mitocondrials, el número de còpies de l'ADNmt i la presència de delecions en teixit cerebral. Aquesta anàlisi es basa en la tècnica de la PCR quantitativa i per aquest motiu, en la publicació prèvia Abasolo N, Torrell H, et al. *Journal of Psychiatric Research* (2011) es van identificar els gens de referència més idonis per a normalitzar els nivells d'expressió dels transcrits mitocondrials. La segona hipòtesi d'aquesta tesi, és que l'ADNmt pot ser portador de mutacions o de variants que confereixin risc per a la malaltia a través de l'herència materna. El treball Torrell H, et al. *American Journal of Medical Genetics* (en revisió) presenta els resultats de l'anàlisi de la seqüència de l'ADNmt en relació a l'esquizofrènia a partir de cèl·lules sanguínies i aporta dues variants de l'ADNmt associades a la malaltia en un estudi de 495 casos i 615 controls.



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI