

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSGRADO

**“POLIMORFISMO EN EL GEN DE LA CATECOL O-
METIL TRANSFERASA (COMT) Y SU ASOCIACION
CON LA ESQUIZOFRENIA EN UNA MUESTRA
PERUANA”**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN BIOQUÍMICA

AUTOR

Oscar Acosta Conchucos

Lima – Perú

2015

Dedicatoria

A mis queridos padres, Germán y Baldomera[†], por su inacabable esfuerzo para el desarrollo de sus hijos y porque la llama de su ejemplo nunca se extinguirá.

A mis hermanos, Fernando, Raúl, Elsa, Nancy, Jaime, Yacky y Quique por el amor fraternal y el total apoyo emocional y afectivo a lo largo de mi vida.

A mi familia, mi esposa Luisita y mis hijitas Angelita y Cielito, por su amor, por las horas no compartidas y por su total comprensión, sin ello no hubiera sido posible la culminación de la tesis.

Agradecimientos

Expreso mi sincero reconocimiento a todas las instituciones y personas que de uno u otro modo contribuyeron a la culminación exitosa de la presente investigación. Particularmente quiero manifestar mi agradecimiento:

A mi asesora, la Dra. Doris Huerta Canales, por permitirme trabajar en su equipo de investigación, por su invaluable apoyo personal, científico y por la dinámica de investigación a lo largo de estos años.

Al Centro de Investigación en Bioquímica y Nutrición de la facultad de Medicina de la UNMSM, por las facilidades para realizar la investigación.

A mis compañeros de la maestría en Bioquímica, especialmente a mis amigas Victoria Marca y Marlene Vargas por su apoyo incondicional.

Al Hospital Hermilio Valdizán, la Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación, Comité de Ética y a los doctores Eric Bravo y Walter Leyva por las apreciaciones clínicas y las facilidades para el muestreo.

A todos mis amigos del Centro de Genética y Biología Molecular de la facultad de Medicina de la USMP, y especialmente a los doctores Ricardo Fujita y María Luisa Guevara por todo su apoyo logístico, científico y personal.

A los miembros del Jurado Examinador, por su tiempo y por sus apreciaciones invaluables.

INDICE GENERAL

| | Pág. |
|--------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | viii |
| ABSTRACT | ix |
| CAPITULO 1: INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 Situación problemática | 1 |
| 1.2 Formulación del problema | 6 |
| 1.3 Justificación teórica | 6 |
| 1.4 Justificación práctica | 7 |
| 1.5 Objetivos | 7 |
| 1.5.1 Objetivo general | 7 |
| 1.5.2 Objetivos específicos | 7 |
| CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO | 8 |
| 2.1 Antecedentes de la investigación | 8 |
| 2.2 Bases teóricas | 10 |
| CAPITULO 3: METODOLOGÍA | 15 |
| 3.1 Material biológico | 15 |
| 3.1.1 Población de estudio | 15 |
| 3.1.1.1 Casos | 15 |
| 3.1.1.2 Controles | 16 |
| 3.1.2 Tamaño de la muestra | 16 |
| 3.2 Material de laboratorio | 17 |
| 3.2.1 Equipos | 17 |
| 3.2.2 Materiales | 17 |
| 3.3 Métodos | 18 |
| 3.3.1 Recolección de la muestra | 18 |
| 3.3.2 Extracción de ADN | 18 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 3.3.3 | Técnica PCR-RFLP | 18 |
| 3.3.4 | Electroforesis de digeridos y tinción | 20 |
| 3.3.5 | Genotipaje | 20 |
| 3.3.6 | Análisis estadístico | 22 |
| CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 21 |
| 4.1 | Análisis, interpretación y discusión de resultados | 23 |
| 4.2 | Prueba de hipótesis | 31 |
| 4.3 | Presentación de resultados | 31 |
| CONCLUSIONES | | 40 |
| RECOMENDACIONES | | 41 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 42 |
| Anexos | | 48 |

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1:** Polimorfismo Val/Met en el gen COMT.
- Cuadro 2:** Datos generales y frecuencias de genotipos y alelos COMT de los pacientes con esquizofrenia y el grupo control.
- Cuadro 3:** Frecuencias genotípicas del gen COMT y análisis de riesgo de esquizofrenia según modelo Codominante.
- Cuadro 4:** Frecuencias genotípicas del gen COMT y análisis de riesgo de esquizofrenia según modelo Dominante.
- Cuadro 5:** Frecuencias genotípicas del gen COMT y análisis de riesgo de esquizofrenia según modelo Recesivo.
- Cuadro 6:** Frecuencias genotípicas del gen COMT y análisis de riesgo de esquizofrenia según modelo Sobredominante.
- Cuadro 7:** Frecuencias genotípicas del gen COMT y análisis de riesgo de esquizofrenia según modelo Aditivo.
- Cuadro 8:** Frecuencias alélicas del gen COMT y análisis de riesgo de esquizofrenia según modelo Alélico.
- Cuadro 9:** Frecuencias genotípicas del gen COMT y análisis de interacción con covariable Género para riesgo de esquizofrenia según modelo Codominante.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gel de agarosa 1% con los amplificadores para el polimorfismo Val/Met en el gen COMT.
- Figura 2:** Gel de poliacrilamida denaturante al 8% con los digeridos característicos de los 3 genotipos para el polimorfismo Val/Met en el gen COMT.
- Figura 3:** A) Electroferogramas de las secuencias parciales con SNP característico de los 3 genotipos para el polimorfismo Val/Met en el gen COMT. B) Alineamiento con el programa BioEdit de las secuencias COMT comparadas con la secuencia de referencia.

RESUMEN

La Esquizofrenia es una enfermedad mental crónica y compleja que afecta al 1% de la población. El gen que codifica a la enzima catecol o-metil transferasa (COMT) es candidato de riesgo porque participa en el catabolismo de la dopamina. El polimorfismo funcional Val/Met (rs4680) en el gen COMT genera actividad enzimática diferencial, es variable en las poblaciones y ha sido asociado a la esquizofrenia. En el Perú, no existen estudios de asociación genética y es necesario implementarlas para la prevención, diagnóstico, pronóstico y farmacogenética de la enfermedad.

El objetivo fue establecer la asociación entre el polimorfismo Val/Met en el gen COMT y la esquizofrenia en una muestra peruana.

Se ha realizado un estudio tipo casos-controles, previo consentimiento informado, con una muestra de 50 pacientes esquizofrénicos del hospital nacional Hermilio Valdizán y 150 personas saludables, sin diagnóstico de la enfermedad, residentes en la ciudad de Lima. El análisis molecular del polimorfismo Val/Met se realizó mediante la técnica PCR-RFLP y confirmado por secuenciamiento automático.

En los controles y los pacientes las frecuencias genotípicas fueron similares (Val/Val=40-44%, Val/Met=46-52%, Met/Met=8-10%), y evaluados según el modelo de herencia codominante, no se han encontrado diferencias significativas [$p > 0.05$; Val/Met: OR=0.80 (IC 95%: 0.41-1.58) y Met/Met: OR=1.14 (IC 95%: 0.36-3.64)]; la tendencia es similar bajo los modelos de herencia dominante, recesivo, sobredominante y aditivo. Asimismo, las frecuencias alélicas en ambos grupos (Val=66-67%, Met=33-34%), no muestran diferencias ($p > 0.05$). Además, el género no interactúa en la asociación con la enfermedad según genotipos Val/Met ($p > 0.05$).

Los resultados nos indican que no existe asociación entre el polimorfismo Val/Met en el gen COMT y la susceptibilidad a la esquizofrenia en esta muestra peruana evaluada.

En perspectiva, es necesario estudiar un mayor número de muestra, incluir otras subpoblaciones peruanas según ancestralidad, evaluar en conjunto con otros genes y epigenes, considerar los endofenotipos clínicos y utilizar tecnologías de secuenciamiento de ADN de alto rendimiento.

Palabras clave: Esquizofrenia, gen COMT, polimorfismo Val/Met, Perú.

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic and complex mental disorder that affects 1% of the population. The gene encoding the enzyme catechol o-methyl transferase (COMT) is risk candidate to schizophrenia because of its participation in the dopamine catabolism. The Val/Met polymorphism (rs4680) in the COMT gene generates differential enzymatic activity, it heterogenous in different populations and has been associated with schizophrenia.

In Peruvian population, no studies of genetic association with schizophrenia, and is necessary to implement research to assist in the prevention, diagnosis, prognosis and pharmacogenetics of the disease.

The aim was to establish the association between of the Val/Met polymorphism in the COMT gene and schizophrenia in a Peruvian sample.

We performed a case-control study with a sample of 50 schizophrenic patients from national hospital Hermilio Valdizan and 150 healthy people without disease diagnosis, residents in the city of Lima. The molecular analysis of COMT Val/Met polymorphism was performed by PCR-RFLP and confirmed by automatic sequencing.

There were no significant differences in the frequencies of genotypes (Val/Val=40-44%, Val/Met=46-52%, Met/Met=8-10%) between controls and patients according codominant model [$p > 0.05$; Val/Met: OR=0.80 (IC 95%: 0.41-1.58) and Met/Met: OR=1.14 (IC 95%: 0.36-3.64)]; similar tendencies under dominant, recessive, overdominant, additive models were found. Also, the frequencies of alleles (Val=66-67%, Met=33-34%) in both groups, no showed differences ($p > 0.05$). Furthermore, gender does not interact with the association to disease according to Val/Met genotypes ($p > 0.05$).

The results indicate that there is no association between the Val/Met polymorphism in the COMT gene and susceptibility to schizophrenia in this Peruvian sample evaluated.

In perspective, it is necessary to study a larger sample, including others peruvian subpopulations according ancestry, evaluated in conjunction with other genes and epigenes, considering clinical endophenotypes and use high-throughput technologies DNA sequencing.

Keywords: Schizophrenia, COMT gene, Val/Met polymorphism, Perú.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

Las enfermedades mentales constituyen un problema de salud en el mundo moderno, debido a factores genéticos, la actividad estresante y a los problemas socioeconómicos que agobian a las poblaciones de hoy en día. El Perú no es ajeno a ésta problemática mundial y esto se hace más complejo porque en el país no se desarrolla una adecuada política de salud mental. Una estrategia para enfrentar las enfermedades en general, y en particular las mentales, es estudiando el aspecto genético molecular a nivel individual y poblacional (Huerta et al., 2007).

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica incapacitante que se caracteriza por síntomas positivos (delirios, alucinaciones y delusiones), síntomas negativos (apatía, abulia, indiferencia, aplanamiento emocional), deterioro cognitivo y alteraciones de las relaciones sociales (trabajo, interpersonales o autocuidado). Esta enfermedad tiene un gran impacto en salud pública, en términos de hospitalización, tratamiento crónico y rehabilitación, y también económico por la pérdida de productividad de las personas que la padecen (Lewis et al., 2000; Gaur et al., 2008).

La Esquizofrenia es una de las enfermedades mentales con más frecuencia en la sociedad humana, la prevalencia mundial está

alrededor del 1%, es decir por cada 100 personas, una la puede padecer. La heredabilidad o el porcentaje de casos que se observan en familias donde algunos de los miembros padece el mal aumenta al 15%, cuando existe un agregado familiar directo puede exceder el 60%, y en parejas de gemelos el porcentaje de casos se puede elevar al 80%, lo que indica que la contribución genética a la enfermedad es muy prominente (Saha et al., 2005; Giusti-Rodríguez y Sullivan, 2013).

Esto es válido para el país, aunque también se postula que factores como el área geográfica, nutrición, infecciones, estrés social, etc., - además de los genéticos- pueden aumentar el riesgo para padecer la enfermedad (Obiols et al., 2001; Hariri, 2011, Howes y Kapur, 2009).

La enzima catecol o-metil transferasa (COMT, EC 2.1.1.6), en términos bioquímicos, cataliza la o-metilación de las catecolaminas biológicamente activas y es el mayor componente del metabolismo de sustancias neuroactivas y neurotransmisores tales como la levodopa, adrenalina, noradrenalina y dopamina. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-Adenosil Metionina (AdoMet) a uno de los grupos hidroxilo del sustrato catecolamínico en presencia de Mg, siendo la metilación del 39-hidróxilo más común que del 49-hidróxilo (Axelrod y Tomchick, 1958; Mannisto y Kaakkola, 1999; Lautala et al., 2001).

Esta enzima se encuentra en casi todos los tejidos, pero en el cerebro está asociada al catabolismo de la dopamina, uno de los principales neurotransmisores (Mannisto y Kaakkola, 1999). Las variantes enzimáticas de baja, intermedia y alta actividad, son muy importantes para las funciones emocionales y neurocognitivas dependientes o que involucran a la corteza prefrontal tanto en pacientes psiquiátricos como en personas saludables (Malhotra et al., 2002; Diamond et al., 2004; Risbrough et al., 2014).

La enzima COMT y sus variantes, están codificadas por el gen del mismo nombre y por consiguiente se relaciona directamente con el catabolismo de la dopamina, que es de gran importancia en la función cognitiva prefrontal, que hasta el actual avance científico, se sabe que es una característica exclusiva de la especie humana (Egan et al., 2001; Nokelainen et al., 2002; Akil et al., 2003; Winterer et al., 2003; Braver et al., 2010).

El gen de la enzima COMT está ubicado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11), tiene 6 exones y en el exón 4 se ha descrito un polimorfismo de una sola base (SNP) en la que una Guanina (G) es reemplazada por una Adenina (A) (código del SNP = rs4680). Este cambio de bases en la proteína, se manifiesta por la presencia de una Metionina (Met) en vez de una Valina (Val), específicamente en el codón 108 (para la forma soluble S-COMT) o en el codón 158 (para la proteína unida a la membrana MB-COMT, mayoritaria en el tejido cerebral), y que se denota como polimorfismo Val^{108/158} Met (en forma resumida, polimorfismo Val/Met) (Lachman et al., 1996; Akil et al., 2006; Craddock et al., 2006; Mukherjee et al., 2010).

La enzima COMT que contiene Metionina es inestable a 37° C y su actividad es 4 veces menor con respecto a la enzima que contiene Valina. Los alelos (Met y Val) son codominantes y los individuos heterocigotos Val/Met tienen una actividad enzimática que es intermedia con respecto a los individuos homocigotos: Val/Val, con alta actividad, y Met/Met, con baja actividad (Mannisto et al., 1999; Mukherjee et al., 2010; Risbrough et al., 2014).

(Ver Cuadro 1).

Cuadro 1. POLIMORFISMO VAL/MET EN EL GEN COMT.

| SECUENCIA DE ADN | AMINOÁCIDO EN LA PROTEINA | GENOTIPO | | | |
|-------------------------|---|------------------|---------------------|----------------------------------|--|
| | | Según aminoácido | Según SNP (rs 4680) | Según actividad enzimática | Según homocigosis |
| GCTGGC GTG AAG | -Ala-Gli- Val -Lys- (..AG V K..) | Val/Val | G/G | High/High= H/H (Alta) | Homocigoto silvestre (Alelo Val: Ancestral) |
| GCTGGC ATG AAG | -Ala-Gli- Met -Lys- (..AG M K..) | Met/Met | A/A | Low/Low= L/L (Baja) | Homocigoto mutante (Alelo Met: Derivado) |
| GCTGGC G/ATG AAG | -Ala-Gli- Val/Met -Lys- (..AG V/M K..) | Val/Met | G/A | High/Low= H/L (Intermedia) | Heterocigoto |

Fuente. Datos tomados de Manisto (1999) y Mukherjee (2010).

Estas variantes o polimorfismos funcionales, determinadas genéticamente, afectan la actividad de la corteza prefrontal, especialmente durante las tareas ejecutivas y de memoria. La baja actividad del alelo Met produce un menor catabolismo de la dopamina, lo cual puede estar asociado con una mayor función cognitiva prefrontal en sujetos saludables (Manisto et al., 1999; Braver et al., 1999; Nokelainen et al., 2002, Egan et al., 2001) al menos en caucásicos, sin embargo, resultados contradictorios han sido reportados con mayor número de muestras (Barnett et al., 2007) y en otras poblaciones como las asiáticas (Wang et al., 2013).

Este polimorfismo funcional del gen COMT es variable o heterogéneo en las distintas poblaciones humanas, y su estudio en relación a enfermedades mentales, no ha mostrado asociación en algunas etnias pero sí en otras, lo cual puede estar relacionado con la heterogeneidad o las diferencias en las frecuencias alélicas, genotípicas e inclusive haplotípicas del gen COMT en los diferentes grupos étnicos y subpoblaciones (Palmatier et al., 1999; Ameyaw et al., 2000; Kocabas et al., 2001; Mukherjee et al., 2010).

En el contexto específico de la esquizofrenia, según las versiones I y II de la teoría dopaminérgica (considerando al gen COMT como candidato directo de riesgo para la enfermedad), y según la teoría de la función cognitiva (considerando al gen COMT como factor influyente en la función cognitiva, rasgo clínico muy importante), se esperaría encontrar una mayor frecuencia del alelo Val (alta actividad) del gen COMT en pacientes esquizofrénicos, debido a la disminución de la dopamina, pero al respecto los resultados de las investigaciones han sido discordantes en las diferentes etnias y poblaciones del mundo, principalmente en caucásicos y asiáticos (Glatt et al., 2003, Fan et al., 2005, Williams et al., 2005, Barnett et al., 2007, Crescenti, 2007; Sagud et al., 2010).

En los estudios clásicos con genes candidatos de riesgo para esquizofrenia, y en los más recientes utilizando tecnologías de alto rendimiento que evalúan gran parte o todo el genoma, se ha establecido que la región que contiene al gen COMT (cromosoma 22q11) puede ser de riesgo, pero además se han incrementado los loci de riesgo en otros cromosomas y que pueden involucrar SNPs, variaciones en el número de copias (CNV) y variantes raras, incluyendo genes de inmunidad (Collins et al., 2012; Hosak, 2013; Giusti-Rodríguez y Sullivan, 2013; Kavanagh et al., 2015; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014).

1.2 Formulación del Problema

En general, los estudios indican que el polimorfismo Val/Met en el gen de la COMT, puede tener alguna implicancia como factor de riesgo para padecer esquizofrenia, a pesar de los resultados contradictorios encontrados en diferentes poblaciones del mundo.

El problema principal es: ¿Está asociado el polimorfismo Val/Met en el gen de la enzima catecol o-metil transferasa (COMT) con la esquizofrenia en una muestra de pacientes peruanos?

Los problemas específicos son: ¿Cuáles serán las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Val/Met COMT en pacientes y controles?, ¿Cuál será la asociación de los genotipos y alelos del polimorfismo Val/Met COMT con la enfermedad?.

En el contexto evaluado, se plantea la siguiente hipótesis general: “El polimorfismo Val/Met en el gen de la catecol o-metil transferasa (COMT) está asociado a la esquizofrenia en una muestra peruana”.

De esta manera, se pretende ampliar los conocimientos y en particular investigar la base genética de la esquizofrenia en la población peruana.

1.3 Justificación teórica

En términos teóricos, se justifica porque puede aportar a los diversos enfoques de la etiología de la esquizofrenia, principalmente a la teoría dopaminérgica de la enfermedad, y en la fisiopatología, la enzima COMT, considerando el polimorfismo genético, puede tener un rol importante al alterar el metabolismo de la dopamina.

1.4 Justificación práctica

El estudio permitirá conocer cuáles son las distribuciones alélicas y genotípicas del gen COMT y cuáles son sus implicancias -por ser un polimorfismo funcional relacionado con actividad dopaminérgica en el cerebro- en la esquizofrenia en la población peruana.

En el país, debido a la diversidad genética de su población en interacción con complejos factores ambientales (sociales, económicos, educativos), y la prevalencia de enfermedades mentales, como la esquizofrenia -considerada un problema de salud pública- se justifica generar conocimientos científicos y desarrollar métodos modernos -como los aportados por la Genética y la Biología Molecular- para predecir, prevenir, diagnosticar y tratar estas enfermedades o estados patológicos de la manera más adecuada.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Establecer la asociación entre el polimorfismo Val/Met en el gen COMT y la esquizofrenia en una muestra peruana.

1.5.2 Objetivos específicos

Establecer las frecuencias alélicas (alelo Met y alelo Val) y genotípicas (Met/Met, Val/Met y Val/Val) en el grupo de pacientes con esquizofrenia, y en el grupo control (sin enfermedad).

Evaluar la asociación entre la esquizofrenia y los genotipos y/o los alelos COMT, bajo los modelos de herencia codominante, dominante, recesivo, sobredominante, aditivo o alélico.

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En el país, en general, no existen estudios de factores genéticos asociados a la susceptibilidad a la esquizofrenia, y específicamente del polimorfismo en el gen de la enzima COMT.

En poblaciones europeas (origen caucásico) se han realizado diversos estudios, reportándose asociaciones con el alelo Val o el alelo Met, y también la falta de asociación. Los trabajos de meta-análisis iniciales (Glatt et al., 2003), principalmente en familias y en algunas poblaciones, indican una asociación del alelo Val con la esquizofrenia, pero metaanálisis posteriores (Munafo et al., 2005) no apoyaron dicha asociación.

Estudios posteriores en otras poblaciones europeas, tales como polacos y alemanes (Pawel et al., 2010; Nieratschker et al., 2010) han seguido la tendencia hacia la falta de asociación, sin embargo en una muestra australiana (Oceanía) de origen caucásico se encuentra una asociación entre el alelo Val y la esquizofrenia (Voisey et al., 2010).

En poblaciones asiáticas también se han realizado investigaciones sobre el polimorfismo Val/Met del gen COMT con resultados disímiles. Por un lado, la falta de asociación, pero de otro lado se reportan asociaciones con el alelo Met y el genotipo heterocigoto Val/Met, en contraposición a las caucásicas,. Por ejemplo, en poblaciones de Japón, China, Corea y Malasia, la mayoría de los estudios indican una falta de asociación entre el polimorfismo Val/Met y la esquizofrenia, y en pocos estudios existe asociación con el heterocigoto Val/Met y el alelo Met (Fan et al., 2005; Okochi et al., 2009; Kang et al., 2010; Wan et al., 2011; Zhang et al., 2012).

En otras poblaciones asiáticas, sin embargo, y principalmente de Oriente medio, tales como los sauditas, los hindúes, israelitas y los turcos, las investigaciones sobre el polimorfismo en el gen COMT y la susceptibilidad a la esquizofrenia han mostrado asociación con los genotipos que contienen al alelo Met, es decir Val/Met y Met/Met (Al-Asmary et al., 2014), siendo las excepciones un subgrupo étnico israelí donde el genotipo de riesgo es el Val/Val (Shifman et al., 2002) y una muestra de Siria que no indica una asociación con el polimorfismo Val/Met (Lajin et al., 2011).

En poblaciones africanas existen pocos estudios, una de ellas en la etnia Xhosa, reporta asociación negativa de la esquizofrenia con el polimorfismo Val/Met del gen COMT pero si existe relación de 2 SNPs distintos dentro del mismo gen (Wright et al., 2012). En Estados Unidos, los descendientes de africanos o afroamericanos, por el contrario, muestran una asociación del alelo Val con la esquizofrenia, al igual que los caucásicos (Wonodi et al., 2006).

En poblaciones de Latinoamérica, los estudios son escasos. En una muestra de la población mexicana, cuyas características culturales y biológicas son similares a las peruanas, no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo Val/Met y la esquizofrenia (Tovilla-Zárate et al., 2012), sin embargo es importante considerar que la

distribución del polimorfismo Val/Met en subpoblaciones o ciudades mexicanas es variable o heterogénea, incluso si se compara con el grupo control utilizado en el estudio de asociación (González-Castro et al., 2013).

En un contexto global, los estudios realizados en otras poblaciones nos muestran que los resultados sobre la asociación del polimorfismo funcional Val/Met en el gen COMT y la susceptibilidad a la esquizofrenia son variables y contradictorios o inconsistentes, incluso dentro de una misma población, existiendo variación entre y dentro de las poblaciones, por lo que es necesario estudiar este polimorfismo en la población peruana, caracterizada por su diversidad.

2.2 Bases teóricas

Existen teorías o modelos que enfocan la esquizofrenia desde diferentes perspectivas, siendo las más importantes:

Teoría neuronal: Es la teoría fundamental postulada por Ramón y Cajal, que principalmente propuso que la relación entre las células nerviosas no era por continuidad, sino por contigüidad, y que ha servido de base para establecer el concepto morfológico y fisiológico de la conexión sináptica (sinapsis), eje fundamental sobre el que se han construido todas las disciplinas neurocientíficas. Sobre las bases de las conexiones sinápticas se han formulado las principales teorías etiopatogénicas de los trastornos mentales, como la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia (López-Muñoz et al, 2006).

Teorías evolutivas sobre la esquizofrenia: Las explicaciones evolutivas o evolucionistas de la esquizofrenia surgen como un intento de contestar la paradoja de la persistencia de la enfermedad, a pesar de que las personas que padecen la enfermedad tienen una baja fertilidad. Algunas teorías han postulado una ventaja fisiológica o social de la esquizofrenia, otras han analizado desde la psicología evolucionista, destacándose las que han buscado una asociación de los postulados darwinistas con datos genéticos o de neurodesarrollo (Obiols et al., 2001).

Teoría del neurodesarrollo de la esquizofrenia: Este modelo propone que el cerebro del futuro paciente esquizofrénico sufre una alteración estructural en algún momento del desarrollo anatómico-funcional y que éste es determinante para la posterior aparición del cuadro clínico de la esquizofrenia (Obiols et al., 2001). Esta teoría tiene que considerar tres posibles variantes de explicación etiológica para la esquizofrenia: la genética, la ambiental y la mixta o interactiva.

Teoría de la genética de la función cognitiva humana: Esta teoría da mayor énfasis al problema de la cognición en la esquizofrenia, en especial la relación del deterioro cognitivo con los síntomas positivos y negativos de la enfermedad así como con la funcionalidad, que puede evolucionar progresivamente o una vez que aparece, permanecer constante. Este deterioro tendría una base genética, en las que estarían involucrados los neurotransmisores como la dopamina (Braver et al., 1999).

Teoría dopaminérgica de la esquizofrenia: Existen versiones de esta teoría que, en general, relaciona la esquizofrenia con la actividad de la dopamina en las vías neurobioquímicas. Las evidencias han sido contradictorias, sin embargo se ha visto su impacto en la evaluación de la función cognitiva y en el tratamiento farmacológico.

La **versión I**, inicialmente, enfatiza el rol o la importancia de la hiperdopaminergia en la etiología de la esquizofrenia, vista como un todo, sin considerar sintomatología. Esta surgió gracias al descubrimiento de las drogas antipsicóticas, demostrándose que la eficacia clínica estaba directamente relacionada a su afinidad por los receptores de la dopamina (Howes y Kapur, 2009).

El punto fundamental era que el exceso de la transmisión de la dopamina al nivel de los receptores, y el bloqueo de éstos, servía para tratar los síntomas psicóticos. Sin embargo, no existía evidencia clara que indicara en que parte del cerebro se producía la anomalía ni el marco dopaminérgico apropiado para vincularla con la expresión de los síntomas positivos y negativos.

La **versión II**, reconceptualiza la versión I, y específicamente propone que la esquizofrenia se caracteriza porque la hipodopaminergia predomina en la corteza prefrontal y, por consiguiente, la hiperdopaminergia es subcortical. El principal avance fue la evidencia aportada por los estudios postmortem, datos de metabolitos y de imágenes, el inicio de los estudios genéticos, así como de investigaciones en animales, sobre las interacciones entre la corteza y la subcorteza cerebral, es decir se adquiere evidencia para postular la especificidad regional cerebral de las disfunciones dopaminérgicas en la esquizofrenia (Howes y Kapur, 2009).

Los estudios de las lesiones en las neuronas dopaminérgicas de la corteza prefrontal han reportado un incremento en los niveles de dopamina –y sus metabolitos-, y se ha encontrado mayor densidad de los receptores D2 en la subcorteza (cuerpo estriado), mientras que la aplicación de agonistas de la dopamina a las áreas prefrontales, reduce los niveles de metabolitos de dopamina en el cuerpo estriado.

La evidencia emergente de que los receptores de dopamina se encontraban distribuidos de manera diferencial en el cerebro –el receptor D1 predominante en la corteza y el receptor D2 predominante en la subcorteza- proporciona las bases para sugerir

que los efectos de las anomalías en la función dopaminérgica pueden variar según la región cerebral.

Los estudios con imágenes han aportado la mayor evidencia al respecto, mostrando un flujo sanguíneo cerebral reducido en la corteza frontal (hipofrontalidad) y que se correlaciona directamente con bajos niveles de metabolitos de dopamina en el fluido cerebro espinal, por lo que se postula que esta correlación es un indicador de bajos niveles de dopamina en la corteza frontal.

Respecto a la sintomatología, por consiguiente, se ha hipotetizado que los síntomas negativos de la esquizofrenia resultan de la hipodopaminergia cortical frontal, y los síntomas positivos son producto de la hiperdopaminergia subcortical (estrial).

Las evidencias a favor de la versión II de la hipótesis dopaminérgica han sido contradictorias, pero sigue significando un gran aporte a la comprensión de la esquizofrenia.

La **versión III**, destaca la importancia de múltiples factores de riesgo genéticos y ambientales, y propone que estos factores se interrelacionan y son canalizados a través de una vía final común que conlleva a una hiperdopaminergia estrial presináptica; además proporciona un marco que vincula la neuroquímica anormal a los síntomas de la esquizofrenia (Howes y Kapur, 2009).

La versión III de la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, involucra, en principio a múltiples factores (genes, drogas antipsicóticas, estrés, disfunción fronto-temporal, dopamina, receptores y transportadores) que interactúan para dar como resultado la disfunción de la dopamina. En segundo lugar, los genes específicos asociados a esta disfunción pasan desde los receptores D2 hasta el nivel de control dopaminérgico presináptico. En tercer lugar, la desregulación se asocia a los rasgos psicóticos y a la predisposición, y por último, la alteración de la valoración de los estímulos.

En el contexto evaluado, las teorías, modelos e hipótesis asumidas para el presente trabajo de investigación, están relacionadas con la actividad dopaminérgica que se realiza en el cerebro, un factor importante en enfermedades como la esquizofrenia y que pueden impactar, por ejemplo, las principales vías neuroquímicas cerebrales y la función cognitiva en la corteza prefrontal (Shepherd, 1994; Howes and Kapur, 2009; Egan et al., 2001, Winterer y Goldman, 2003; Braver et al., 2010).

Las teorías mencionadas, en sus versiones más modernas y considerando los avances en la ciencia y tecnología, incluyen de manera importante, el componente genético. Entre los genes asociados a los trastornos mentales, como la esquizofrenia, se encuentran los correspondientes a receptores cerebrales o enzimas que intervienen en el metabolismo de los neurotransmisores, siendo uno de los más estudiados el gen de la COMT, que tiene un polimorfismo genético funcional que da lugar a variantes de la enzima.

CAPITULO 3: METODOLOGIA

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.1.1.1 CASOS

Comprendió a personas que padecen de esquizofrenia y cuyo diagnóstico ha sido realizado en el Hospital Hermilio Valdizán (Centro de referencia nacional para la enfermedad) según estándares y criterios internacionales: CIE-10-capítulo V y/o DSM-IV.

Criterios de Inclusión:

- Sujetos diagnosticados con esquizofrenia mediante apreciación clínica, clínicamente estables y que se atienden en el centro de referencia nacional para la enfermedad (Hospital Hermilio Valdizán).
- Tener una Ficha Personal Clínica que registre datos generales, origen étnico, antecedentes familiares, subtipo y tiempo de enfermedad, tratamiento y otros datos de interés.

El paciente y/o apoderado legal, dio su Consentimiento Informado (el Comité de Ética del Hospital Hermilio Valdizán aprobó el diseño y el consentimiento informado

para el estudio con pacientes esquizofrénicos.
(Ver Anexos 1 y 2).

3.1.1.2 CONTROLES

Comprendió a personas que no padecen de esquizofrenia.

Criterios de Inclusión:

- Sujetos sin enfermedades neurológicas ni mentales, - determinadas por apreciación clínica- y sin antecedentes familiares para la enfermedad. Asimismo, no deben presentar otras enfermedades crónicas que se asocien con compromiso neurológico y psiquiátrico.

- Sin abuso de drogas en por lo menos 2 meses previos al muestreo.

- Características similares al grupo de pacientes tales como la edad, el género y la procedencia-etnicidad. Fueron reclutados en el hospital y/o campañas de salud. Firmaron su consentimiento informado.

(Ver Anexo 2).

3.1.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA

En la investigación se analizaron 50 muestras de pacientes y 150 muestras de personas sin la enfermedad, pareados por edad, género y procedencia. Los parámetros para el cálculo fueron: frecuencia alelo de riesgo=0.68, riesgo=2.2, proporción casos:controles de 1:3 (3 controles por cada caso), poder=0,80, significancia de 0.05 (2 colas) y modelo de herencia aditivo. Las muestras fueron procesadas y guardadas en el Laboratorio de Biología molecular del CIBN de la facultad de Medicina de San Fernando, UNMSM.

3.2 MATERIAL DE LABORATORIO

3.2.1 EQUIPOS

Termociclador modelo Veriti Applied Biosystems.

Incubadora.

Microcentrifuga.

Cámaras electroforéticas vertical y horizontal.

Fuente de poder

Refrigeradora, Congeladora.

Autoclave, Potenciómetro, Balanza analítica, etc.

3.2.2 MATERIALES, REACTIVOS Y OTROS.

Material de Vidrio: Probetas, matraces, beakers, fioles, pipetas.

Material de Plástico: Tubos Ependorff, Tips, Guantes, etc.

Material para hisopado bucal.

Dodecil sulfato de sodio (SDS), proteinasa K, fenol-cloroformo, etanol.

Geles: Acrilamida y bis-acrilamida, Agarosa.

Azul de bromofenol, Xilencianol, Bromuro de etidio, Nitrato de plata.

Tris base, Acido bórico, EDTA.

Marcadores de peso molecular, agua grado Biología Molecular.

Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific)

Deoxinucleótidos: dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

Primers Val/Met COMT: F: 5'CTCATCACCATCGAGATCAA3'

R: 5'CCAGGTCTGACAACGGGTCA3'

Enzima Taq polimerasa + Buffer + MgCl₂ (Thermo Scientific).

Enzima restricción Hha1II (NlaIII) + Buffer (Thermo Scientific).

3.3 METODOS

3.3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

En condiciones estériles, se realiza hisopados de tejido epitelial bucal tanto en pacientes como el grupo control y con el consentimiento informado de los pacientes o apoderados (Ver Anexo 2).

3.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

El DNA se extrajo usando los métodos estándares (Miller et al., 1988) y/o con un método comercial (Genomic DNA Purification kit, Thermo Scientific). Con este set comercial de purificación se obtiene en promedio 100 ng/uL, listo para la PCR.

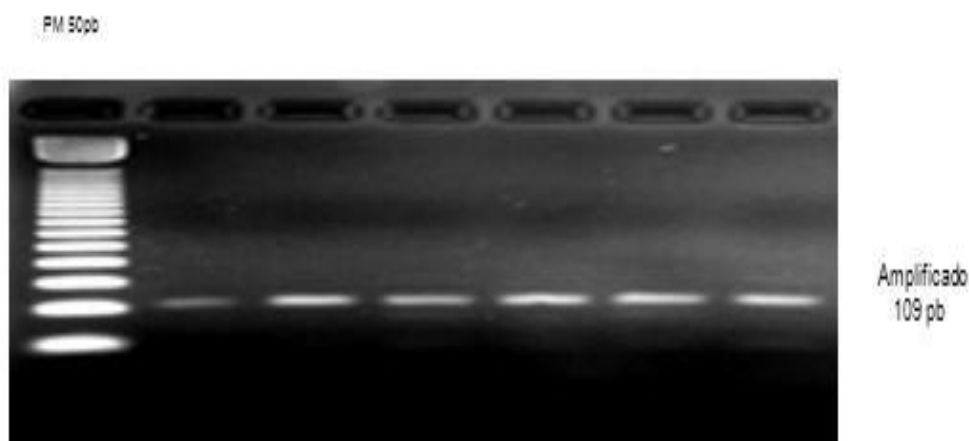
3.3.3 TÉCNICA PCR-RFLP

Los genotipos de la enzima COMT se determinaron con la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa - Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), es decir mediante amplificación con los primers COMT específicos y digestión con la enzima Hin1II (NlaIII) (Lachman et al, 1996; Egan et al, 2001; Malhotra et al, 2002). La técnica fue estandarizada adaptándose a las condiciones del laboratorio de Biología Molecular, CIBN, Facultad de Medicina, UNMSM.

La reacción se realizó en un volumen final de 20 uL con las siguientes concentraciones finales: Buffer Taq PCR 1X, mix de dNTPs 0.4 mM, MgCl₂ 1.5 mM, cebadores (primers) directo e

inverso 0.20 uM c/u, y 1U de la enzima Taq polimerasa Thermo Scientific-Fermentas y 100 ng de ADN.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) con una denaturación inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 36 ciclos de 94 °C por 15 seg para la denaturación, 60 °C por 25 seg para el alineamiento y 72 °C por 30 seg para la extensión, y 72 °C por 5 min para la extensión final. Los productos amplificados, fragmentos de 109 pares de bases (pb), se confirmaron mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 1%, tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV (Ver Figura 1).



Fuente. Tesis.

Figura 1. Gel de agarosa 1% con los amplificados para el polimorfismo Val/Met en el gen COMT.

Para la reacción de restricción se procedió a la digestión de los amplificados con la enzima de restricción Hin1II (NlaIII) según las especificaciones del fabricante (Thermo Scientific-Fermentas). Se utilizó 5 uL del amplificado, 1 uL de Buffer G y 0.2 uL de la enzima, se incubó a 37°C por 12 horas.

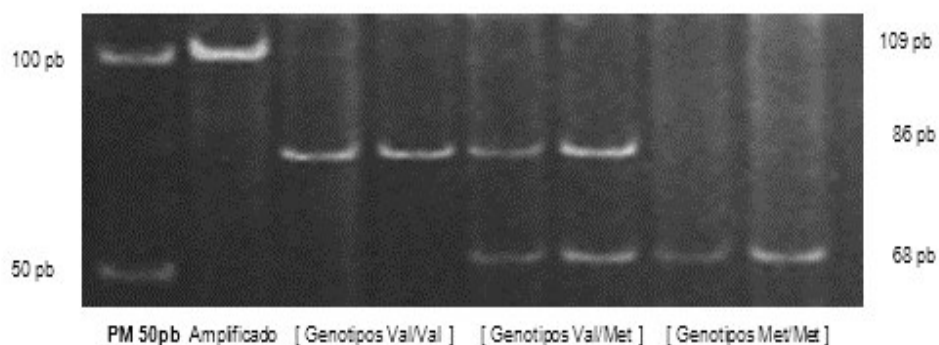
3.3.4 ELECTROFORESIS DE LOS DIGERIDOS Y TINCIÓN CON PLATA

Los fragmentos digeridos se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% denaturante (Urea), con voltaje de 250 voltios por 1 hora.

La visualización de los digeridos en el gel de poliacrilamida se realizó con la tinción de nitrato de plata, con el siguiente procedimiento: Fijación con alcohol 20% por 10-15 min, tinción con AgNO_3 al 0.05% (1.5 gr/L en agua) por 5-10 min y revelado con NaOH al 20% (0.3 g/L en agua + formaldehído 37%) hasta la aparición de las bandas de ADN, y detención de la reacción con ácido acético al 10%. Finalmente se lava con agua destilada y se procede al análisis de genotipos.

3.3.5 GENOTIPAJE

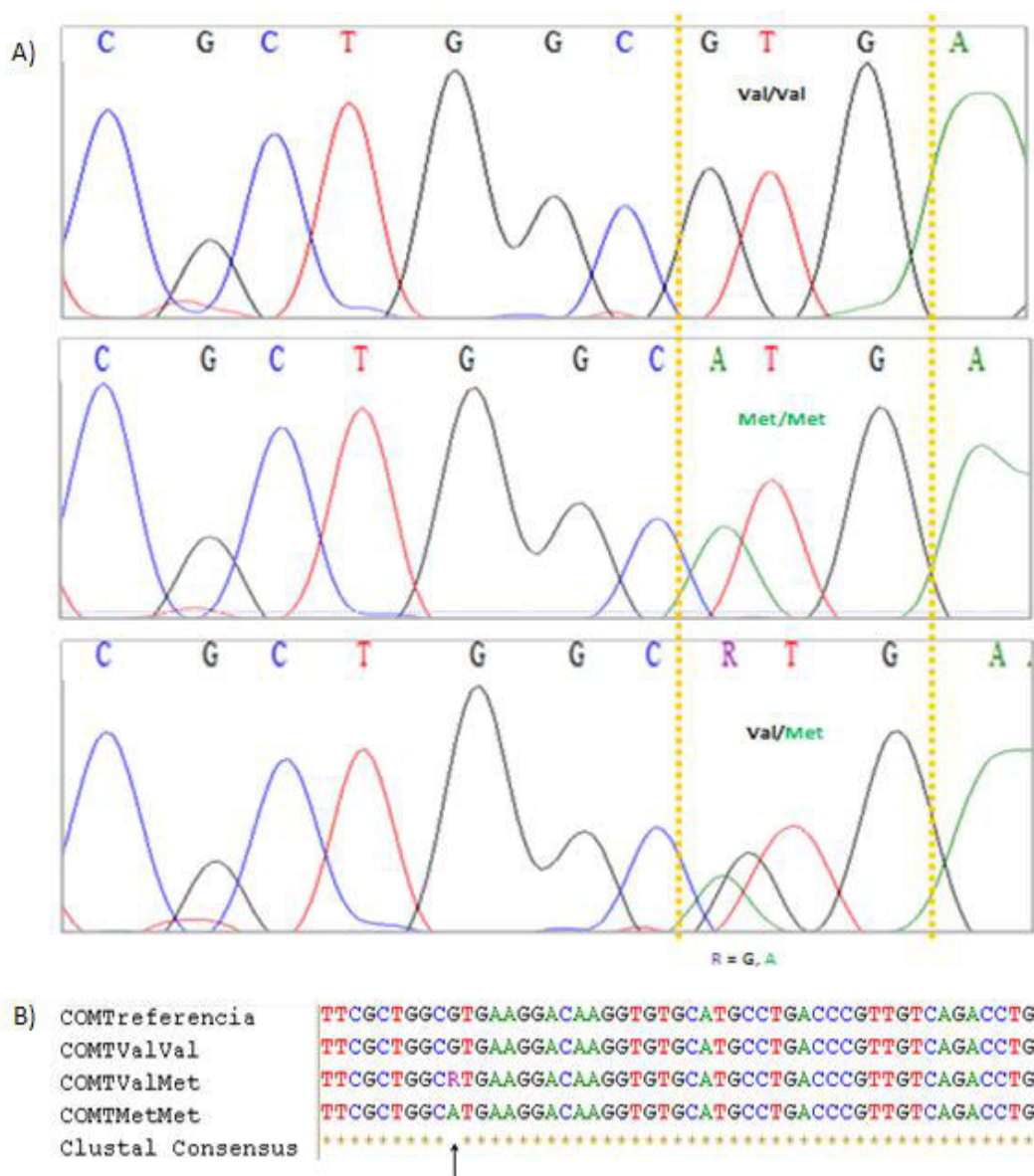
Se analizaron las bandas características para cada genotipo: Homocigoto Val/Val (86+23 pb), homocigoto Met/Met (68+18 pb) y heterocigoto Val/Met (86+68+23+18 pb). Nota: Las bandas de 23 y 18 pb, no se aprecian en el gel. (Ver Figura 2).



Fuente. Tesis.

Figura 2. Gel de poliacrilamida denaturante 8% con los digeridos característicos de los 3 genotipos para el polimorfismo Val/Met en el gen COMT.

Para corroborar los resultados obtenidos por la técnica RFLP, se enviaron a la empresa Macrogen-USA, seis amplificados correspondientes a tres individuos (cada uno amplificado con cebadores directo e inverso) con genotipos representativos de la COMT para su secuenciación por el método de Sanger automático. Los resultados de las secuencias confirmaron los resultados obtenidos por RFLP (Ver Figura 3).



Fuente. Tesis.

Figura 3. A) Electroferogramas de las secuencias parciales con SNP característico de los 3 genotipos para el polimorfismo Val/Met en el gen COMT. B) Alineamiento con el programa BioEdit de las secuencias COMT comparadas con la secuencia de referencia.

3.3.6 ANALISIS ESTADISTICO

Las frecuencias genóticas y alélicas fueron obtenidas por conteo directo y/o automático mediante software. Se aplicó el test exacto (Guo y Thompson, 1992) para evaluar las frecuencias observadas según lo esperado bajo la hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se aplicó Regresión Logística para calcular los Odds Ratios (ORs) con un intervalo de confianza (IC) del 95% para evaluar el efecto -riesgo- de los genotipos que contienen el alelo Met, es decir la frecuencia del alelo menor (MAF) o el alelo menos frecuente en población peruana (Huerta et al., 2007 y proyecto 1000 genomas). Cuando es necesario, además, se asumió al alelo Val como factor de riesgo para evaluar los datos.

Los análisis de Regresión Logística fueron ajustados según género y edad, y aplicados bajo los modelos Codominante, Dominante, Recesivo, Sobredominante y Aditivo.

Se calculó el OR crudo para evaluar el efecto de los alelos Val y Met según el modelo multiplicativo (alélico).

Para los cálculos respectivos se utilizaron el paquete estadístico IBM SPSS v21.0, el software R, PLINK y programas de genética poblacional como el Arlequín 3.11 y Genetix.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados

Las características de los casos (pacientes esquizofrénicos) y el grupo control están resumidas en el Cuadro 2. En general, existe similitud en la distribución en género y edad entre ambos grupos: la mayoría son hombres, y superan los 30 años de edad. La gran mayoría de pacientes tiene esquizofrenia del tipo paranoide (predominan las ideas delirantes y las alucinaciones auditivas, con ansiedad y retraimiento).

Las frecuencias genotípicas observadas son similares entre los casos y controles, y en ambos grupos, estas frecuencias, son las esperadas bajo la hipótesis del equilibrio génico de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas también son similares en los casos y los controles: 67% y 66% para el alelo Val, y 33% y 34% para el alelo Met respectivamente.

Los análisis realizados bajo un modelo Codominante, nos indican que no existe asociación entre la esquizofrenia y los genotipos Val/Met [$p=0.74$, $OR=0.80$ (0.41-1.58)] y Met/Met [$p=0.74$, $OR=1.14$ (0.36-3.64)], teniendo como referencia al genotipo Val/Val. Resultados similares se obtuvieron cuando el genotipo Met/Met es considerado como referencia. (Ver Cuadro 3).

En el modelo Dominante (asumiendo el efecto en conjunto del alelo Met, es decir genotipos Met/Met+Val/Met) el análisis nos indica que no hay asociación [$p=0.62$, $OR=0.85$ (0.44-1.62)] con la esquizofrenia en la muestra estudiada (Ver Cuadro 4).

El análisis bajo el modelo Recesivo (considera el efecto sólo del genotipo homocigoto Met/Met), nos indica que no hay asociación [$p=0.66$, $OR=1.28$ (0.43-3.87)] con la enfermedad en la muestra de pacientes esquizofrénicos (Ver Cuadro 5).

La evaluación bajo el modelo Sobredominante (considera el efecto sólo del genotipo heterocigoto Val/Met), tampoco indica asociación [$p=0.46$, $OR=0.79$ (0.41-1.49)] con la esquizofrenia (Ver Cuadro 6).

El análisis bajo el modelo Aditivo (considera el efecto creciente según genotipo: Val/Val=0, Val/Met=1 y Met/Met=2), no refleja asociación [$p=0.82$, $OR=0.88$ (0.47-1.65)] con la esquizofrenia en la muestra evaluada (Ver Cuadro 7).

La evaluación bajo el modelo Alélico, nos indica que no hay asociación entre la esquizofrenia y el alelo Met [$p=0.85$, $OR=0.96$ (0.59-1.55)] teniendo como referencia al alelo Val. Similar resultado se obtiene cuando se considera el alelo Met como referencia (Ver Cuadro 8).

El análisis específico considerando el género, no refleja interacciones, ya sea el paciente masculino o femenino, para la asociación con la esquizofrenia según los genotipos COMT bajo un modelo codominante (p tendencia=0.96). (Ver Cuadro 9). Resultados similares se obtienen cuando se asumen los modelos dominante, recesivo, sobredominante y aditivo (datos no mostrados).

La esquizofrenia es una enfermedad mental que impacta la salud pública de los países, y el Perú no es la excepción. Por ello es necesario implementar investigaciones que coadyuven a su comprensión, y uno de los factores es la base genética de la enfermedad, en virtud de un mejor manejo y toma de decisiones, en general, en el campo de la salud mental en nuestro país.

La investigación realizada sobre el impacto de polimorfismo Val/Met del gen dopaminérgico COMT, una de las primeras en nuestro país, permite aportar en la comprensión de la esquizofrenia en pacientes peruanos.

Las frecuencias genotípicas observadas, tanto en los pacientes como en los controles, se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, es decir dichas frecuencias se encuentran dentro de lo esperado (Ver Cuadro 2). Este aspecto es importante porque en varios estudios iniciales realizados en otras latitudes, los controles se desviaban del equilibrio, generando asociaciones espúreas, pero una vez controlado este aspecto en los estudios de meta-análisis, se concluye que no existe asociación o que esta es muy baja, principalmente en poblaciones europeas (Munafo et al., 2005).

Las frecuencias de los genotipos y de los alelos del gen COMT encontrados en el presente estudio (Ver Cuadro 2), son muy similares a los obtenidos en una muestra de la población mestiza de Lima (Huerta et al., 2007): Val/Val=42.5%, Val/Met=50.9%, Met/Met=6.6%, alelo Val=68% y alelo Met=32%, y los existentes en la base de datos internacionales para muestras de la ciudad de Lima, Val=66% y Met=34% (proyecto 1000 genomas).

El modelo de herencia Codominante, o modelo General, evalúa el impacto independiente de los genotipos Val/Val, Val/Met y Met/Met sobre la susceptibilidad a la esquizofrenia, y es el modelo más ampliamente reportado en los estudios del tipo casos-controles. La

premisa para estudiar en este contexto el polimorfismo funcional Val/Met, es que afectaría a nivel bioquímico los niveles de dopamina prefrontal debido a la actividad trimodal de la enzima COMT (Egan et al., 2001; Williams et al., 2007; Braver et al., 2010).

En la presente investigación, bajo el modelo Codominante, no se encuentra asociación de los genotipos COMT con la esquizofrenia, específicamente, teniendo como referencia al genotipo Val/Val [$p=0.74$, Val/Met: OR=0.80 (0.41-1.58) y Met/Met: OR=1.14 (0.36-3.64)] o al genotipo Met/Met [$p=0.74$, Val/Met: OR=0.71 (0.22-2.23) y Val/Val: OR=0.88 (0.28-2.80)] (Ver Cuadro 3).

Estos resultados son similares a los publicados para la mayoría de poblaciones europeas, asiáticas -China y Japón- y africanas (Karayiorgou et al., 1998; Glatt et al., 2003; Munafo et al., 2005; Fan et al., 2005; Okochi et al., 2009; Williams et al., 2005; Nieratschker et al., 2010; Wright et al., 2012) y difiere de una población caucásica de Australia (Voisey et al., 2012) y de algunas poblaciones asiáticas tales como los sauditas, israelíes, hindúes, turcos (Wan et al., 2011; Saczi et al., 2004; Kotler et al., 1999; Al-Asmary et al., 2014), principalmente asociado al genotipo Val/Met y al alelo Met.

Respecto a poblaciones latinas, nuestros resultados de falta de asociación de los genotipos COMT con la esquizofrenia, coinciden con el estudio realizado en México (Tovilla-Zárate et al., 2012), sin embargo, es importante mencionar que existen frecuencias variables en diferentes ciudades mexicanas cuando se evalúan personas saludables, indicándose una predominancia del alelo Met (González-Castro et al., 2013), lo que difiere del mencionado estudio de asociación. Esto no sucede en nuestra investigación, donde el grupo control y las frecuencias previamente publicadas (Huerta et al., 2007 y proyecto 1000 genomas) para la población de Lima, son muy similares.

Ello debe tener implicancias para considerar la ancestralidad en los estudios de asociación tipo casos-contróles. La población de Lima se caracteriza por su mestizaje, con un componente nativo americano cercano al 70% (Sandoval et al., 2013).

Bajo el modelo de herencia Dominante, es decir agrupando el alelo Met en los genotipos Val/Met+Met/Met, y comparándolo con el Val/Val (referencia), no existe asociación con la muestra de esquizofrénicos peruanos [$p=0.62$, OR=0.85 (0.44-1.62)] (Ver Cuadro 4), resultados similares a los encontrados en dos estudios de asociación tipo casos-contróles en España (Diez-Martín et al., 2007; Mas et al., 2008), es decir no hay efecto de los genotipos que contienen al alelo Met.

El análisis según el modelo de herencia Recesivo, que considera sólo el genotipo homocigoto Met/Met de riesgo y el integrado Val/Val+Val/Met como referencia, nos indica la falta de asociación con la esquizofrenia [$p=0.66$, OR=1.28 (0.43-3.879)] (Ver Cuadro 5). Estos resultados son similares a los estudios en pacientes esquizofrénicos españoles (Diez-Martín et al., 2007; Mas et al., 2008), eso puede significar que las dos copias del alelo Met, no tienen un efecto en el riesgo de desarrollarla, al menos en las muestras mencionadas.

Considerando sólo el genotipo heterocigoto Val/Met como factor de vulnerabilidad para desarrollar esquizofrenia, es decir bajo un modelo de herencia Sobredominante, con los genotipos homocigotos agrupados Val/Val+Met/Met como referencia, tampoco se verifica asociación con la esquizofrenia en esta muestra peruana [$p=0.46$, OR=0.79 (0.41-1.49)] (Ver Cuadro 6).

Estos resultados son contrarios a los encontrados por un estudio de meta-análisis realizado en subpoblaciones españolas y otras poblaciones europeas, que destaca al genotipo heterocigoto Val/Met

como un factor protector, bajo un modelo sobredominante, para desarrollar esquizofrenia, interpretando y relacionando a los genotipos homocigotos Val/Val y Met/Met con los niveles bajos y altos de la dopamina asociados al riesgo de la enfermedad (Costas et al., 2011).

Es importante considerar que en estudios previos en población peruana (Huerta et al., 2007), las frecuencias del genotipo Val/Met, al igual que la presente investigación, los niveles de heterocigosidad son intermedias/altas para el polimorfismo COMT, característica importante para medir la variabilidad o diversidad, sin embargo, no se refleja que esta heterocigosidad tenga relación con la esquizofrenia en esta muestra peruana.

Bajo un modelo Aditivo, que valora a los genotipos según su impacto en el riesgo (Val/Val=0, Val/Met=1 y Met/Met=2), igualmente no se refleja asociación con la esquizofrenia [$p=0.46$, OR=0.79 (0.41-1.49)] (Ver Cuadro 7), resultado similar a lo observado en una muestra española (Mas et al., 2008), aparentemente la ponderación de los genotipos, desde el Val/Val al Met/Met, no impacta la susceptibilidad a la esquizofrenia.

El modelo Alélico analizado, nos indica que no hay asociación de los alelos Val [$p=0.85$, OR=0.96 (0.59-1.55)] o Met [$p=0.85$, OR=1.05 (0.65-1.69)] (Ver Cuadro 8) con la esquizofrenia en la muestra evaluada. Estos resultados son similares a lo publicado en algunas poblaciones europeas, asiáticas -China y Japón- y africanas (Munafo et al., 2005; Okochi et al., 2009; Nieratschker, 2010; Wright et al., 2012), sin embargo, en otras poblaciones, principalmente europeas, se ha identificado al alelo Val con la susceptibilidad a la esquizofrenia (Egan et al., 2001; Shifman et al., 2002, Wonodi et al., 2006; Hoenicka et al., 2010; Voisey et al., 2010) mientras que en otras poblaciones de Asia -Medio oriente- se asocia el alelo Met a la

enfermedad (Kotler et al., 1999; Saczi et al., 2004; Al-Asmary et al., 2014).

Las diferencias en las asociaciones a nivel alélico, y también de los genotipos, pueden explicarse por la estratificación poblacional, el desequilibrio de ligamiento con otros SNPs dentro de la misma región cromosómica y la heterogeneidad del polimorfismo Val/Met del gen COMT en el mundo (Palmatier et al., 1999; Mukherjee et al., 2010) y por la interacción con otros genes e impacto poligénico de la enfermedad, así como la influencia del medio ambiente y la complejidad neurobioquímica dopaminérgica del cerebro, especialmente de la corteza prefrontal (Hosak, 2013; Sagud et al., 2010; Braver et al., 2010; Hariri, 2011; Lee et al., 2012).

En la presente investigación, la evaluación de la influencia del género según genotipos COMT sobre la susceptibilidad a la esquizofrenia, asumiendo un modelo de herencia codominante, revela que no existe interacción significativa (p tendencia=0,96) (Ver Cuadro 9).

En estudios previos, se ha observado que las mujeres tienen de 20-30% menos actividad enzimática de la COMT, debido a la regulación del estrógeno (Coman et al., 2010) y se han aportado evidencias sobre la asociación diferencial a la esquizofrenia según género (Shifman et al., 2002; Kempton et al., 2009). Por ejemplo, en una muestra española (Hoenicka et al., 2010) se demuestra que el género masculino con genotipo Val/Val es más propenso a la esquizofrenia, y el heterocigoto Val/Met se considera protector, igual tendencia se observa en una población saudí (Al-Asmary et al., 2014).

En poblaciones latinas, como la mexicana, sin embargo, no se evidencia la interacción según el género en la asociación del polimorfismo Val/Met del gen COMT con la esquizofrenia (Tovilla-Zárate et al., 2012), similar a la muestra peruana evaluada. Los análisis de interacción del género según genotipos o alelos COMT,

bajo los demás modelos de herencia distintos al Codominante, tampoco muestran asociaciones con la esquizofrenia (datos no mostrados).

Si nos situamos en el contexto de la teoría dopaminérgica, versiones I y II, nuestros resultados no aportan evidencia directa que la apoyen, sin embargo, la versión III es más amplia y sincrética, apoyada por los datos generados por las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) (Howes and Kapur, 2009; Kendler, 2015), por lo que debe considerarse en los futuros estudios sobre esquizofrenia y porque la hipótesis dopaminérgica en el contexto de la neurobioquímica del cerebro, y por tanto en la etiología de la esquizofrenia, sigue siendo un tema central.

El polimorfismo Val/Met del gen COMT es muy interesante porque diversos estudios lo relacionan con rasgos de personalidad, capacidad de memoria, potencial creativo, función cognitiva prefrontal (Egan et al., 2001; Nokelainen et al., 2002; Barnett et al., 2007; Sagud et al., 2010), muchas de las características asociadas a desórdenes mentales.

En el caso de la esquizofrenia, que se solapa con otros estados mentales como el desorden bipolar y autismo, la relación directa del polimorfismo Val/Met es controversial, sin embargo ciertos rasgos como la disfunción cognitiva, conducta violenta, memoria y otros endofenotipos clínicos (síntomas positivos o negativos), la respuesta al tratamiento (farmacogenética), y la influencia del medioambiente en conjunto con otros genes, son importantes para comprender la enfermedad (Craddock et al., 2006; Hosak, 2013; Li et al., 2012; Singh et al., 2012; Kavanagh et al., 2015).

Los resultados de la presente investigación pueden verse afectados principalmente por el tamaño de muestra y el número de genes estudiados (Nelson et al., 2008; Lee et al., 2012).

En ese sentido, hay que tener precaución y evaluar un mayor número de muestras, incluir otras subpoblaciones según ancestralidad y controlar la estructura poblacional, estudiar otros genes-epigenes y considerar endofenotipos clínicos de la enfermedad, de tal manera que coadyuven en la comprensión de la esquizofrenia en nuestro país.

4.2 Pruebas de hipótesis

Hipótesis: El polimorfismo Val/Met en el gen de la catecol o-metil transferasa (COMT) está asociado a la esquizofrenia en la muestra peruana.

Los resultados de la investigación rechazan la hipótesis, por tanto: El polimorfismo Val/Met en el gen de la catecol o-metil transferasa (COMT) no está asociado a la esquizofrenia en la muestra peruana evaluada.

4.3 Presentación de resultados

Cuadro 2. DATOS GENERALES Y FRECUENCIAS DE GENOTIPOS Y ALELOS COMT DE LOS PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA Y EL GRUPO CONTROL.

| CARACTERÍSTICAS | | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | |
|-----------------------|--------------------|---------------|-------|---------|-------|
| | | n | % | n | % |
| GENERO | Masculino | 30 | 60.0 | 91 | 61.0 |
| | Femenino | 20 | 40.0 | 59 | 39.0 |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100.0 |
| EDAD (años) | Entre 18 a 30 años | 16 | 32.0 | 50 | 33.3 |
| | Mayor de 30 años | 34 | 68.0 | 100 | 66.7 |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100.0 |
| Tipo de Esquizofrenia | Paranoide | 47 | 94.0 | - | - |
| | Otro | 3 | 6.0 | - | - |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100.0 |
| Genotipos COMT* | Val/Val | 22 | 44.0 | 60 | 40.0 |
| | Val/Met | 23 | 46.0 | 78 | 52.0 |
| | Met/Met | 5 | 10.0 | 12 | 8.0 |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100.0 |
| Alelos COMT | Val | 67 | 67.0 | 198 | 66.0 |
| | Met | 33 | 33.0 | 102 | 34.0 |
| | Total | 100 | 100.0 | 300 | 100.0 |

Fuente. Tesis

* Las distribuciones genotípicas observadas en los casos (esquizofrenia) y el grupo control son concordantes con lo esperado bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=1.00$ y $p=0.12$ respectivamente).

Cuadro 3. FRECUENCIAS GENOTIPICAS DEL GEN COMT Y ANALISIS DE RIESGO DE ESQUIZOFRENIA SEGÚN MODELO CODOMINANTE.

| | | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | | OR (IC 95%) ^a | p ^b |
|------------------|--------------|---------------|--------------|------------|--------------|--------------------------|----------------|
| | | N | % | n | % | | |
| GENOTIPO COMT | Val/Val | 22 | 44.0 | 60 | 40.0 | Referencia | |
| | Val/Met | 23 | 46.0 | 78 | 52.0 | 0.80 (0.41-1.58) | 0.74 |
| | Met/Met | 5 | 10.0 | 12 | 8.0 | 1.14 (0.36-3.64) | |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100.0 | | |
| GENOTIPO COMT | Met/Met | 5 | 10.0 | 12 | 8.0 | Referencia | |
| | Val/Met | 23 | 46.0 | 78 | 52.0 | 0.71 (0.22-2.23) | 0.74 |
| | Val/Val | 22 | 44.0 | 60 | 40.0 | 0.88 (0.28-2.80) | |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100.0 | - | |

Fuente. Tesis

^a Regresión logística del genotipo ajustado por género y edad. ^b Prueba Chi cuadrado. No existe asociación entre la esquizofrenia y los genotipos COMT bajo un modelo Codominante, tanto para Val/Val como para Met/Met tomados como referencia en análisis independientes.

Cuadro 4. FRECUENCIAS GENOTIPICAS DEL GEN COMT Y ANALISIS DE RIESGO DE ESQUIZOFRENIA SEGÚN MODELO DOMINANTE.

| | | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | | OR (IC 95%) ^a | p ^b |
|--|------------------------------|--------------------------|----------------|---------|------|--------------------------|----------------|
| | | N | % | n | % | | |
| | | GENOTIPO COMT | Val/Val | 22 | 44.0 | | |
| | Val/Met + Met/Met | 28 | 56.0 | 90 | 60.0 | 0.85 (0.44-1.62) | 0.62 |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100 | - | |

Fuente. Tesis

^a Regresión logística del genotipo ajustado por género y edad. ^b Prueba Chi cuadrado. No existe asociación entre la esquizofrenia y los genotipos COMT bajo un modelo Dominante.

Cuadro 5. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL GEN COMT Y ANÁLISIS DE RIESGO DE ESQUIZOFRENIA SEGÚN MODELO RECESIVO.

| | | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | | OR (IC 95%) ^a | p ^b |
|--|----------------|--------------------------|------------------------------|---------|------|--------------------------|----------------|
| | | N | % | n | % | | |
| | | GENOTIPO COMT | Val/Val + Val/Met | 45 | 90.0 | | |
| | Met/Met | 5 | 10.0 | 12 | 8.0 | 1.28 (0.43-3.87) | 0.66 |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100 | - | |

Fuente. Tesis

^a Regresión logística del genotipo ajustado por género y edad. ^b Prueba Chi cuadrado. No existe asociación entre la esquizofrenia y los genotipos COMT bajo un modelo Recesivo.

Cuadro 6. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL GEN COMT Y ANALISIS DE RIESGO DE ESQUIZOFRENIA SEGÚN MODELO SOBREDOMINANTE.

| | | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | | OR (IC 95%) ^a | p ^b |
|-------------|----------------|-----------------|--------------------------|---------|------|--------------------------|----------------|
| | | N | % | n | % | | |
| | | GENOTIPO | Val/Val + Met/Met | 27 | 54.0 | | |
| COMT | Val/Met | 23 | 46.0 | 78 | 52.0 | 0.79 (0.41-1.49) | 0.46 |
| | Total | 50 | 100.0 | 150 | 100 | - | |

Fuente. Tesis

^a Regresión logística del genotipo ajustado por género y edad. ^b Prueba Chi cuadrado. No existe asociación entre la esquizofrenia y los genotipos COMT bajo un modelo Sobredominante.

Cuadro 7. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL GEN COMT Y ANALISIS DE RIESGO DE ESQUIZOFRENIA SEGÚN MODELO ADITIVO.

| | | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | | OR (IC 95%) ^a | p ^b |
|--|--------------------|----------------------------------|--------------------|---------|-------|--------------------------|----------------|
| | | N | % | n | % | | |
| | | GENOTIPO COMT^c | Val/Val = 0 | | | | |
| | Val/Met = 1 | 50 | 100.0 | 150 | 100.0 | 0.88 (0.47-1.65) | 0.82 |
| | Met/Met = 2 | | | | | | |

Fuente. Tesis

^a Regresión logística del genotipo ajustado por género y edad. ^b Prueba Chi cuadrado. ^c A cada genotipo se le asigna un valor de 0, 1 y 2. No existe asociación entre la esquizofrenia y los genotipos COMT bajo un modelo Aditivo.

Cuadro 8. FRECUENCIAS ALELICAS DEL GEN COMT Y ANALISIS DE RIESGO DE ESQUIZOFRENIA SEGÚN MODELO ALELICO.

| | | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | | OR (IC 95%) ^a | p ^b |
|-----------------------|--------------|----------------|-------|----------------|-------|--------------------------|----------------|
| | | n ^c | % | n ^c | % | | |
| ALELO COMT | Val | 67 | 67.0 | 198 | 66.0 | Referencia | |
| | Met | 33 | 33.0 | 102 | 34.0 | 0.96 (0.59-1.55) | 0.85 |
| | Total | 100 | 100.0 | 300 | 100.0 | - | |
| ALELO COMT | Met | 33 | 33.0 | 102 | 34.0 | Referencia | |
| | Val | 67 | 67.0 | 198 | 66.0 | 1.05 (0.65-1.69) | 0.85 |
| | Total | 100 | 100.0 | 300 | 100.0 | - | |

Fuente. Tesis

^a OR crudo (no ajustado). ^b Prueba Chi cuadrado. ^c Número de cromosomas. No existe asociación entre la esquizofrenia y los alelos COMT bajo un modelo Alélico.

Cuadro 9. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL GEN COMT Y ANÁLISIS DE INTERACCIÓN CON COVARIABLE GÉNERO PARA RIESGO DE ESQUIZOFRENIA SEGÚN MODELO CODOMINANTE.

| GÉNERO | Genotipo COMT | ESQUIZOFRENIA | | CONTROL | | OR (IC 95%) ^a | p ^b |
|-----------|---------------|---------------|--------------|-----------|--------------|--------------------------|----------------|
| | | N | % | n | % | | |
| MASCULINO | Val/Val | 12 | 40.0 | 34 | 37.8 | Referencia | |
| | Val/Met | 14 | 46.7 | 47 | 52.2 | 0.84 (0.35-2.06) | |
| | Met/Met | 4 | 13.3 | 9 | 10.0 | 1.26 (0.33-4.85) | |
| | Total | 30 | 100.0 | 90 | 100.0 | | 0.96 |
| FEMENINO | Val/Val | 10 | 50.0 | 26 | 43.3 | Referencia | |
| | Val/Met | 9 | 45.0 | 31 | 51.7 | 0.71 (0.22-2.23) | |
| | Met/Met | 1 | 5.0 | 3 | 5.0 | 0.88 (0.28-2.80) | |
| | Total | 20 | 100.0 | 60 | 100.0 | | |

Fuente. Tesis

^a Regresión logística del genotipo en interacción con el género, ajustado por edad. ^b Prueba de tendencia para la interacción con el género. No existe interacción del género en la asociación entre la esquizofrenia y los genotipos COMT bajo un modelo Codominante.

CONCLUSIONES

La investigación realizada nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- El polimorfismo Val/Met en el gen de la catecol o-metil transferasa (COMT), en general, no está asociado con la esquizofrenia en la muestra de pacientes peruanos estudiados.
- El polimorfismo Val/Met en el gen de la catecol o-metil transferasa (COMT), en particular, no se asocia con la esquizofrenia bajo los modelos de herencia codominante, dominante, recesivo, sobredominante, aditivo y alélico.
- Las frecuencias de los genotipos Val/Val, Val/Met y Met/Met, similares en los casos y el grupo control, estuvieron entre el 40-44%, 46-52% y 8-10%, respectivamente, destacándose los niveles de heterocigosidad.
- Las frecuencias de los alelos Val y Met, similares en los casos y el grupo control, estuvieron entre el 66-67% y 33-34%, respectivamente.

RECOMENDACIONES

En el contexto evaluado, pueden existir otros factores genéticos, epigenéticos, medioambientales y características clínicas que influyen sobre la susceptibilidad a la esquizofrenia en la población peruana, por lo que se recomienda:

- Realizar estudios sobre la esquizofrenia con mayor número de muestras y en diferentes subpoblaciones peruanas considerando su ancestralidad.
- Evaluar otros SNPs dentro del mismo gen y otros genes directamente relacionados a bioquímica cerebral así como genes del sistema inmunológico, considerando no sólo el género sino también la edad de inicio y endofenotipos clínicos de la enfermedad.
- Implementar investigaciones de epigenética y de genética a gran escala con tecnologías de secuenciamiento de ADN de alto rendimiento y de nueva generación (NGS), como los estudios de asociación de genoma amplios (GWAS) y secuenciamiento de exoma (exome sequencing) para identificar variantes comunes y raras.
- Incorporar la genética y las tecnologías omicas para coadyuvar en la prevención, diagnóstico, pronóstico, respuesta al tratamiento (farmacogenómica) y, en general, en la toma de decisiones en políticas de salud mental en nuestra población.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akil, M., Kolachana, B., Rothmond, D., Hyde, T., Weinberger, D., Kleinman, J. (2003). Catechol-O-Methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. *Journal of Neurosciences*, 23(6), 2008-2013.
- Al-Asmary, S., Kadasah, S., Arfin, M., Tariq, M., Al-Asmari, A. (2014). Genetic association of catechol-o-methyltransferase val(158)met polymorphism in Saudi schizophrenia patients. *Genetic and Molecular Research*, 13(2), 3079-3088.
- Ameyaw, M., Syvanen, A., Ulmanen, I., Ofori-Adjei, D., McLeod, H. (2000). Pharmacogenetics of catechol-O-methyltransferase: frequency of low activity allele in a Ghanaian population. *Human Mutation*, 16(5), 445-446.
- Axelrod J., Tomchick R. (1958). Enzymatic o-methylation of epinephrine and others catechols. *Journal of Biological Chemistry*, 233, 702-705.
- Barnett, J., Jones, P., Robbins, T., Muller, U. (2007). Effects of COMT Val158Met polymorphism on executive function: A meta-analysis of the Wisconsin Card test in schizophrenia and healthy control. *Molecular Psychiatry*, 12, 502-509.
- Braver, T., Cole, M., Yarkoni, T. (2010). Vive les differences! Individual variation in neural mechanisms of executive control. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(2), 242-250.
- Braver, T., Barch, D., Cohen, J. (1999). Cognition and control in schizophrenia: a computational model of dopamine and prefrontal function. *Biological Psychiatry*, 46, 312-328.
- Collins, A., Kim, I., Sklar, P., International Schizophrenia Consortium., O'Donovan, M., Sullivan, P. (2012). Hypothesis-driven candidate genes for schizophrenia compared to genome-wide association results. *Psychological Medicine*, 42(3), 607-616.
- Coman, J., Gnirke, M., Middleton, F., Antshel, K., Fremont, W., Higgins, A., Shprintzen, R., Kates, W. (2010). The effects of gender and COMT Val 108/158Met polymorphism on emotion regulation in velo-cardio-facial syndrome (22q11.2 deletion syndrome): An fMRI study. *Neuroimage*, 53, 1043-1050.
- Costas, J., Sanjuán, J., Ramos-Ríos, R., Paz, E., Agra, S., Ivorra, J., Paramo, M., Brenlla, J., Arrojo, M. (2011). Heterozygosity at catechol-O-methyltransferase Val158Met and schizophrenia: new data and meta-analysis. *Journal of Psychiatry Research*, 45(1), 7-14.
- Craddock, N., Owen, M., O'Donovan, M. (2006). The catechol-o-methyltransferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Molecular Psychiatry*, 11(5), 446-458.
- Crescenti, A. (2007). Estudio de la relación de los polimorfismos en los genes ECA, COMT y CYP2D6 con el riesgo de desarrollar síntomas extrapiramidales por antipsicóticos y el riesgo de esquizofrenia. Tesis doctoral, facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.

- Diamond, A., Briand, L., Fosella, J., Gehlbach, L. (2004). Genetic and neurochemical modulation of prefrontal cognitive functions in children. *American Journal of Psychiatry*, 161(1),125-132.
- Diez-Martin, J., Hoenicka, J., Martínez, I., Aragués, M., Rodríguez-Jiménez, R., Jiménez-Arriero, M., Ponce, G., Rubio, G., Palomo, M., Psychosis and Addiction Research Group. (2007). Polimorfismo Val158Met de COMT y esquizofrenia: Estudio de asociación en una muestra de pacientes españoles. *Medicina Clínica (Barc)*, 128(2), 41-44.
- Egan, M., Golberg, T., Kolachana, B., Callicott, J., Mazzanti, C., Straub, R., Goldman, D., Weinberger, D. (2001). Effect of COMT Val-Met genotype on frontal lobe function and risk schizophrenia. *PNAS*, 98(12), 6917-6922.
- Fan, J., Zhang, C., Gu, N., Li, X., Sun, W., Wang, H., Feng, G., St Clair, D., He, L. (2005). Catechol o-methyl transferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia. a large scale-association plus meta-analysis. *Biological Psychiatry*, 57(2), 139-144.
- Gaur, N., Gautam, S., Sharma, P., Dadheech, G., Mishra, S. (2008). The biochemical wimb of schizophrenia: A review. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23(4), 307-327.
- Giusti-Rodriguez, P., Sullivan, P. (2013). The genomics of schizophrenia: update and implications. *Journal of Clinical Investigation*, 123(11), 4557-4563.
- Glatt, S., Faraone, S., Tsuang, M. (2003). Association between a functional catechol-o-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: Meta-analysis of case-control and family-based studies. *American Journal of Psychiatry*, 160(3), 469-476.
- González-Castro, T., Tovilla-Zárate, C., Juárez-Rojop, I., Pool, S., Genis, A., Nicolini, H., López, L. (2013). Distribution of the Val108/158Met polymorphism of the COMT gene in a healthy Mexican population. *Gene*, 526(2), 454-458.
- Guo, S., Thompson, E. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- Hariri, A. (2011). The what, where and when of catechol-o-methyltransferase. *Biological Psychiatry*, 70(3), 214-215.
- Hoenicka, J., Garrido, E., Martínez, I., Ponce, G., Aragues, M., Rodríguez-Jiménez, R., España-Serrano, L., Alvira-Botero, X., Santos, J., Jiménez-Arriero, M., Palomo, T., PARGPARG. (2010). Gender-specific COMT Val 158Met polymorphism association in Spanish schizophrenic patients. *American Journal of Medical Genetic B Neuropsychiatric Genetic*, 135B, 79-85.
- Hosak, L. (2013). New findings in the genetics of schizophrenia. *World Journal of Psychiatry*, 3(3), 57-61.
- Howes, O., Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III-The final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 549-562.
- Huerta, D., Acosta, O., Polo, S., Martínez, R., Oré, R., Miranda, C. (2007). Polimorfismo Val108/158Met en el gen dopaminérgico catecol-o-metil transferasa (COMT) en una

- población mixta peruana y su importancia para los estudios neuropsiquiátricos. *Anales de la Facultad de Medicina Lima*, 68(4), 321-327.
- Kang, H., Choe, B., Kim, S., Son, S., Lee, K., Kim, B., Hong, Y. (2010). No association between functional polymorphisms in COMT and MTHFR and schizophrenia risk in Korean population. *Epidemiology and Health*, 32, e2010011.
- Karayorgou, M., Gogos, J., Galke, B., Wolyniec, P., Nestadt, G., Antonarakis, S., Kazazian, H., Housman, D., Pulver A. (1998). Identification of sequence variants and analysis of the role of the COMT gene in schizophrenia susceptibility. *Biological Psychiatry*, 43(6), 425-431.
- Kavanagh, D., Tansey, K., O'Donovan, M., Owen, M. (2015). Schizophrenia genetics: Emerging themes for a complex disorder. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 72-76.
- Kempton, M., Haldane, M., Jogia, J., Christodoulou, T., Powell, J., Collier, D., Williams, S., Franqou, S. (2009). The effects of gender and COMT Val158Met polymorphism on fearful facial affect recognition: a fMRI study. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(3), 371-381.
- Kendler, K. (2015). A joint history of the nature of genetic variation and the nature of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 77-83.
- Kocabas, N., Karakaya, A., Cholerton, S., Sardas, S. (2001). Catechol o-methyltransferase (COMT) genetic polymorphism in Turkish population. *Archives of Toxicology*, 75(7), 407-409.
- Kotler, M., Barak, P., Cohen, H., Averbuch, I., Grinshpoon, A., Gritsenko, I., Nemanov, L., Ebstein, R. (1999). Homicidal behaviour in schizophrenia associate with a genetic polymorphism determining low COMT activity. *American Journal of Medical Genetics*, 88(6), 628-633.
- Lachman, H., Papolos, D., Saito, T., Yu, Y., Szumlanski, C., Weinshilboum, R. (1996). Human catechol o-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*, 6(3), 243-250.
- Lajin, B., Alachkar, A., Rezzak, A., Michati, R., Alhaj, H. (2011). No association between Val158Met of the COMT gene and susceptibility to schizophrenia in the Syrian population. *North American Journal of Medical Sciences*, 3(4), 176-178.
- Lautala, P., Ulmanen, I., Taskinen, J. (2001). Molecular mechanism controlling the rate and specificity of catechol o-methylation by human soluble COMT. *Molecular Pharmacology*, 59(2), 393-402.
- Lee, S., DeCandia, T., Ripke, S., Yang, J., PGC-SCZ., ISC., MGS., Sullivan, P., Goddard, M., Keller, M., Visscher, P., Wray, N. (2012). Estimating the proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs. *Nature Genetics*, 44(3), 247-250.
- Lewis, D., Lieberman, J. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, 28(2), 325-334.

- Li, W., Kou, C., Yu, Y., Sun, S., Zhang, X., Kosten, T., Zhang, X. (2012). Association of catechol-o-methyltransferase gene polymorphisms with schizophrenia and negative symptoms in a Chinese population. *American Journal of Medical Genetics Part B*, 159B(4), 370-375.
- López-Muñoz, F., Alamo, C., García, P., Boya, J. (2006). Relevancia histórica de la teoría neuronal un siglo después del Nobel de Cajal: Implicaciones psiquiátricas y psicofarmacológicas. *Psiquiatría Biológica*, 13(5), 167-182.
- Malhotra, A., Kestler, L., Mazzanti, C., Bates, J., Goldberg, T., Goldman, D. (2002) A Functional Polymorphism in the COMT Gene and Performance on a Test of Prefrontal Cognition. *American Journal of Psychiatry*; 159(4), 652-654.
- Mannisto, P., Kaakkola, S. (1999). Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors. *Pharmacological Reviews*, 51(4), 593-628.
- Mas, S., Gassó, P., Crescenti, A., Parellada, E., Bernardo, M., Lafuente, A. (2008). Polimorfismos genéticos en la COMT y riesgo de esquizofrenia en población española. *Medicina Clínica (Barc)*, 131(20), 761-764.
- Miller, S., Dykes, D., Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Mukherjee, N., Kidd, K., Pakstis, A., Speed, W., Li, H., Tarnok, Z., Barta, C., Kajuna, S., Kidd, J. (2010). The complex global pattern of genetic variation and linkage disequilibrium at catechol-o-methyltransferase. *Molecular Psychiatry*, 15(2), 216-225.
- Munafo, M., Bowes, L., Clark, T., Flint, J. (2005). Lack of association of the COMT (Val158/108Met) gene and schizophrenia: A meta-analysis of case-control studies. *Molecular Psychiatry*, 10(8), 765-770.
- Nelson, M., Bryc, K., King, K., Indap, A., Boyko, A., Novembre, J., Briley, L., Maruyama, Y., Waterworth, D., Waeber, G., Vollenweider, P., Oksenberg, J., Hauser, S., Stirnadel, H., Kooner, J., Chambers, J., Jones, B., Mooser, V., Bustamante, C., Roses, A., Burns, D., Ehm, M., Lai, E. (2008). The population reference simple, POPRES: A resource for population, disease and pharmacological genetics research. *American Journal of Human Genetics*, 83(3), 347-358.
- Nieratschker, V., Frank, J., Mühleisen, T., Strohmaier, J., Wendland, J., Schumacher, J., Treutlein, J., Breuer, R., Jamra, R., Mattheisen, M., Herms, S., Schmal, C., Maier, W., Nothen, M., Cichon, S., Rietschel, M., Schulze, T. (2010). The catechol-o-methyltransferase (COMT) gene and its potential association with schizophrenia: findings from a large German case-control and family-based sample. *Schizophrenia Research*, 122(1-3), 24-30.
- Nokelainen, P., Flint, J. (2002). Genetic effects on human cognition: lessons from the study of mental retardation syndromes. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 72(3), 287-296.

- Obiols, J., Barrantes-Vidal, N., Cervilla, J., Cuesta, M., Dolz, M., Fañanás, L., Navarro, F., Peralta, V., Rosa, A., Sanjuán, J., Serrano, J., Van Os, J. (2001). *Neurodesarrollo y Esquizofrenia, Aproximaciones actuales*. (Serie Psiquiatría 21). Barcelona, España: Ars Medica.
- Okochi, T., Ikeda, M., Kishi, T., Kawashima, K., Kinoshita, Y., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Tomita, M., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N. (2009). Meta-analysis of association between genetic variants in COMT and schizophrenia: an update. *Schizophrenia Research*, 110(1-3), 140-148.
- Palmatier, M., Kang, A., Kidd, K. (1999). Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biological Psychiatry*, 46(4), 557-67.
- Pawel, K., Hauser, J., Skibinska, M., Szczepankiewicz, A., Dmitrzak-Weglarz, M., Gorzkowska, K., Pawlak, J., Czerski, P. (2010). Family based association study of DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DAT, COMT gene polymorphism in schizophrenia. *Psychiatria Polska*, 44(3), 405-413.
- Risbrough, V., Bahou, J., Hauger, R., Zhou, X. (2014). Generation and characterization of humanized mice carrying COMT158 Met/val alleles. *Neuropsychopharmacology*, 39(8), 1823-1832.
- Saczi, A., Ergul, E., Kucukali, I., Kilic, G., Kaya, G., Kara, I. (2004). Catechol-o-methyltransferase gene Val108/158Met polymorphism and susceptibility to schizophrenia: association is more significant in women. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 132(1) 51-56.
- Sagud, M., Muck-Seler, D., Mijalhevic-Peles, A., Yuksan-Cusa, B., Zivkovic, M., Jakovljevic, M., Pivac, N. (2010). Catechol-o-methyltransferase and schizophrenia. *Psychiatria Danubina*, 22(2), 270-274.
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., McGrath, J. (2005). A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Medicine*, 2(5), e141.
- Sandoval, J., Salazar-Granara, A., Acosta, O., Castillo-Herrera, W., Fujita, R., Pena, S., Santos, F. (2013). Tracing the genomic ancestry of Peruvians reveals a major legacy of pre-Columbian ancestors. *Journal of Human Genetics*, 58(9), 627-634.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2014). Biological Insights from 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci. *Nature*, 511(7510), 421-427.
- Shepherd, G. (1994). *Neurobiology* (3rd ed.). New York-USA: Oxford University Press.
- Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisanté-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H., Shinar, E., Beckmann, J., Yakir, B., Risch, N., Zak, N., Darvasi, A. (2002). A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, 71(6), 1296-1302.
- Singh, J., Volavka, J., Czobor, P., Van Dorn, R. (2012). A meta-analysis of the Val158Met COMT polymorphism and violent behaviour in schizophrenia. *PLoS One*, 7(8):e43423.

- Tovilla-Zárate, C., Medellín, B., Fresán, A., López-Nárvaez, L., Castro, T., Juárez, I., Ramírez, J., Genis, A., Nicolini, H. (2012). No association between catechol-o-methyltransferase Val108/158Met polymorphism and schizophrenia or its Clinical symptomatology in a Mexican population. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 2053-2058.
- Voisey, J., Swagell, C., Hughes, I., Lawford, B., Young, R., Morris, C. (2012). HapMap tag-SNP analysis confirms a role for COMT in schizophrenia risk and reveals a novel association. *European Psychiatry*, 27(5), 372-376.
- Wan, C., Zainal, N., Lian, L., Mohamed, Z. (2011). Association of the functional polymorphism in the COMT gene with schizophrenia in the three ethnic groups of the Malaysian population. *Psychiatry Research*, 189(1), 67-71.
- Wang, Y., Li, J., Chen, C., Zhu, B., Moysis, R., Lei, X., Li, H., Liu, Q., Xiu, D., Liu, B., Chen, W., Xue, G., Dong, Q. (2013). COMT rs4680 Met is not always the smart allele: Vall allele is associated with better working memory and larger hippocampal volume in healthy Chinese. *Genes Brain and Behaviour*, 12(3), 323-329.
- Williams, H., Glaser, B., Williams, N., Norton, N., Zammit, S., MacGregor, S., Kirov, G., Owen, M., O'Donovan, M. (2005). No association between schizophrenia and polymorphisms in COMT in two large samples. *American Journal of Psychiatry*, 162(9), 1736-1738.
- Williams, H., Owen, M., O'Donovan, M. (2007). Is COMT a susceptibility gene for a schizophrenia?. *Schizophrenia Bulletin*, 33(3), 635-641.
- Winterer, G., Goldman, D. (2003). Genetics of human prefrontal function. *Brain Research Reviews*, 43(1), 134-163.
- Wonodi, I., Mitchell, B., Stine, O., Hong, L., Elliott, A., Kirkpatrick, B., Carpenter, W., Thaker, G., Buchanan, R. (2006). Lack of association between COMT gene and deficit/nondeficit schizophrenia. *Behavioral and Brain Functions*, 2, 42.
- Wright, G., Niehaus, D., Van der Merwe, L., Koen, L., Korkie, L., Kinnear, C., Drogemoller, B., Warnich, L. (2012). Association of MB-COMT polymorphisms with schizophrenia-susceptibility and symptom severity in an African cohort. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(1), 163-169.
- Zhang, F., Liu, C., Chen, Y., Wang, L., Lu, T., Yan, H., Ruan, Y., Yue, W., Zhang, D. (2012). No association of catechol-o-methyltransferase polymorphisms with schizophrenia in the Han Chinese population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(9): 1138-1141.

ANEXOS

ANEXO 1. APROBACION COMITÉ DE ETICA

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL HERMILIO VALDIZAN

COMITE DE ETICA
HOSPITAL HERMILIO VALDIZAN

CERTIFICADO DE APROBACION ETICA

El Comité de Etica del Hospital Hermilio Valdizán en su sesión del 31 de Agosto de 2006, ha revisado y aprobado el Protocolo de Investigación y el Consentimiento Informado del proyecto titulado "Polimorfismo en el gen de la catecol o-metil transferasa (COMT) y su asociación con la Esquizofrenia en el Perú", cuyo autor principal es el Biólogo Oscar Acosta Conchucos y miembros participantes el Doctor Eric Bravo Basaldúa y la Magister Doris Huerta Canales de la Facultad de Medicina de la UNMSM. Este proyecto se realizará en conjunto con el Doctor Walter Leyva Córdova del Hospital Hermilio Valdizán.

Lima, 21 de Setiembre de 2006

MINISTERIO DE SALUD
Hospital "Hermilio Valdizán"

Dra. FORTY CARLO CAMPOS
PRESIDENTE

Comité de Etica Hospital Hermilio Valdizán
Presidente

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

POLIMORFISMO FUNCIONAL EN EL GEN DE LA ENZIMA CATECOL -O- METIL TRANSFERASA (COMT) Y SU ASOCIACIÓN CON LA ESQUIZOFRENIA EN EL PERU.

PRESENTACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Mi nombre es Oscar Acosta Conchucos, soy Biólogo con Mención en Genética y participante en investigaciones de la Facultad de Medicina de la UNMSM. Ante Ud. me presento con la finalidad de invitarle a participar en el estudio relacionado con la esquizofrenia. También participarán en la presente investigación las siguientes personas:

Mg. Doris Huerta Canales, UNMSM.

Dr. Walter Iyva, HHV.

DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Se le invita a participar en este estudio. El propósito de este formato de Consentimiento es darle información necesaria para que libremente decida participar o no en la investigación. No obtendrá un beneficio directo del estudio, pero su participación es importante para coadyuvar en la comprensión de la esquizofrenia en nuestro país. Piénselo bien antes de decidir. Puede preguntar acerca de todas las dudas que tenga sobre el mismo, y sólo después que hayan sido contestadas todas sus preguntas podrá decidir si participa o no. Le daremos una copia de este consentimiento.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Existen muchos aspectos de la esquizofrenia que todavía no están dilucidados. En algunos estudios se ha encontrado asociación entre las variantes del gen COMT y la enfermedad. Nosotros queremos saber que tipo de variantes de este gen se encuentran en nuestra población y, además, si está asociado con la enfermedad, específicamente evaluar rasgos cognitivos, y ser considerados como factores de riesgo, razón por la que realizamos este estudio y lo invitamos a participar. Esta prueba es libre de costo y absolutamente confidencial.

PROCEDIMIENTO

1. En su calidad de participante Ud. deberá contestar las preguntas que serán anotadas en una ficha personal confidencial.
2. Se le realizará un hisopado bucal y/o se le tomará una muestra de sangre de aproximadamente 5 ml. (equivalente a una cucharadita) de una vena de su brazo empleando una aguja estéril.
 - Esta muestra será utilizada para el estudio del gen COMT que se encuentra en su material hereditario o ácido desoxirribonucleico (ADN).
 - La obtención de sangre venosa del brazo puede causar una ligera molestia, como dolor o hematoma local, lo que desaparecerá en unos días. Rara vez puede ocasionar una infección, y si fuera el caso, nosotros asumiremos su tratamiento.
 - Sus rasgos cognitivos serán evaluados mediante tests o pruebas psicológicas estandarizadas (versión escrita y/o CD).
 - Estos procedimientos, en forma general, no constituye ningún riesgo para su salud.

CONFIDENCIALIDAD

Todos los hallazgos en este estudio serán confidenciales. Sus datos personales así como la muestra tendrán un Código y no su nombre, los cuales quedarán registrados. Si los resultados de este estudio son publicados, su nombre no aparecerá.

RESPONSABLE DEL ESTUDIO

Si tuviese preguntas adicionales durante el estudio dirigirse a:

Biólogo Oscar Acosta. Teléfono 999748440, E-mail: oacostac@yahoo.com

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación es voluntaria y no hay compensación económica. Usted puede rehusarse a participar como sujeto de investigación de este estudio. Incluso si ha decidido participar, Ud. o el investigador responsable pueden interrumpir su participación en cualquier momento previa comunicación escrita.

DECLARACION DEL PARTICIPANTE

Declaro que estoy debidamente informado(a) acerca del presente estudio y que he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias acerca de la investigación y mis derechos. Además, declaro que estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas.

Sé que mi participación es voluntaria y que en cualquier momento puedo retirarme, y además los datos serán confidenciales y el estudio será motivo de publicación en la que no aparecerá mi nombre. Sé que mi muestra, en principio, servirá para estudiar el gen COMT y posteriormente otros genes asociados con la enfermedad, asociándolos con rasgos cognitivos.

Por lo expuesto, acepto ser incluido(a) en el presente estudio, y además autorizo que mi muestra de ADN sea guardada en el Banco Genético para que pueda ser utilizada en investigaciones posteriores con otros marcadores moleculares o genes relacionados con la esquizofrenia.

.....
 Paciente o Apoderado
 Control

Nombre:
 DNI:

.....
 Testigo
 Nombre:
 DNI:

.....
 Investigador
 Nombre:
 DNI:
 Fecha:

.....
 Paciente o Apoderado
 Control

.....
 Testigo

Firma Investigador / MiembroEquipo Fecha: