

Artículo original

Evidencia de identidad alélica para el gene del receptor DRD4 a dopamina en pacientes con esquizofrenia familiar de origen mexicano

Alma Delia Genis,^{***} Carlos Alfonso Tovilla-Zárate,^{***} Beatriz Camarena,^{****} Alejandro Aguilar,^{****} Julio César Flores-Lázaro,^{*} Nuria Lanzagorta,^{*} Daniel Santana-Vargas,¹ Ana Fresán,^{****} Carlos Campillo,^{*} Michael Escamilla,² Humberto Nicolini^{*,**,*3}

RESUMEN

Los estudios de asociación alélica en esquizofrenia se han enfocado en diversas regiones cromosómicas, las cuales contienen genes que codifican para receptores dopaminérgicos. Dentro de éstas, los polimorfismos del gen del receptor de dopamina D4 (*DRD4*) han sido ampliamente relacionados con la sintomatología psiquiátrica. Existen algunos reportes de asociaciones entre el polimorfismo 48-bp-VNTR en el exón III y la esquizofrenia, aunque esta relación aún es controvertida. La mayoría de los estudios han utilizado pacientes comparados contra controles o familias tipo tríos. Sin embargo, no se han presentado estudios con este polimorfismo usando familias con varios afectados. En este estudio se analizó este polimorfismo VNTR del exón III del *DRD4* en 60 familias con al menos un par de hermanos afectados. Los datos se analizaron con el programa SIBPAL (*software* S.A.G.E). La estimación promedio de alelos compartidos fue de 0.54 ($p=0.014$) y la proporción estimada de parejas de hermanos/familiares con uno o dos alelos compartidos significativamente fue 0.499 y 0.208 ($p=0.01$, y $p=0.004$), respectivamente. Los resultados sugieren que el polimorfismo 48-bp-VNTR-*DRD4* podría estar asociado con la esquizofrenia en familias seleccionadas en la ciudad de México. La asociación reportada en este trabajo podría ser positiva debido a la particular mezcla poblacional en la ciudad de México.

Palabras clave: ligamiento, *DRD4*, esquizofrenia, alelos compartidos.

ABSTRACT

Allelic association studies in schizophrenia have focused on different chromosomal regions that contain genes coding for dopamine receptors. The polymorphisms of the dopamine receptor D4 (*DRD4*) have been widely associated with psychiatric symptoms. There are some reports of association between the polymorphism 48-bp-VNTR in exon III and schizophrenia, although this relationship remains controversial. Most studies have used patients comparing to controls or trios; however, there have been no studies on this polymorphism using families with multiple affected subjects. In this study we analyzed the VNTR polymorphism of the *DRD4* exon III in 60 families with at least one pair of affected siblings. Data was analyzed using SIBPAL (S.A.G.E. software). The average estimate of shared alleles was 0.54 ($p=0.014$) and the estimated proportion of siblings with one or two shared alleles was statistically significant 0.499 and 0.208 ($p=0.01$, $p=0.004$). These results suggest that the 48-bp-VNTR-*DRD4* polymorphism may be associated with schizophrenia in Mexico City families. The association reported in this work could be positive due to the particular population mix in Mexico City.

Key words: linkage, *DRD4*, schizophrenia, shared alleles.

* Servicios de Atención Psiquiátrica, Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud, Secretaría de Salud, México, D.F.

** Postgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D. F., México.

*** División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México.

**** Laboratorio de Genética Psiquiátrica, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, México, D. F.

¹ Laboratorio de Neurocirugía Experimental, Hospital General de México, México, D.F.

² South Texas Psychiatric Genetics Research Center, Paul L. Foster School of Medicine, Texas Tech Health Science Center, El Paso, TX.

³ Grupo de Estudios Médicos y Familiares Carracci, México, D.F.

Correspondencia: Dr. Humberto Nicolini, Grupo Médico Carracci, Carracci 107, Col. Insurgentes Extremadura, 13740, México, DF. Teléfono: (55) 56 11 30 28; fax: (55) 33 30 01 08. Correo electrónico: nicolini_humberto@yahoo.com

Recibido: enero 2012. Aceptado: marzo 2012.

Este artículo debe citarse como: Genis AD, Tovilla-Zárate CA, Camarena B, Aguilar A, Flores-Lázaro JC, Lanzagorta N y col. Evidencia de identidad alélica para el gene del receptor DRD4 a dopamina en pacientes con esquizofrenia familiar de origen mexicano. Rev Latinoam de Psiquiatría 2012;11(2):33-37.

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica muy compleja para la cual se han descrito múltiples genes asociados.¹ El gen que codifica para el receptor a dopamina *DRD4* fue clonado y mapeado en el brazo corto del cromosoma 11 en el locus 11p15.5; está constituido por cuatro exones y tres intrones. Varios de sus polimorfismos se han asociado con psicosis y en especial con esquizofrenia.^{1,2,3} El *DRD4* es uno de los genes con mayor variabilidad en el genoma y es uno de los más estudiados en desordenes psiquiátricos.^{4,5} Las regiones polimórficas de interés en este gen se encuentran en la región del promotor (-521, -516), en el exón I (120pb R) y en el exón III.^{6,7} Aquellas regiones descritas en el exón III presentan una región polimórfica de un tipo de polimorfismo llamado “número variable de secuencias en continuidad”, y que por sus siglas en inglés se llama VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), con unidades de repetidos de 48 pares de bases (pb). Dichas secuencias repetidas pueden formar un asa citoplasmática intracelular con variación de tamaño respecto al número de repetidos que presente el individuo; se han reportado alelos de 2 a 11 repetidos.^{3,5} Este marcador se ha estudiado en varias poblaciones tratando de asociar sus diversos alelos con la esquizofrenia.

Se han realizado estudios de ligamiento para determinar si el marcador dentro del cromosoma localiza en el mapa del genoma la enfermedad, y se hereda de manera conjunta con la misma, en este caso la esquizofrenia. Los resultados de ligamiento en esquizofrenia han sugerido a la región 11p15.5 como *locus* candidato con la esquizofrenia, que es el sitio donde se encuentra el gen del *DRD4*. Sin embargo, la esquizofrenia es una enfermedad compleja. En muchos trabajos se propone al gen *DRD4* como posible candidato responsable de la enfermedad.^{1,9,10,11,12,13,14,15,16} Sin embargo, no existe una replicación consistente.⁸ Es importante puntualizar que varios de estos estudios fueron hechos en poblaciones homogéneas, tales como la población israelí y sueca.^{6,15} En la literatura, la mayoría de los estudios de asociación con el gen *DRD4* publicados son estudios de casos y controles.^{2,4,6,8,17,18,19,20,21} Desde 1994 hasta la fecha aproximadamente 12 estudios han usado este polimorfismo sin encontrar consenso en los resultados. Los estudios de asociación basados en familias pueden ayudar a evitar efectos de estratificación poblacional, pero estos trabajos han sido menos numerosos y también han arrojado resultados ambivalentes.^{7,10}

Hasta ahora no ha habido ningún estudio de asociación para este gen usando una muestra de pares de hermanos afectados (diseño llamado “*sib-pair*”: familias que cuentan por lo menos con un par de hermanos afectados con esquizofrenia). En este trabajo, se usó esta metodología para obtener la segregación de alelos compartidos mediante el método de identidad por descendencia (IBD) y detectar la implicación de este polimorfismo con la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron a todos los hermanos afectados incluidos en las familias. Se obtuvo la probabilidad del idéntico por descendencia (IBD) y el índice del logaritmo de probabilidades (LOD).

Muestra

Se reunieron 60 pares de hermanos (*sib-pairs*) con esquizofrenia, de familias residentes en la ciudad de México. Las familias reclutadas reunieron los criterios de inclusión, que eran la presencia de por lo menos dos hermanos afectados con esquizofrenia y ser de descendencia tanto de padres como de abuelos mexicanos.^{22,23}

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes en México y los Estados Unidos. Los pacientes fueron evaluados por un psiquiatra entrenado que les aplicó la entrevista de diagnóstico para los estudios genéticos (DIGS) validada en español.²⁴

Esta muestra es parte de un proyecto multicéntrico de ligamiento.²³ Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas y el DNA fue extraído para genotipificación con un procedimiento estándar.⁴ Se analizó el polimorfismo 48bp-VNTR que se encuentra en el exón III del gen *DRD4* en 60 familias con la presencia de cuando menos un par de hermanos afectados con esquizofrenia reclutados en la ciudad de México. El número total de sujetos genotipados fue de 245 individuos. De ellos, 131 tuvieron el diagnóstico de esquizofrenia, 54% eran varones con una edad promedio de 32.8 años (S.D.=9) y una edad promedio de inicio de la enfermedad de 20.4 años (5.5 años). La severidad de la esquizofrenia fue evaluada mediante la escala de síntomas negativos y positivos (SANS y SAPS); sus resultados promedio fueron de 12 (S.D.=6) y 6 (S.D.=5) respectivamente. La genotipificación se realizó por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) con un programa de ciclado.⁴ Los genotipos fueron resueltos en geles de agarosa/metafor al 2,2% 1:1, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Los alelos compartidos entre los hermanos afectados fueron analizados con el paquete estadístico S.A.G.E, versión 5.3.1, por medio de los programas SIBPAL y LODPAL.²⁵ El programa de SIBPAL analizó a todos los hermanos afectados incluidos en la familia; con éste se obtiene la probabilidad del idéntico por descendencia (IBD), deduciendo genotipos que pudieran faltar. La probabilidad de compartir el IBD entre la población general es de 0.5 y se espera que entre hermanos haya una desviación significativa al 0.5; de tal manera que si se observa esta desviación, se consideraría que el marcador está ligado etiológicamente con la enfermedad. El programa LODPAL realiza su análisis a partir de los hermanos afectados con base en la formulación del índice LOD. La implementación del modelo logístico general, incluye el modelo no-paramétrico; éste permite la inclusión de todos los pares de hermanos afectados y los hermanos no afectados.²⁵

RESULTADOS

La proporción estimada del marcador compartido para los alelos IBD fue de 0.54 ($p=0.014$), adicionalmente la proporción estimada con 1 y 2 alelos presentó un IBD de 1 alelo: 0.499, ($p=0.01$) y dos alelos: 0.208 ($p=0.004$). El índice LOD que se obtuvo a partir del programa LODPAL fue 1.26, $p=0.007$ (ver Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio realizado con el polimorfismo 48-VNTR del gen *DRD4* usando pares de hermanos y en una población de sujetos originarios de la ciudad de Mé-

Cuadro 1. Frecuencia de alelos compartidos (IBD) Índice LOD para el polimorfismo 48-VNTR del gen *DRD4* en pares de hermanos afectados con esquizofrenia de la Ciudad de México

SIBPAL	ALELOS	IBD	P
	0	0.54	0.01
	1	0.49	0.01
	2	0.20	0.004
LODPAL		LOD	
		1.26	0.007

xico. El *DRD4* es un gen que ha sido asociado con varias enfermedades mentales por ser un blanco terapéutico importante en el control de estas patologías, siendo el sitio de acción de varios antipsicóticos.^{3,21}

Algunos autores han propuesto al cromosoma 11 como región implicada en la enfermedad, ya que contiene varios genes dopaminérgicos (como el *drd2* y el *DRD4*); algunas de estas regiones se relacionana con la esquizofrenia.^{1,6,9,11,12,13,15,19} Nanko y colaboradores analizaron familias japonesas, proponiendo al marcador D11s35 como asociado con la enfermedad.¹³ Wang y colaboradores realizaron un análisis amplio del genoma en pacientes con esquizofrenia y determinaron 16 marcadores en el cromosoma 11; ninguno de estos marcadores evidenciaba ligamiento genético. Sin embargo, reportaron un índice LOD positivo de (1.35) para el gen *drd2*.¹¹

En una revisión amplia del genoma, donde incluyeron poblaciones con varios desordenes psiquiátricos, como trastorno bipolar, alcoholismo y esquizofrenia, los cromosoma 11, 14 y 15 reportaron regiones con resultados significativos, y en el cromosoma 11 observaron evidencia estadísticamente significativa de ligamiento para esquizofrenia.⁹ Sin embargo, otros estudios no encontraron ligamiento genético en esta misma región cromosómica.^{12,22,23}

Recientemente nuestro grupo realizó dos tamizajes genéticos en población latina provenientes de EU, México, Guatemala y Costa Rica; en el primero, con 99 pares de hermanos diagnosticadas con esquizofrenia,²² encontramos evidencia significativa de ligamiento en los cromosomas 1pter-p36 y ligamiento sugestivo en el cromosoma 18p11 y 5q35; en otro estudio posterior, utilizamos 191 familias de los mismos sitios de estudio y encontramos evidencia significativa de ligamiento para otro *loci* en 17q21,²⁶ pero no se detectó evidencia que apuntara a el cromosoma 11. Por lo que podríamos pensar que la contribución del gen *DRD4* sea de un efecto pequeño en la varianza del fenotipo o bien como un gen modificador de la expresión de genes principales de la vulnerabilidad a la esquizofrenia.

Para los datos presentados en este artículo se incluyó el polimorfismo 48-VNTR del gen *DRD4*, y utilizamos una muestra de este estudio multicéntrico incluyendo únicamente personas de la Ciudad de México. Esta selección secundaria puede disminuir la heterogeneidad genética que presenta toda la muestra y posiblemente aumentar el poder estadístico, ya que este polimorfismo puede ser relevante

en esa población en particular.^{23,27} La población mexicana es una población mezclada, con semejanzas genéticas a la población mexicana-americana de los Estados Unidos y a la población de Costa Rica de América Central.^{23,28} El proceso de la mezcla en la población mexicana fue con antepasados del continente europeo (sobre todo español) y de Amerindios en América latina. Sin embargo, la mezcla ha sido compleja y heterogénea. Como resultado de esta variabilidad, en la actualidad se podría encontrar una homogeneidad más alta dentro de la población de la Ciudad de México comparada con la muestra que fue incluida en estudios más amplios, descritos anteriormente, y en donde se utilizaron muestras de otros países. Considerando únicamente las familias de esta ciudad, contamos con la ventaja de que el análisis de la asociación se realizó en una sub-muestra menos heterogénea.²⁸

CONCLUSIONES

En varias ocasiones se ha sugerido que el cromosoma 11 se encuentra implicado en la etiología de la esquizofrenia. No obstante, nunca se ha probado que el ligamiento fuera significativo y nunca se ha replicado de forma consistente. Nuestros resultados demuestran que los alelos del polimorfismo 40-VNTR del gen DRD4 se comparten con mayor frecuencia entre los hermanos afectados con esquizofrenia en una sub-muestra poblacional de la Ciudad de México. Debido a su particular diseño, este estudio puede indicar un gen candidato para estudiarse con mayor detalle en el futuro, especialmente en la población de la Ciudad de México.

Las limitaciones principales de nuestro estudio es el pequeño tamaño de la muestra y la inclusión de solamente un polimorfismo en este gen. En estudios futuros se debe analizar si la asociación de este gen se reproduce en muestras más grandes de familias con esquizofrenia obtenidas de la población mexicana.

Agradecimientos

Los sujetos y muestras fueron reunidos gracias al financiamiento del grupo *The International Neuro-Genetics Association of Spanish America and the United States* (INGASU), y financiados por una beca colaborativa de NIMH (*Genetics of Schizophrenia in Latino Populations*) al Dr. Michael Escamilla (University of Texas Health Science Center at San Antonio. MH60881).

REFERENCIAS

1. Gurling HM, Kalsi G, Brynjolfsson J, Sigmundsson T, Sherrington R, et al. Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21-22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3-24 and 20q12.1-11.23. *Am J Hum Genet* 2001;68(3):661-673
2. Rinetti G, Camarena B, Cruz C, Apiquián R, Fresán A, Páez F, Nicolini H. Dopamine D4 receptor (DRD4) gene polymorphism in the first psychotic episode. *Arch Med Res* 2001;32(1):35-38.
3. Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK., Seeman P, et al. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 1991;350(6319):610-614.
4. Camarena B, Loyzaga C, Aguilar A, Weissbecker K, Nicolini H. Association study between the dopamine receptor D(4) gene and obsessive-compulsive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007;17(6-7): 406-409.
5. Petronis A, Van Tol HH, Kennedy JL. A Small PCR-RFLP in the 5' noncoding region of the human D4 dopamine receptor gene (DRD4). *Hum Hered* 1994;44(1):58-60.
6. Olsen L, Timm S, Wang AG, Soeby K, Jakobsen KD, et al. Association of the 120-bp duplication in the dopamine D4 receptor gene and schizophrenia in a sample of Danish subjects. *Schizophr Res* 2005;73(1):133-135.
7. Devon RS, Porteous DJ. Physical mapping of a glutamate receptor gene in relation to a balanced translocation associated with schizophrenia in a large Scottish family. *Psychiatr Genet* 1997;7(4):165-169.
8. Levinson DF. Meta-analysis in psychiatric genetics. *Curr Psychiatry Rep* 2005;7(2):143-151.
9. Craddock N, Lendon C. Chromosome Workshop: chromosomes 11, 14, and 15. *Am J Med Genet* 1999;88(3):244-254.
10. Nanko S, Gill M, Owen M, Takazawa N, Moridaira J, et al. Linkage study of schizophrenia with markers on chromosome 11 in two Japanese pedigrees. *Jpn J Psychiatry Neurol* 1992;46(1):155-159.
11. Wang ZW, Black D, Andreasen NC, Crowe RR. A linkage study of chromosome 11q in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1993;50:212-216.
12. Kalsi G, Gamble D, Curtis D, Brynjolfsson J, Sigmundsson T, et al. No evidence for linkage of schizophrenia to DXS7 at chromosome Xp11. *Psychiatr Genet* 1999;9:197-199.
13. Nanko S, Fukuda R, Hattori M, Sasaki T, Dai XY, et al. Linkage studies between affective disorder and dopamine D2, D3, and D4 receptor gene loci in four Japanese pedigrees. *Psychiatry Res* 1994;52:149-157.
14. Barr CL, Kennedy JL, Lichter JB., Van Tol HH, Wetterberg L, et al. Alleles at the dopamine D4 receptor locus do not contribute to the genetic susceptibility to schizophrenia in a large Swedish kindred. *Am J Med Genet* 1993;48:218-222.
15. Mulcrone J, Whatley SA, Marchbanks R, Wildenauer D, Altmark D, et al. Genetic linkage analysis of schizophrenia using chromosome 11q13-24 markers in Israeli pedigrees. *Am J Med Genet* 1995; 60:103-110.
16. Glatt SJ, Faraone SV, and Tsuang MT. Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2003;8:911-915.

17. Tsai SJ, Yu YW, Chen TJ, Chen MC, and Hong CJ. Association analysis for dopamine D3 receptor, dopamine D4 receptor and dopamine transporter genetic polymorphisms and P300 event-related potentials for normal young females. *Psychiatr Genet* 2003;1351-1353.
18. Franke P, Nothen MM, Wang T, Knapp M, Lichtermann D, et al. DRD4 exon III VNTR polymorphism-susceptibility factor for heroin dependence? Results of a case-control and a family-based association approach. *Mol Psychiatry* 2000;5:101-104.
19. Evans KL, Brown J, Shibasaki Y, Devon RS, He L, et al. A contiguous clone map over 3 Mb on the long arm of chromosome 11 across a balanced translocation associated with schizophrenia. *Genomics* 1995;28:420-428.
20. Muir WJ, Gosden CM, Brookes AJ, Fantes J, Evans KL, et al. Direct microdissection and microcloning of a translocation breakpoint region, t(1;11)(q42.2;q21), associated with schizophrenia. *Cytogenet Cell Genet* 1995;70:35-40.
21. Serretti A, Lorenzi C, Mandelli L, Cichon S, Schumacher J, et al. DRD4 exon 3 variants are not associated with symptomatology of major psychoses in a German population. *Neurosci Lett* 2004;368:269-273.
22. Escamilla MA, Ontiveros A, Nicolini H, Raventos H, Mendoza R, et al. A genome-wide scan for schizophrenia and psychosis susceptibility loci in families of Mexican and Central American ancestry. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144:193-199.
23. Contreras, Dassori A, Medina R, Raventos H, Ontiveros A, Nicolini H, Munoz R, Escamilla M. Diagnosis of schizophrenia in latino populations: a comparison of direct interview and consensus based multi-source methods. *J Nerv Ment Dis* 2009;197(7):530-535.
24. Nurnberger-Jr JI, Blehar MC, Kaufmann CA, York-Cooler C, Simpson SG, Harkavy-Friedman J, et al. Diagnostic interview for genetic studies. Rationale unique features, and training. NIMH Genetics Initiative *Arch Gen Psychiatry* 1994;51:849-859.
25. S.A.G.E. [2006] *Statistical Analysis for Genetic Epidemiology*, Release 5.3: <http://genepi.cwru.edu>
26. Escamilla MA, Hare E, Dassori A, Peralta JM, Ontiveros A, Nicolini H, Raventos H, Medina R, Mendoza R, Jerez A, Munoz R, Almasey LA. Schizophrenia gene locus on chromosome 17q21 in a new set of families of Mexican and central American ancestry; evidence from the NIMH genetics of schizophrenia in latino populations. International Neuro-Genetics Association of Spanish America and United States (INGASU). *Am J Psychiatry* 2009;166(2):1-8.
27. Campos-Sanchez R, Barrantes R, Silva S, Escamilla M, Ontiveros A. et al. Genetic structure analysis of three Hispanic populations from Costa Rica, Mexico, and the southwestern United States using Y-chromosome STR markers and mtDNA sequences. *Hum Biol* 2006;78:551-563.
28. Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, et al. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4(3):e1000037. doi:10.1371/journal.pgen.1000037.