**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**NEUROGÊNESE E ESQUIZOFRENIA: ESTUDO
MOLECULAR DE ASSOCIAÇÃO**

Sheila Gregório Purim

Tese de doutorado

Orientador: Emmanuel Dias Neto

SÃO PAULO

**Data do Depósito do Trabalho na SPG: 02/06/2006
(Dois de Junho de Dois Mil e Seis)**

A parte prática deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Neurociências (LIM-27) no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Para seu desenvolvimento recebemos o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) - Bolsa de doutorado, Processo: 141485/2002-7;
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) – Projeto de pesquisa, Processo: 03/07222-7
- Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (**ABADHS**)

**A conclusão deste trabalho apenas foi possível graças a colaborações
estabelecidas com os seguintes grupos:**

- Prof. Dr. Dalton Chamone, Hemocentro do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;**
 - Prof. Dr. Fabrício R. Santos – Depto. de Biologia Geral, Universidade
Federal de Minas Gerais**
 - Dr. Thomas Werge, Research Institute of Biological Psychiatry, Sct.
Hans Hospital, Roskilde, Denmark**
 - Prof. Dr. Rinaldo W. Pereira, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília**
 - Profa. Dra. Mari Sogayar, Depto de Bioquímica do Instituto de
Química da Universidade de São Paulo.**
 - Prof. Dr. José Xavier Neto, Laboratório de Cardiologia Molecular,
Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo**
-

"Aos meus queridos pais, e ao meu amor Daniel, por todo o apoio, carinho e paciência, e por estarem sempre presentes acompanhando e torcendo por mim em cada nova etapa de minha vida."

AGRADECIMENTOS

Ao Emmanuel, serei eternamente grata! Por ter me acolhido em seu laboratório, de braços abertos, desde minha iniciação científica, e por ter acreditado em mim incondicionalmente desde o início. Pela excelente orientação que sempre me deu, e por ter sempre se preocupado com meu bem-estar pessoal durante toda minha estada em seu laboratório. Pelos exemplos de atitude, iniciativa, perseverança, ânimo e otimismo. Por compartilhar sua experiência profissional e pessoal ao longo destes anos todos, pelo muito que aprendi com ele em assuntos tão variados, e pelas inúmeras oportunidades que me proporcionou, direta ou indiretamente, de melhorar enquanto pessoa, de crescer e me formar enquanto profissional, e de impulsionar grandemente o início da minha jornada pela Ciência. Considero o Emmanuel o meu maior exemplo ético e profissional e ter sido orientada por ele é para mim motivo de grande orgulho e alegria!

Ao Prof. Dr Wagner Farid Gattaz, diretor do Laboratório de Neurociências (LIM-27), não só por disponibilizar toda a infra-estrutura de seu laboratório, onde esse trabalho foi realizado, mas também pelo incentivo e oportunidades que me deu ao longo destes anos, e pela grande valorização que sempre deu ao meu trabalho.

À Elida, que desde minha iniciação científica, sempre me deu grande apoio e transmitiu ensinamentos que certamente fizeram a diferença. Pelo companheirismo e amizade ao longo de todos esses anos, por ser sempre tão solícita profissional e pessoalmente, e pela convivência tão agradável em laboratório.

À Camila e ao Fábio, pela amizade e companheirismo e divertida convivência em laboratório. Pelas inúmeras risadas, e muitas vezes gargalhadas, tão essenciais para que a rotina de laboratório fosse sempre agradável. E também pelas ajudas e discussões científicas que contribuíram para esse trabalho.

À Sandrinha, pela enorme ajuda com a coleta de amostras de pacientes e controles, e extração de DNA, pela grande amizade e alto-astral, que sempre me cativaram, e pelos inúmeros conselhos que sempre me deu. E, como não poderia deixar de citar, pelos divertidos momentos durante os cafezinhos no final da tarde.

À Carol, Heloíza e Bárbara, pela amizade e companheirismo ao longo de todos esses anos, pelas risadas e agradável convivência em grupo.

Ao Daniel e à Cintia Fridman, pelo apoio e amizade que sempre me deram, durante e após o período em que estiveram no laboratório.

À toda a equipe do LIM-27 pelo suporte, disponibilidade e ajuda.

Aos alunos de iniciação Thaís, Christian e Adriano, pela ajuda e disponibilidade.

Aos Drs. Hildeberto Tavares, Juliana Yacubian e Francisco Junger, pelo encaminhamento dos pacientes e coleta dos dados clínicos.

Ao Dr. Paulo Sallet, pela coleta dos dados de morfometria cerebral, ajuda com as análises estatísticas, pela consultoria clínica, por ser sempre tão solícito, e por todo apoio e incentivo.

Ao Dr. Rinaldo Pereira, por todo apoio e por ser sempre tão solícito. Pela ajuda com as análises estatísticas, análise multilocus, análise de haplótipos e por toda a consultoria que sempre nos deu durante todo o decorrer do projeto.

À Dra. Mari Cleide Sogayar, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório para que eu realizasse os experimentos funcionais com o promotor de *FZD3*, e pelo espírito colaborativo.

À toda a equipe do laboratório da Dra. Mari, pela amizade, companheirismo e por serem tão solícitos. À Sheila, à Rita, e ao Antero, pela enorme ajuda com os ensaios de transfecção, Western-blotting e EMSA. À Diana e ao Christian pelas inúmeras consultorias durante todo o decorrer deste trabalho. Ao Marcos, à Therri, e ao Léo, por estarem sempre à disposição para esclarecer dúvidas e ajudar quando necessário. À Fernanda Festa, que me ajudou logo no início, antes mesmo de eu ingressar neste curso de pós-graduação, através das tardes de estudo em conjunto.

Ao Dr. José Xavier Neto, do Laboratório de Cardiologia Molecular do InCor-USP, por fornecer os vetores para controle e superexpressão de AP-2.

Ao Dr. Thomas Werge, pelo espírito colaborativo e envio das amostras de DNA que foram essenciais para enriquecer esse estudo.

Ao Prof. Fabrício Santos e seus alunos Rodrigo e Simone, do Depto de Biologia Geral da UFMG, pela colaboração com as análises das amostras de primatas para o polimorfismo de *NOGO*.

À empresa Genoa Biotecnologia e ao Prof. Dr. José Eduardo Levy (Inst. de Medicina Tropical, HCFMUSP) por disponibilizarem seus aparelhos de Real-Time PCR para minhas análises, enquanto ainda não tínhamos o nosso.

Ao Dr. Dalton Chamone, diretor do Hemocentro do Hospital das Clínicas, por permitir as coletas de amostras de indivíduos controle para nosso estudo.

Ao Dr. Andrey Morgun e seu grupo, do Laboratório de Imunogenética da UNIFESP, pela ajuda com as análises multilocus.

À todos os pacientes e controles anônimos que ao participarem voluntariamente deste estudo, possibilitaram a sua realização.

PREFÁCIO

A idéia para o tema deste trabalho surgiu no início de 2002. Nosso grupo havia deixado o Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, com o intuito de colaborar com pesquisas genômicas no estudo de doenças neuropsiquiátricas no LIM27. Ao iniciarmos nossas atividades, partimos para a construção de um banco de amostras de DNA que nos permitiria investigar alguns aspectos relacionados a doenças neuropsiquiátricas. De imediato ficamos fascinados com as características clínicas e a grande importância epidemiológica da esquizofrenia. Ao fazermos uma avaliação mais ampla dos trabalhos publicados sobre esta doença, nos deparamos com alguns achados fundamentais: 1) a doença apresenta um importante componente de neurodesenvolvimento; 2) fatores genéticos têm um grande peso na predisposição ao desenvolvimento desta doença, e 3) várias regiões genômicas pareciam conter genes importantes para a esquizofrenia. Pareceu-nos interessante inserir estas três informações dentro de um mesmo contexto de pesquisa onde decidimos avaliar, de modo mais contínuo e sistemático, o efeito de alterações genéticas de maior impacto funcional, localizadas em genes associados com neurodesenvolvimento, que se encontravam mapeados em regiões genômicas relevantes para esta doença. Mais importante ainda, poderíamos fazer uma análise de um grande número de genes em um mesmo universo amostral, condizente com uma doença multifatorial e poligênica. Buscando minimizar fatores associados com estratificação étnica (de grande importância na população brasileira), e ao mesmo tempo fazendo um esforço de replicar nossos achados em outro grupo amostral não relacionado, conseguimos receber amostras da Dinamarca, usadas na tentativa de confirmar os nossos principais achados, oriundos dos estudos com amostras Brasileiras.

Ao concluirmos a análise de alterações genéticas em um gene, ou grupo de genes associados, buscamos publicar os achados com estes dados, antes da análise multilocus final. Por fim, estudamos o bloco haplotípico que contém um dos polimorfismos mais fortemente associados com a doença e buscamos caracterizar as consequências funcionais desta alteração.

ÍNDICE

1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	4
3.1. ESQUIZOFRENIA	4
3.2. ESQUIZOFRENIA E NEURODESENVOLVIMENTO.....	6
3.3. A ESQUIZOFRENIA COMO UMA DOENÇA GENÉTICA	9
3.4. BUSCA POR GENES ASSOCIADOS À EZ	10
3.5. A BUSCA DE POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS.....	15
3.5.1. SNPS.....	15
3.5.2. VARIAÇÕES DE MICROSSATÉLITES DE DNA	16
3.5.3. INDELS, INVERSÕES E POLIMORFISMOS DE NÚMERO DE CÓPIAS.....	17
3.6. GENES ENVOLVIDOS COM NEUROGÊNESE INSERIDOS NESSE ESTUDO	18
3.6.1. VIA SINALIZADORA DE WNT	18
3.6.2. VIA SINALIZADORA DE NOTCH.....	21
3.6.3. VIA DAS SEMAFORINAS.....	24
3.6.4. VIA DAS PROTOCADERINAS	25
3.6.5. FAMÍLIA GÊNICA ADAMS	28
3.6.6. MICRORNAS (MIRNAS)	28
3.6.7. FILAMINAS A E B.....	31
3.6.8. RTN4.....	32
3.6.9. BDNF	32
3.6.10. ASPM	33
3.6.11. NEFH	33
3.6.12. RAI1	33
3.6.13. SMPD1	34
3.6.14. NUDT6	34
3.6.15. PPT1.....	34
3.6.16. SIM1	34
3.6.17. ALOX12	35
3.6.18. FBXO16	35
3.6.19. SYN1	35
4. OBJETIVOS	37
4.1. OBJETIVO GERAL.....	37
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.3.1. CASOS E CONTROLES	38
4.3.2. ÉTICA.....	39

4.4.	COLETA DE DADOS DE MORFOMETRIA CEREBRAL	40
4.5.	SELEÇÃO DE GENES E POLIMORFISMOS CANDIDATOS.....	40
4.5.1.	SELEÇÃO DE GENES CANDIDADOS.....	40
4.5.2.	SELEÇÃO DE POLIMORFISMOS CANDIDATOS.	41
4.6.	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS	45
4.6.1.	GENOTIPAGEM DE SNPS	45
4.6.2.	GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITES	57
4.6.3.	ANÁLISE DE INSERÇÕES OU DELEÇÕES	59
4.7.	IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS SNPS EM MICRORNAS E GENOTIPAGEM	61
4.8.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	63
4.9.	ENSAIO DE GENE REPORTER E ANÁLISE DE CONSTITUIÇÃO HAPLOTÍPICA PARA O SNP NO PROMOTOR DE FZD3	66
4.9.1.	ENSAIO DE GENE REPORTER.....	66
4.9.1.1.	OBTENÇÃO DOS VETORES A SEREM TRANSFECTADOS:	67
4.9.1.2.	TRANSFEÇÃO E LEITURA DE ATIVIDADE DE LUCIFERASE	69
4.9.1.3.	WESTERN-BLOT.....	70
4.9.2.	DEFINIÇÃO DO BLOCO HAPLOTÍPICO DE FZD3	72
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1.	GENES E POLIMORFISMOS CANDIDATOS SELECIONADOS	74
5.2.	RESULTADOS DAS GENOTIPAGENS.....	81
5.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS ENTRE CASOS E CONTROLES	89
5.3.1.	AKT1.....	92
5.3.2.	MAP1B.....	94
5.3.3.	NUMBL	95
5.3.4.	FZD3.....	97
5.4.	ANÁLISE MULTILOCUS	105
5.4.1.	POSSÍVEL PAPEL DAS VIAS DE WNT E NOTCH NA ETIOLOGIA DA EZ	108
5.5.	CORRELAÇÃO COM DADOS DE MORFOMETRIA CEREBRAL.....	110
6.	CONCLUSÕES	113
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	115
8.	BIBLIOGRAFIA	116
9.	CURRICULUM VITAE	138

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Risco de desenvolvimento de EZ para parentes de um indivíduo com EZ.	10
FIGURA 2: Representação geral dos locos cromossômicos mais consistentemente implicados com a EZ, de acordo com estudos de ligação gênica.	12
FIGURA 3: Representação esquemática das castacas de transdução de sinal de WNT.	19
FIGURA 4: Proteínas envolvidas na via sinalizadora de NOTCH, com ênfase nos genes estudados nesse trabalho.	23
FIGURA 5. Organização do <i>cluster</i> de protocaderinas no cromossomo 5q31 (Noonan et al, 2003).	27
FIGURA 6 – A biogênese dos microRNAs.	30
FIGURA 7: Fluxograma - Etapas de avaliação dos polimorfismos de DNA incluídos no estudo.	44
FIGURA 8: Genotipagem do SNP C/A (rs1908916), no íntron 1 do gene FBXO16, através de seqüenciamento direto.	46
FIGURA 9 – Genotipagens por seqüenciamento de base única.	48
FIGURA 10: Resultado da análise por PCR-RFLP do polimorfismo de ADAMTS4, analisado em gel de poliacrilamida 8% corado com prata.	50
FIGURA 11: Resultado da análise por PCR-RFLP do polimorfismo de FLNB, analisado em gel de poliacrilamida 8%.	50
FIGURA 12: Análise por PCR-RFLP do polimorfismo de <i>FZD3</i> , analisado em gel de agarose 1,5%.	51
FIGURA 13 – Genotipagem por PCR em tempo Real.	56
FIGURA 14- Genotipagem do microsatélite CAG de RAI1.	58
FIGURA 15: Produtos de PCR de NOGO analisados em gel de poliacrilamida 12% corado com Nitrato de Prata.	60
FIGURA 16: Produtos de PCR para análise da deleção de protocaderinas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.	60
FIGURA 17: Alinhamento de seqüências obtidas durante análise de polimorfismos em região genômica contendo o microRNA MIR-211, através do software SIP.	62
FIGURA 18. Mapas de alguns dos plasmídeos utilizados nos ensaios de transfecção para análise de atividade do promotor de <i>FZD3</i>	68
FIGURA 19: SNPs selecionados e sua localização, para estudo de constituição de Blocos haplotípicos envolvendo o SNP no promotor de <i>FZD3</i>	72

FIGURA 20. Possível sequência promotora de FZD3, predita pelo programa PROSCAN.....	100
FIGURA 21. Comparação entre as atividades de luciferase observadas após transfecção de células 293T com construções de pGL3 (Promega) contendo os promotores de FZD3 com o alelo C (C) ou alelo T (T).....	101
FIGURA 22. Análise dos efeitos da superexpressão de AP-2 sobre a atividade do promotor de FZD3.....	102
FIGURA 23. Resultado de análise por Western Blot para confirmar a superexpressão de AP-2 em culturas da linhagem 293T transfectadas com diferentes quantidades da construção RSV-AP-2.....	102
FIGURA 24. Comparação entre as atividades de luciferase observadas após transfecção de células SH-SY5Y com construções de pGL3 (Promega) contendo os promotores de FZD3 com o alelo C (C) ou alelo T (T).....	103
FIGURA 25. Resultado da análise multilocus realizada através do uso do método "Set Association".....	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Principais alterações anatômicas encontradas em cérebros de pacientes esquizofrênicos.....	7
TABELA 2: Principais alterações neuropatológicas encontradas em cérebros de pacientes esquizofrênicos.....	8
TABELA 3: Genes mais extensivamente estudados em esquizofrenia	14
TABELA 4: Genes avaliados por seqüenciamento direto.....	45
TABELA 5: Genes avaliados por Seqüenciamento de Base Única.....	47
TABELA 6: Genes avaliados por PCR/RFLP	49
TABELA 7: Genes avaliados por PCR em tempo real (Assays by Design - Applied Biosystems)	54
TABELA 8: Genes avaliados por PCR em tempo real (Assays on Demand - Applied Biosystems)	55
TABELA 9: Genes avaliados por Análise de Tamanho de Fragmento.....	57
TABELA 10: Iniciadores utilizados para amplificação dos miRNAs por PCR.	61
TABELA 11. Descrição dos SNPs identificados após análise por reseqüenciamento dos fragmentos contendo os miRNAs de interesse.	63
TABELA 12: Perfil de digestão obtido para a análise dos polimorfismos de MIR-206 e MIR-211	63
TABELA 13: Iniciadores utilizados para amplificar os SNPs selecionados para o estudo de haplótipos de <i>FZD3</i>	73
TABELA 14. Lista de genes candidatos selecionados (1/5)	76
TABELA 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microsatélites analisados (1/7).	82
TABELA 16. Frequências da inserção CAA na porção 3'UTR do gene <i>NOGO</i> em controles e pacientes esquizofrênicos, de acordo com o <i>background</i> étnico.	91
TABELA 17: Frequências alélicas e genotípicas para o SNP no intron 5 de <i>AKT1</i> , nos grupos de controles e pacientes esquizofrênicos dinamarqueses.	93
TABELA 18: Frequências alélicas e genotípicas para o SNP G/A (VAL468ILE) de <i>MAP1B</i> , nos grupos de controles e pacientes dinamarqueses.	94
TABELA 19: Frequências Genotípicas e alélicas para o polimorfismo CAG(Q)n de <i>NUMBL</i> em grupos controle e esquizofrênicos do Brasil e da Dinamarca.	96
TABELA 20: Frequências Genotípicas e Alélicas para o SNP C-68T de <i>FZD3</i> nas populações Brasileira e Dinamarquesa.	98
TABELA 21: Associações observadas entre o polimorfismo de <i>RELN</i> e as medidas ventriculares cerebrais.	110
TABELA 22: Associações observadas entre o SNP de <i>PCDH12</i> e as medidas de Índice de Girificação Cerebral.	111

ABREVIATURAS

ADAM	"A Disintegrin And Metalloprotease domain"
ADAM15	"A disintegrin and Metalloproteinase Domain 15 (metargidin) "
ADAM22	"A disintegrin and Metalloproteinase Domain 22 "
ADAM28	"A disintegrin and Metalloproteinase Domain 28 "
ADAMTS4	"A disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, 4"
AKT1	"v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1"
ALOX-12	"arachidonate 12-lipoxygenase "
ANOVA	"Analysis of Variance"
AP-2	"Activator protein 2"
APC	"adenomatosis polyposis coli "
ASCL1	"Achaete-scute complex-like 1"
ASPM	"asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>)"
AXIN	"axin 1"
BDNF	"Brain-Derived Neurotrophic Factor"
CAIG	coeficiente de assimetria do índice de girificação
CAMK2	"Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II "
CBF1	"C-Repeat Binding Factor 1"
CGAP	"Cancer Genome Anatomy Project"
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CMV	Citomegalovírus
COMT	"catechol-O-methyltransferase"
DA	Doença de Alzheimer
DAO	"D-amino-acid oxidase "
DAOA	"D-amino acid oxidase activator "
ddNTP	Dideoxynucleotides tri-fosfato
DISC1 / DISC2	"Disrupted in Schizophrenia" 1 e 2
DL	desequilíbrio de ligação
DLL1	"Delta-like 1 (<i>Drosophila</i>)"
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSV	"Disheveled"
DTNBP1	"dystrobrevin binding protein 1"
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EMSA	"Electrophoretic Mobility Shift Assay"
EST	"Expressed Sequence Tag"
EZ	Esquizofrenia
FBXO16	"F-box protein 16"
FCS	"Fetal Calf Serum"; Soro Fetal Bovino
FDR	"False Discovery Rate"
FGF2	"Fibroblast Growth Factor 2"
FLNA	"Filamin A"
FLNB	"filamin B, beta "
FYN	"FYN oncogene related to SRC, FGR, YES "
FZD3	"frizzled homolog 3 (<i>Drosophila</i>)"
GLM	"General Linear Model"
GSK3β	"glycogen synthase kinase 3 beta "
HES1	"hairy and enhancer of split 1"
HEYL	"heiry/enhancer-of-split related"
HLH	"helix-loop-helix"
HV	Heterotopia Ventricular
IG	Índice de Girificação
IGD	Índice de Girificação direito
IGE	Índice de Girificação esquerdo

INDEL	Inserção/deleção
IRM	Imagem de Ressonância Magnética
JAG2	"Jagged 2"
Kb	Kilobase
LB	"Luria- Bertani Medium"
M	Molar
mAmp	mili Ampere
MAP1B	"microtubule-associated protein 1B"
Mb	Megabase
MCPH	Microcefalia Primária
MGB	"Minor Groove Binder"
MIR-206	"microRNA 206"
MIR-210	"microRNA 210"
MIR-211	"microRNA 211"
MIR-266	"microRNA 266"
MIR-320	"microRNA 320"
miRNA	MicroRNA
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NEFH	"Neurofilament, heavy polypeptide 200kDA"
NETO1	"neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1"
NEUROD2	"Neurogenic Differentiation 2"
NIH	"National Institute of Health"
NOTCH2	"Notch homolog 2 (Drosophila)"
NOTCH3	"Notch homolog 3 (Drosophila)"
NRG1	"Neuregulin 1"
NRP1	"Neuropilin 1"
nsSNP	SNP não sinônimo
NUDT6	"nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type "
NUMB	"Numb Homolog (Drosophila)"
NUMBL	"Numb Homolog (Drosophila)-Like"
PAGE	"Polyacrilamide electrophoresis gel"; eletroforese em gel de poliacrilamida
PANSS	"Positive and Negative Syndrome Scale"
pb	pares de base
PBSA	"Phosphate Buffered Saline"
PCDH12	"Protocadherin 12"
PCDH3a	"Protocadherin alpha 3"
PCDHB11	"Protocadherin Beta 11"
PCP	"Planar Cell Polarity"; Polaridade celular planar
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PKC	"protein kinase C"
PLB	"Passive lysis Buffer"
PMSF	"Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride"
POLYPHEN	"Polymorphism Phenotyping"
PPT1	"palmitoyl-protein thioesterase 1"
PRODH	"proline dehydrogenase (oxidase) 1"
qsp	quantidade suficiente para
RAI1	"Retinoic Acid Induced 1"
RELN	"Reelin"
RFLP	"Restriction Fragment Length Polymorphism"
RGS4	"regulator of G-protein signalling 4 "
RISC	"RNA-induced Silencing Complex"
RL	Renilla Luciferase
RNA	Ácido Ribonucleico
RNaseIII	ribonuclease III
RPM	Rotações por minuto

RSV	Rous sarcoma vírus
RTN4	"Reticulon 4"
RVC	Razão ventrículo:cérebro
SAGE	"Serial analysis of gene expression"; análise serial de expressão gênica
SDS	"Sodium Dodecyl Sulfate"
SEMA3D	"Semaphorin 3D"
SEMA6C	"Semaphorin 6C"
SIFT	"Sorting Intolerant From Tolerant"
SIM1	"single-minded homolog 1"
SIP	Sistema de Identificação de Polimorfismos
SMPD1	"Sphingomyelin Phosphodiesterase 1"
SMS	Síndrome de Smith-Magenis
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	"Single Nucleotide Polymorphism"; Polimorfismo de Base Única
SYN1	"synapsin I"
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tampão Tris-salina-Tween
uM	Micromolar
UTR	"Untranslated region"; região não traduzida do mRNA
WIF1	"WNT Inhibitory Factor 1"
WNT	"wingless"
WNT7A	"wingless-type MMTV integration site family, member 7A"

FERRAMENTAS E SOFTWARES UTILIZADOS PARA ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA NESTE ESTUDO

BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLAT	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start
CHROMAS	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
EHW	http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl
GENE	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene
GENE ONTOLOGY	http://www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi
GRAPH PAD	http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm
HAPLOVIEW	http://www.broad.mit.edu/personal/jcbarret/haplo/download.php
HAPMAP	http://www.hapmap.org/index.html.en
MIRBASE	http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&itool=toolbar
PANTHER	http://www.pantherdb.org/
POLYPHEN	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/
PRIMER 3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
PROSCAN	http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan
PUBMED	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed
REPEAT MASKER	http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker
SAGE	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/
SIFT	http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html
SIP	Sistema de identificacao de polimorfismos desenvolvido em parceria com Scylla Bioinformatica (http://www.scylla.com.br)
SUMSTAT	http://linkage.rockefeller.edu/ott/sumstat.html
SWISS PROT	http://www.expasy.ch/sprot/
UNIGENE	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene

1. RESUMO

A esquizofrenia (EZ) é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, afetando cerca de 1% da população ao redor do mundo, sendo caracterizada pela presença de delírios, alucinações, disfunção cognitiva e apatia, entre outros. Dentre as hipóteses que procuram explicar as bases biológicas da EZ, a que tem tido um maior embasamento e credibilidade é a Hipótese do Neurodesenvolvimento, que afirma que a EZ é uma desordem de desenvolvimento do sistema nervoso central, originada nos estágios intermediários da vida intra-uterina. Ao mesmo tempo o envolvimento de componentes genéticos em EZ é fortemente sugerido, principalmente por estudos envolvendo gêmeos e famílias.

Uma série de estudos de ligação, realizados com famílias contendo indivíduos afetados, têm apontado para diferentes locos cromossômicos que devem estar associados à EZ. Enquanto tais estudos sugerem locos candidatos, a descoberta dos genes envolvidos com a doença, mapeados nestes locos, trará grande progresso ao estudo da genética da EZ.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar a possível associação entre polimorfismos em genes envolvidos com neurodesenvolvimento, mapeados em locos importantes sugeridos por estudos de ligação, e a EZ.

Após uma série de análises *in silico* e validações *in vitro*, um total de 41 polimorfismos, mapeados em 39 genes candidatos, foram selecionados neste estudo. Estes polimorfismos foram genotipados em amostras de DNA, obtidas de 200 pacientes esquizofrênicos e 200 controles da população Brasileira.

Uma análise individual das frequências genotípicas e alélicas de cada polimorfismo identificou quatro polimorfismos como associados à EZ, mapeados nos genes *AKT1*, *MAP1B*, *FZD3*, e *NUMBL*. Em seguida, esses quatro polimorfismos foram analisados em um segundo *set* amostral, composto por amostras de DNA de casos e controles Dinamarqueses, de forma a tentar replicar os achados com a amostra Brasileira. Para dois destes polimorfismos (*NUMBL* e *FZD3*) observamos uma tendência de associação na amostra dinamarquesa, o que reforça o possível envolvimento destes polimorfismos com a EZ. Avançamos na caracterização haplotípica do SNP de *FZD3* em amostras do Brasil e da Dinamarca e também investigamos as consequências funcionais deste SNP, utilizando ensaios de gene-repórter em duas diferentes linhagens celulares.

Por fim, uma análise *multilocus* preliminar, utilizando o método *set association*, foi realizada para os marcadores bialélicos por nós avaliados (SNPs e indels), a fim de

identificar a existência de um set de genes que estivessem contribuindo em conjunto para a etiologia da EZ. Os resultados dessa análise apontaram para o efeito aditivo de 5 genes para a etiologia da EZ: *FZD3*, *AKT1*, *MAP1B*, *SEMA6C* e *ADAM28*.

Os genes encontrados em nosso estudo como associados à EZ, tanto pela análise individual quanto pela análise *multilocus*, se encontram envolvidos direta ou indiretamente com as vias sinalizadoras de WNT e NOTCH, sugerindo o envolvimento destas duas vias sinalizadoras para a etiologia da doença.

2. ABSTRACT

Schizophrenia (SZ) is one of the most prevalent neuropsychiatry disorders, affecting about 1% of the world's population. SZ is characterized by the presence of delirium, hallucinations, cognitive dysfunction, apathy, etc. Among the hypotheses that try to explain the biological basis of SZ, the Neurodevelopment Hypothesis is one of the most accepted. This hypothesis states that SZ is a neurodevelopment disorder, originated during intermediate stages of the intrauterine life. On the other hand, the involvement of genetic components in the etiology of SZ has been suggested by twin and family studies.

A series of linkage studies pointed different genomic loci associated with the disease. While these studies suggest candidate loci, the determination of which genes/genetic alterations inside these loci are involved with the disease will bring great progress to the study of SZ genetics.

The objective of this study was to analyze the possible associations between DNA polymorphisms in genes related to neurodevelopment and mapped to genomic loci previously associated with SZ.

After a series of *in silico* and experimental analysis, a total of 41 polymorphisms, mapped to 39 candidate genes, were selected for analysis. These polymorphisms were genotyped in DNA samples obtained for 200 SZ patients and paired 200 controls from the Brazilian population.

An individual analysis of the genotypic and allelic frequencies of each polymorphism identified 4 polymorphisms as associated with SZ, mapped in the *AKT1*, *MAP1B*, *FZD3*, and *NUMBL* genes. These four polymorphisms were then analyzed in a second set of samples, derived from Danish cases and controls. A trend for association was observed for two of these polymorphisms (*FZD3* and *NUMBL*), reinforcing their putative association with EZ. Haplotipic analysis was performed for the *FZD3* SNP and its functional consequences were confirmed in two different cell lines by using gene reporter assays.

Finally, multilocus analysis, performed by the use of the set association method, pointed to an additive effect of 5 genes contributing to the etiology of SZ: *FZD3*, *AKT1*, *MAP1B*, *SEMA6C* e *ADAM28*.

All the genes pointed by our study as associated with SZ, by both the individual and the multilocus analysis, are directly or indirectly involved in the WNT and NOTCH pathways, which strongly suggests the involvement of these pathways in the etiology of SZ.

3. INTRODUÇÃO

3.1. ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia (EZ) é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, afetando cerca de 1% da população ao redor do mundo (Kasai et al., 2002; Prasad et al., 2002). Além de gerar enormes gastos públicos (US\$1.2 trilhões somente nos Estados Unidos; (Uhl & Grow, 2004), seu impacto também é muito grande sobre os familiares de indivíduos afetados (Johnson, 1990; Winefield & Harvey, 1993).

A EZ geralmente se manifesta entre os 16 e 30 anos de idade (Austin, 2005), e é caracterizada por três principais tipos de sintomas: psicose, identificada clinicamente pela presença de delírios (crença fixa em idéias que na realidade são falsas), alucinações (ocorrência de percepção sensorial na ausência de estímulo externo que possa causá-la) e comportamento bizarro (comportamento de caráter estranho, fantástico, impróprio ou mesmo absurdo para os padrões comportamentais socialmente observados); disfunção cognitiva, ou seja, problemas relacionados à capacidade de atenção, aprendizado, memória, concentração, pensamento abstrato e solução de problemas; e sintomas negativos, denominados desta forma por representarem a falta de um comportamento normalmente presente na população em geral, tais como apatia (falta de motivação), pobreza no diálogo, anedonia (quando o indivíduo não demonstra afeto ou prazer ao realizar atividades das quais ele geralmente gostava), e afetamento embotado (ausência de resposta emocional ou afetiva apropriada ao conteúdo do pensamento ou assunto abordado).

Conforme o predomínio de um ou outro sintoma, a EZ é classificada em diferentes subtipos:

- **Catatônica:** caracterizada por alteração na psicomotricidade: rigidez, excitação, negativismo e posturas bizarras;
- **Desorganizada:** conhecida anteriormente por hebefrênica, caracterizada por incoerência, desagregação do pensamento e da conduta, afeto embotado;
- **Paranóide:** marcada pelos delírios e pelas alucinações auditivas. As características associadas são ansiedade, violência e alterações das interações pessoais;
- **Residual:** História de episódio esquizofrênico. Estão presentes sinais negativos da doença: afastamento social, comportamento excêntrico, inadequação afetiva, pensamento ilógico.

- **Indiferenciada:** com sintomas que não podem ser classificados nas categorias anteriores, ou quando preenchem simultaneamente os critérios para mais de um tipo.

Existem diferentes hipóteses que procuram esclarecer as bases biológicas da origem da EZ. Dentre elas podemos destacar:

- **Hipóteses Dopaminérgica, Serotoninérgica e Glutamatérgica:** Essas hipóteses surgiram basicamente por associações entre tratamentos com drogas agonistas ou antagonistas de receptores de dopamina, serotonina ou glutamato, que se mostravam eficazes no tratamento da EZ (ex: haloperidol, Clozapina), ou drogas ilícitas que pioravam ou mimetizavam os sintomas da doença, fornecendo indícios de uma possível hiper ou hipoatividade nessas vias (Bruno & Allegranza, 1965; Creese et al., 1976; Seeman et al., 1976; Carlson, 1988; Meltzer, 1995; Baranano et al., 2001; Goff & Coyle, 2001). Entretanto, os achados referentes a níveis desses neurotransmissores e seus receptores em cérebros *post mortem* de indivíduos afetados não têm mostrado um comportamento constante entre os indivíduos afetados (Arora & Meltzer, 1991; Zakzanis & Hansen, 1998; Law & Deakin, 2001; Nudmamud & Reynolds, 2001; Prasad et al., 2002; Scarr et al., 2005) e apesar de haver uma série de estudos de associação feitos com genes codificadores destes receptores (Kohn et al., 1997; Mihara et al., 2000; Ronai et al., 2001; Zhang et al., 2004a; Duan et al., 2005; Pae et al., 2005; Zhang et al., 2005; Shibata et al., 2006), os resultados têm sido contraditórios e pouco reprodutíveis. Além disso, é difícil extrapolar do mecanismo de ação de um agente terapêutico para processos fisiopatológicos, podendo essa hipótese estar sendo baseada erroneamente na ação de fármacos que na verdade estariam apenas produzindo alterações secundárias que poderiam compensar os distúrbios primariamente induzidos pela doença (Graeff, 1997; Sawa & Snyder, 2002).
- **Hipótese Sináptica:** Diversos estudos demonstram que a EZ é uma doença caracterizada por alterações que resultam em menor neurotransmissão e conectividade neuronal (Selemon & Goldman-Rakic, 1999; Lewis & Gonzalez-Burgos, 2000). Estudos de imagem funcional revelaram padrões anormais de ativação e, mais recentemente, alterações na transmissão sináptica em cérebro de pacientes (Kegeles et al., 1998). Devido a essas evidências, acredita-se que alterações na transmissão sináptica e conectividade neuronal estejam entre os principais fatores que causam a EZ (Frankle et al., 2003).

- **Hipótese do neurodesenvolvimento:** Amplamente embasada por uma série de estudos, essa é a hipótese que têm tido maior credibilidade entre os estudiosos e será discutida em maiores detalhes adiante.

3.2. ESQUIZOFRENIA E NEURODESENVOLVIMENTO

Estudos clínicos recentes, técnicas avançadas de tomografia computacional e ressonância magnética, têm proporcionado evidências consistentes de que a EZ é uma desordem de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Harrison, 1999; Bray & Owen, 2001; Lawrie et al., 2001; Kasai et al., 2002; Kozlovsky et al., 2002; Sawa & Snyder, 2002), e com base nesses achados foi proposta a chamada Hipótese do Neurodesenvolvimento. Um modelo mais específico e consistente dessa hipótese afirma que a patologia se origina nos estágios intermediários da vida intra-uterina, durante os quais, interações entre alterações genéticas e ambientais influenciariam negativa e sutilmente a forma como as células nervosas se posicionam, diferenciam, e formam seus dendritos e conexões sinápticas (Bloom, 1993; Murray, 1994). Do ponto de vista clínico, estes pequenos distúrbios no neurodesenvolvimento são praticamente silenciosos até o final da adolescência, quando processos de maturação do SNC poderiam desencadear o surgimento dos sintomas da EZ (O'Connell et al., 1997; McGrath et al., 2003).

Através de estudos de imagem, têm-se observado uma série de alterações morfológicas nos cérebros de pacientes com EZ quando comparados aos de indivíduos controle pareados por idade, sexo e escolaridade. Essas alterações morfológicas incluem alargamento dos ventrículos cerebrais, redução do córtex cerebral e hipocampo, e redução do índice de girificação cerebral (tabela 1). Essas áreas cerebrais participam na regulação emocional e funções cognitivas, aspectos que se encontram muito prejudicados na EZ (Sawa & Snyder, 2002). Além disso, há evidências de que cérebros de pacientes esquizofrênicos são aproximadamente 5-8% mais leves e 4% menores do que os de controles. Essas e outras alterações morfológicas cerebrais comuns na EZ estão detalhadas na tabela 1. Algumas das regiões afetadas têm seu desenvolvimento intimamente associado ao primeiro trimestre de gestação, o que leva à hipótese de que é nesse estágio do desenvolvimento que a doença se origina. Além disso, não é observado um agravamento dessas alterações cerebrais ao longo da vida, nem é detectada a presença de gliose (densa rede fibrosa formada pela proliferação de células da glia, ocorrendo como uma reação "cicatricial" a um processo neudegenerativo), o que

reduz a possibilidade de a doença ser causada por neurodegeneração, reforçando a hipótese do neurodesenvolvimento (Woods, 1998; Wood et al., 2001; Harrison & Weinberger, 2005).

Tabela 1: Principais alterações anatômicas encontradas em cérebros de pacientes esquizofrênicos.

Área Cerebral	Alteração Encontrada	Referências
Ventrículos	Aumento de volume. A relação volumétrica ventrículo:cérebro encontra-se 20-75% maior em pacientes.	(Reveley et al., 1982; Raz & Raz, 1990; Suddath et al., 1990; Daniel et al., 1991; Van Horn & McManus, 1992; Lawrie & Abukmeil, 1998; Galderisi et al., 2000; Vita et al., 2000; Lawrie et al., 2001)
Cérebro	Redução de volume. Assimetria entre os hemisférios cerebrais.	(Honer et al., 1994; Ward et al., 1996; Lawrie & Abukmeil, 1998; Powchik et al., 1998; Sharma et al., 1998; Silverman et al., 1998; Gaser et al., 1999; Sallet et al., 2003b)
Lobo Temporal	Redução de volume (~8%).	(Nelson et al., 1998)
Hipocampo	Redução de volume (4-12%).	(Falkai & Bogerts, 1986; Bogerts et al., 1990; Noga et al., 1996; Zaidel et al., 1997; Csernansky et al., 1998; Nelson et al., 1998; Velakoulis et al., 1999; Lawrie et al., 2001)
Amígdala	Redução de volume (4-12%).	(Nelson et al., 1998)
Cortex Cerebral	Redução de volume.	(Noga et al., 1996; Lawrie & Abukmeil, 1998; Zipursky et al., 1998; Gur et al., 2000; Hirayasu et al., 2001; Ananth et al., 2002)
Tálamo	Redução de volume.	(Andreasen et al., 1994; Buchsbaum et al., 1996)
Índice de Girificação	Redução nos dobramentos corticais.	(Sallet et al., 2003a; White et al., 2003; Harris et al., 2004; Jou et al., 2005)

Estudos neuropatológicos mostram também que existem anomalias morfológicas, atrofia e perda neuronal, além de compactação celular em várias regiões límbicas, particularmente aquelas localizadas no lobo temporal, tais como o giro parahipocampal, a formação hipocampal e a amígdala. Estas alterações predominam no hemisfério esquerdo dos cérebros de pacientes esquizofrênicos, o que leva a acreditar que a EZ possa ser resultado de uma lateralização anormal da função cerebral (Crow, 2000). As alterações neuropatológicas mais marcantes estão relacionadas na tabela 2.

Tabela 2: Principais alterações neuropatológicas encontradas em cérebros de pacientes esquizofrênicos.

Aspecto Analisado	Alteração Encontrada	Referências
Morfologia neuronal	Redução de tamanho. Desarranjo dos neurônios. Anomalias citoarquitônicas e morfológicas. Alterações na densidade neuronal	(Falkai & Bogerts, 1986; Jakob & Beckmann, 1986; Jeste & Lohr, 1989; Arnold et al., 1991; Selemon et al., 1995; Krimer et al., 1997; Bernstein et al., 1998; Danos et al., 1998; Tran et al., 1998)
Sinapses	Diminuição de marcadores de sinapses. Diminuição de sinapses axo-dendríticas	(Aganova & Uranova, 1992; Browning et al., 1993; Eastwood et al., 1995; Eastwood & Harrison, 1995; Goldsmith & Joyce, 1995; Young et al., 1998)
Dendritos	Redução de tamanho.	(Roberts et al., 1996; Garey et al., 1998)
Axônios	Aumento da densidade de axônios com orientação vertical nos lobos frontal e temporal.	(Benes et al., 1987)

Além dos achados neuroanatômicos e neuropatológicos, encontrados em cérebros de indivíduos adultos, outras evidências indicam fortemente que essas alterações tenham ocorrido nos estágios intermediários da vida intra-uterina. Diversos estudos epidemiológicos (McGrath et al., 1994) demonstraram uma forte correlação entre complicações durante a gravidez ou parto, ou exposição a fatores de risco tais como agentes infecciosos, em estágios precoces da vida, com uma maior suscetibilidade à EZ. Alguns defeitos de desenvolvimento, tais como pequenas anomalias físicas (encontradas na área cefálica, mãos e pés) e alterações dérmicas (ex: alterações nas linhas existentes nas palmas das mãos), são considerados como marcadores externos da EZ (Ismail et al., 2000). A associação entre estes defeitos e a neurogênese é baseada no fato de, tanto o SNC quanto a pele, serem derivados do mesmo tecido primordial, a ectoderme (Lobato et al., 2001). Adicionalmente, estudos longitudinais fornecem evidências robustas de que indivíduos esquizofrênicos, durante a infância, já apresentavam pequenos distúrbios ou anomalias motoras, neurocognitivas e comportamentais (Tarrant & Jones, 1999; Cannon et al., 2001).

Acredita-se que aproximadamente 30% dos nossos genes sejam expressos no cérebro, sendo que diversos genes são ativados e desativados durante diferentes fases do desenvolvimento cerebral (Kozlovsky et al., 2002). Sendo assim, existe uma enorme quantidade de genes candidatos em potencial que podem apresentar pequenas anomalias funcionais ou sutis alterações em seus níveis de expressão durante esse período, e que podem contribuir para o surgimento de uma patologia tal como a EZ. Entretanto, dada a complexidade dessa doença, a descoberta de quais e quantos são os genes envolvidos é ainda um grande desafio (Tsuang, 2000). Não se sabe ao certo quantas vias sinalizadoras estariam envolvidas e quantos genes pertencentes a uma mesma via estariam contribuindo, e até mesmo se o grau de

importância de cada um deles para a doença seria o mesmo. Na presença de fatores externos predisponentes, as alterações de um gene podem ter diferentes graus de importância, de acordo com suas conseqüências funcionais e diante da presença acumulativa de outras alterações na mesma via funcional. Somando-se a isto, temos limitações sérias para um estudo aprofundado da EZ: a dificuldade de obtenção de tecido doente (cérebro fresco de pacientes), a impossibilidade de linhagens celulares neuronais e a inexistência de modelos animais da doença. Por todas estas peculiaridades, a compreensão das bases biológicas da EZ talvez seja um dos mais difíceis e fascinantes desafios da pesquisa médica.

3.3. A ESQUIZOFRENIA COMO UMA DOENÇA GENÉTICA

As doenças psiquiátricas, assim como a maioria das doenças mais importantes da atualidade, são de origem complexa e não podem ser explicadas por um único componente genético ou ambiental (Sawa & Snyder, 2002).

O envolvimento de componentes genéticos em EZ é fortemente sugerido, principalmente por estudos envolvendo gêmeos e famílias (Gottesman & Bertelsen, 1989; Kringlen & Cramer, 1989; Kendler et al., 1994; Cannon et al., 1998; Cardno & Gottesman, 2000; Lawrie et al., 2001; Cardno et al., 2002), que apontam para a EZ como uma desordem de bases genéticas, envolvendo complexos mecanismos de herança.

Comparadas às outras doenças complexas, como por exemplo, asma, diabetes, hipertensão e esclerose múltipla, as doenças mentais têm uma herdabilidade relativamente alta (Chakravarti & Little, 2003). De fato, apesar de uma proporção substancial de indivíduos diagnosticados com EZ não possuir histórico familiar de psicose, o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de doença mental é a presença de histórico familiar positivo (Gottesman, 1991; Merikangas & Risch, 2003), como pode ser visto na figura 1.

Figura 1: Risco de desenvolvimento de EZ para parentes de indivíduos com EZ.

Adaptado de Gottesman, 1991.

Segundo estudos, a herdabilidade estimada para a EZ se encontra em torno de 60% a 85% (Merikangas & Risch, 2003), sendo que os componentes que perfazem os 15%-40% restantes constituem-se por fatores ambientais, tais como: complicações obstétricas, estresse, uso de drogas, imigração, histórico de trauma, luto materno durante a gestação, entre outros (Sullivan, 2005). Diversos estudos de análise de segregação gênica apontam para um modelo de herança não Mendeliana na EZ. Estudos genético-epidemiológicos sugerem um modelo de herança poligênica, no qual diversos genes de pequeno efeito (é provável que cada gene seja responsável por um risco menor que 3X de um indivíduo desenvolver a doença) contribuem para um aumento no risco e susceptibilidade à doença (McGue & Gottesman, 1989; Cannon et al., 2002; Owen, 2005).

3.4. BUSCA POR GENES ASSOCIADOS À EZ

Para doenças complexas, como a EZ, uma série de métodos têm sido utilizados, a fim de identificar genes associados, tais como:

- Estudo de anomalias cromossômicas (translocações, deleções, etc.) presentes em indivíduos afetados, que permitem a identificação de locos onde devem haver genes envolvidos com a doença;
- Estudos de expressão gênica, que fazem uma análise global da expressão gênica em tecidos de indivíduos afetados e controles saudáveis. O maior empecilho para esse tipo de estudo, no caso das doenças psiquiátricas, é a obtenção de tecido cerebral para análise.
- Estudos de associação, que analisam a frequência de determinados polimorfismos genéticos na população. Esses estudos requerem marcadores

que estejam próximos da variante que confere suscetibilidade à doença, ou que sejam eles próprios as variantes causais.

Além destes citados acima, um dos métodos que tem sido amplamente utilizado, procurando identificar locos cromossômicos associados, é o Estudo de Ligação. Esse estudo baseia-se na premissa de que, se um marcador genético em um cromossomo estiver a uma distância curta de uma alteração gênica envolvida na etiologia da doença, deverá existir ligação genômica entre eles. Deste modo, ambos são herdados em conjunto, estando dentro do mesmo bloco haplotípico. Estudos de ligação utilizam marcadores polimórficos e suas coordenadas genômicas correspondentes para mapear locos associados à doença. Os polimorfismos do tipo microssatélite têm se mostrado informativos e fáceis de serem genotipados para esse fim. Recentemente plataformas contendo oligonucleotídeos que permitem a genotipagem de altas densidades de SNPs (polimorfismos de base única, do inglês: Single Nucleotide Polymorphisms; ex. os chips de SNPs da empresa Affymetrix que permitem a genotipagem simultânea de até 500.000 SNPs) foram desenvolvidas e permitem a mesma aplicação, com um grau muito maior de precisão. A análise desses polimorfismos em amostras de famílias contendo indivíduos afetados permite que seja feita uma análise da transmissão preferencial de determinados alelos de alguns desses marcadores. Deste modo, é possível determinar blocos de marcadores que segregam em conjunto, e assim identificar locos cromossômicos associados. Estes blocos podem ser grandes e podem conter um grande número de genes ou de regiões regulatórias. Assim, enquanto tais estudos permitem evidenciar a associação de algumas regiões genômicas com a doença, os mesmos não trazem evidências conclusivas de genes candidatos (Mowry & Nancarrow, 2001), sendo necessários estudos mais aprofundados e detalhados nas regiões selecionadas.

Através dos diversos estudos de ligação realizados até o momento, mais de 10 diferentes locos cromossômicos já foram relacionados à EZ (Mirnics et al., 2001). Alguns dos mais relevantes, comprovados por um maior número de estudos, estão localizados nos braços cromossômicos 1q, 2p, 5q, 6p, 6q, 8p, 10p, 20q, 17p e 22q (Brzustowicz et al., 2000; Freedman et al., 2001; Gurling et al., 2001; DeLisi et al., 2002; Mimmack et al., 2002; Straub et al., 2002; Lerer et al., 2003; Lewis et al., 2003; Ekelund et al., 2004; Sklar et al., 2004). Os principais locos relacionados com a EZ são indicados na figura 2 a seguir:

Figura 2: Representação geral dos locos cromossômicos mais consistentemente implicados com a EZ, de acordo com estudos de ligação gênica.

Até o momento, alguns estudos focando esses locos apontam para uma série de genes que devem estar envolvidos com a EZ. Entretanto, esse estudos se deparam com um baixo índice de replicação havendo ainda uma carência de novos estudos para a determinação mais precisa das regiões genômicas envolvidas com a EZ. Alguns dos genes mapeados nas regiões mais constantemente associadas com a EZ são listados na tabela 3.

Se por um lado sabemos que o número de genes possivelmente envolvidos tende a ser grande, o nível de interação entre eles e a contribuição de cada um para a suscetibilidade à doença são dados ainda desconhecidos (Mowry & Nancarrow, 2001). A descoberta de genes envolvidos com a suscetibilidade à EZ deverá contribuir para o conhecimento da doença, com prováveis implicações em seu prognóstico e tratamento.

Enquanto diferentes estudos de ligação estão começando a convergir para as mesmas regiões cromossômicas, os dados do Projeto Genoma Humano já permitem dizer com precisão quais genes estão mapeados nestas regiões. Além disto, outros

projetos, tais como o Projeto Genoma do Câncer Humano (Instituto Ludwig/FAPESP), e o Cancer Genome Anatomy Project (CGAP, NCI), permitem determinar novos transcritos existentes nestas regiões. O estudo de dados gerados por estes e outros projetos, permite mapear a expressão dos genes em tecidos de interesse, além de possibilitar a análise de variações encontradas nestes genes, tais como diferentes formas de *splicing*, poliadenilação alternativa e polimorfismos de DNA. A conjunção desta grande quantidade de informações nos apresenta um quadro complexo, porém otimista, permitindo a possibilidade de identificação e associação de alguns genes, mesmo os de efeito moderado.

Tabela 3: Genes mais extensivamente estudados em esquizofrenia

Gene (Codigo de acesso no banco de dados "Entrez Gene")	Mapeamento	Atividade observada	Achados	Referências
DTNBP1 (84062)	6p22.3	Biogênese de organelas associadas ao lisossomo. Localizada em terminais pré-sinápticos de neurônios glutamatérgicos	Associação positiva encontrada para populações da Alemanha, Inglaterra, Irlanda e Bulgária. Alguns estudos subsequentes não conseguiram replicar esses achados.	(Morris et al., 2003; Schwab et al., 2003; Van Den Bogaert et al., 2003; Kirov et al., 2004; Williams et al., 2004a)
NRG1 (3084)	8p21-p12	Através da interação com receptores ERBB, induz a diferenciação de células neuronais e gliais	Enquanto alguns estudos encontraram associação positiva, em populações da Escócia, Islandia e Inglaterra. Outros não conseguiram replicar os achados.	(Stefansson et al., 2002; Stefansson et al., 2003; Williams et al., 2003b; Hall et al., 2004; Hong et al., 2004; Iwata et al., 2004; Thiselton et al., 2004)
DAO/DAOA (1610/ 267012)	13q33.2; 13q34	Envolvidas na via glutamatérgica	DAO foi associado consistentemente à EZ em um estudo apenas, mas a associação de DAOA tem sido replicada em diferentes populações, entre elas a Alemã, Chinesa, Americana e Sul-africana.	(Chumakov et al., 2002; Hall et al., 2004; Korostishevsky et al., 2004; Schumacher et al., 2004; Wang et al., 2004)
RGS4 (5999)	1q23.3	Ativadora de GTPases	Associação positiva encontrada para as populações Americana e Irlandesa, mas o padrão de associação varia de grupo para grupo.	(Chowdari et al., 2002; Chen et al., 2004; Morris et al., 2004; Williams et al., 2004b)
COMT (1312)	22q11.21	Através de metilação, ativa o metabolismo degradativo de catecolaminas	Vários estudos de associação já foram feitos, mas com achados muito controversos, e uma metanálise recente conclui que não há evidência consistente de associação.	(Glatt et al., 2003)
PRODH (5625)	22q11.21	Cataliza o catabolismo de prolina	Camundongos knockout para esse gene apresentam anormalidades comportamentais análogas às observadas em EZ. Além disso, foi observada uma deleção heterozigótica desse gene em uma família com dois indivíduos esquizofrênicos. Entretanto, apesar de haver diversos estudos de associação entre polimorfismos nesse gene e EZ, poucos encontraram associação significativa.	(Gogos et al., 1999; Jacquet et al., 2002; Liu et al., 2002; Williams et al., 2003a; Li et al., 2004; Ohtsuki et al., 2004b)
DISC1 / DISC2 (27185/ 27184)	1q42.1	Envolvidas com desenvolvimento neuronal e cortical	Esses genes foram estudados após observar-se que uma translocação (1;11)(q42;q14.3) mostrou forte evidência de ligação com um fenótipo amplo que compreendia EZ, transtorno bipolar e depressão, em uma família Escocesa. Essa translocação interrompia dois genes no cromossomo 1: <i>DISC1</i> e <i>DISC2</i> . Estudos procuraram associar polimorfismos nesse gene com EZ, apresentando achados controversos. Enquanto associação positiva foi encontrada para as populações Filandesas e Americana, achados negativos foram obtidos para as populações Alemã e Japonesa.	(Millar et al., 2000; Blackwood et al., 2001; Devon et al., 2001; Hennah et al., 2003; Hodgkinson et al., 2004; Kockelkorn et al., 2004)

3.5. A BUSCA POR POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS

3.5.1. SNPs

Quando duas seqüências da mesma região de DNA são comparadas e dois nucleotídeos diferentes são encontrados em uma mesma posição, dizemos que existe um Polimorfismo de Nucleotídeo Único, ou SNP (do inglês – Single Nucleotide Polymorphism). Atualmente, mais de 6 milhões de SNPs já foram identificados no genoma humano (fonte: dbSNP, build 126 – 22/05/2006)

A maior parte dos SNPs identificados em genes humanos não resulta em alterações na seqüência protéica, graças à sua localização em regiões não traduzidas da molécula de mRNA ou devido à degeneração dos códons. Assim, apenas uma pequena parcela dos SNPs têm a capacidade de alterar a composição das proteínas, o que por sua vez poderia levar à modificação da sua atividade biológica. Estes polimorfismos, os chamados “SNPs não sinônimos” (ou nsSNPs), estão entre os SNPs que têm maior potencial de reflexo fisiológico. Estima-se que de 20% a 30% destes nsSNPs acarretam danos na função da proteína (Chasman & Adams, 2001; Sunyaev et al., 2001b).

Outros tipos de polimorfismos são também de grande importância para a fisiologia da célula. Alguns exemplos são os SNPs localizados em regiões promotoras (que podem alterar a expressão do gene); polimorfismos localizados em sítios de *splicing* (que podem resultar na inserção ou exclusão ou modificação do tamanho de exons, podendo alterar a estabilidade do mRNA ou a própria proteína traduzida a partir desse mRNA); SNPs que causam geração ou supressão de códons de terminação de tradução (gerando proteínas com diferentes tamanhos); polimorfismos em regiões regulatórias existentes nas regiões 3' UTR ou SNPs que causem adenilação alternativa ou alteração na estrutura e estabilidade do RNA.

Atualmente, existem diversas ferramentas que permitem analisar com precisão as conseqüências decorrentes da troca de aminoácido resultante de um nsSNP. Duas delas são o SIFT (do inglês: “Sorting Intolerant From Tolerant”; (Ng & Henikoff, 2003) e o PolyPhen (do inglês: “Polymorphism Phenotyping”; (Sunyaev et al., 2001a; Sunyaev et al., 2001b)). O programa SIFT considera a posição onde a substituição ocorre na proteína e o tipo de troca de aminoácido, baseando-se no alinhamento de proteínas da família, através do qual consegue determinar aminoácidos extremamente conservados e trocas que são ou não são deletérias para a função da proteína. Já a segunda prediz o possível impacto da substituição de um aminoácido sobre a estrutura e função de uma proteína humana baseando-se em comparações de

seqüências com outras espécies animais (proteínas ortólogas), além de análises físico-químicas e análise da estrutura tridimensional. Já outras ferramentas, tais como o SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>), permitem uma análise detalhada de determinadas características do tipo de troca resultante do SNP, por exemplo, se os aminoácidos envolvidos na troca possuem cargas ou hidrofobicidade diferentes, ou se a troca está ocorrendo em algum domínio da proteína.

A capacidade de identificar polimorfismos em genes humanos e associá-los a diferentes graus de suscetibilidade ou evolução das principais doenças humanas pode representar um dos maiores progressos da pesquisa biológica recente. Trabalhos desta natureza, feitos com amostras de DNA associadas a bancos de dados complexos e completos, analisados com abordagem estatística adequada, podem revelar marcadores moleculares relevantes em relação à evolução clínica de várias doenças, assim como a predição de resposta a diferentes tratamentos, ou seja, um verdadeiro diagnóstico e tratamento baseado na nossa individualidade genética.

3.5.2. Variações em microssatélites de DNA

Mutações caracterizadas por expansões trinucleotídicas são conhecidas por causarem pelo menos 14 diferentes doenças neurológicas (Cummings & Zoghbi, 2000) e o envolvimento de genes contendo esse tipo de região repetitiva tem sido postulado na etiologia da EZ (Margolis et al., 1997; Joobar et al., 1999). Os mecanismos supostos para associar estas expansões e a fisiologia da célula são a sua possível interferência na estrutura do DNA, no processo de transcrição, nas interações RNA-proteína e alterações nas conformações e interações de proteínas (Cummings & Zoghbi, 2000).

Longas repetições CAG têm sido relacionadas a indivíduos afetados com diversas desordens (Margolis et al., 1994; Lieberman & Fischbeck, 2000; Holmes et al., 2001; Yamada et al., 2002), mas alelos menores, contendo menor número de repetições, já foram associados a esquizofrênicos que apresentam melhor resposta a neurolépticos (Joobar et al., 1999).

O fenômeno clínico de diminuição da idade de início da doença ou de um fenótipo mais severo em gerações subseqüentes de uma família com indivíduos afetados tem sido denominado antecipação. Em um grande número de doenças neurológicas o fenômeno da antecipação tem sido relacionado a um número expandido de repetições de uma seqüência genômica repetitiva, em geral uma repetição de CAG codificadora de poli-glutamina, que aumenta de tamanho ao ser transmitido para as futuras

gerações (Lindblad & Schalling, 1999). O fenômeno de antecipação foi demonstrado para a EZ e muitos estudos procuram associar a existência de expansões trinucleotídicas com a doença e o fenômeno, mas até o momento os resultados ainda são controversos (McInnis et al., 1999).

3.5.3. INDELs, Inversões e Polimorfismos de Número de Cópias

Uma outra categoria de polimorfismo de DNA inclui os chamados INDELs, que são inserções/deleções de trechos do DNA variando de poucas bases até grandes pedaços do cromossomo. INDELs localizados dentro da região codificadora do gene podem causar alteração na moldura de leitura, alterando completamente a estrutura primária da proteína, ou levando à inserção ou deleção de códons. Além disso, INDELs em regiões não traduzidas do RNA podem afetar sua estrutura e estabilidade ou comprometer a expressão de RNAs regulatórios não codificadores.

Recentemente, foram descritas inesperadas alterações polimórficas estruturais nos genomas de indivíduos sadios, causadas por duplicações, inversões ou deleções de grandes trechos do DNA, ou alterações no número de cópias de um gene (denominado “polimorfismo de número de cópias”), que perfazem 3.5% de nosso genoma (Buckland, 2003; Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004). Por serem encontrados em indivíduos sadios, e não apenas em pessoas doentes, essas alterações não estão diretamente associadas à doenças, mas acredita-se que, assim como outros polimorfismos, devam aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento de uma série de patologias. Atualmente, dois grandes projetos públicos, um Norte-Americano (financiado pelo Instituto Nacional de Saúde, *NIH*) e um Canadense/Inglês (financiado pelo *Genome Canada* e a *Wellcome Trust*) estão analisando o genoma de indivíduos de diferentes etnias a fim de identificar e caracterizar melhor essas alterações. Além destes, instituições privadas têm financiando projetos que buscam a associação dessas alterações com doenças complexas (Check, 2005).

Conforme discutido anteriormente, existem sólidas evidências que associam EZ e neurodesenvolvimento. Do mesmo modo, existem fortes demonstrações da importância de fatores genéticos na gênese desta doença. Por outro lado, hoje é possível, através de análises em bancos de dados especializados na organização de genes de acordo com a sua atividade funcional (tais como Gene Ontology - www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi - e Panther - www.pantherdb.org), identificarmos os genes associados à neurogênese, e mapeá-los, de modo a

identificarmos aqueles que estão localizados em locos que aparentemente estão associados com a EZ, sugeridos por estudos de ligação. Deste modo, estes genes se tornam atraentes como marcadores para estudos de associação com a EZ por possuírem evidências funcionais (no caso, sua associação com processos fisiológicos importantes na doença) e físicas (seu mapeamento em regiões importantes para a EZ), que nos levaram a selecioná-los para nosso estudo de associação com a EZ. Esses genes e suas características mais marcantes estão discutidos no tópico a seguir, no qual procuramos agrupá-los em vias ou famílias gênicas de forma a facilitar sua compreensão.

3.6. GENES ENVOLVIDOS COM NEUROGÊNESE INSERIDOS NESSE ESTUDO

3.6.1. Via Sinalizadora de WNT

Os genes *WNTs* codificam glicoproteínas que têm importante papel durante o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos (Cadigan & Nusse, 1997; Wodarz & Nusse, 1998; Wu et al., 2003). A sinalização por proteínas WNT durante a embriogênese é essencial para guiar processos celulares básicos necessários para padrões de formação corretos, determinação de destino e polaridade celular. Funcionalmente, as WNTs agem como moléculas sinalizadoras que interagem com receptores da família FZD (*frizzled*), composta por pelo menos 10 diferentes membros em humanos. As glicoproteínas WNT secretadas, se ligam aos receptores FZD extra-celulares disparando uma complexa cascata de sinalização que regula a expressão gênica, podendo fortemente influenciar a atividade geral da célula. Dependendo da combinação específica entre WNT/FZD, pelo menos três possíveis vias intracelulares de transdução de sinal ocorrem: a via de β -catenina, a via de polaridade celular planar (PCP), e a via WNT/ Ca^{2+} (figura 3; (Cadigan & Nusse, 1997; Wodarz & Nusse, 1998; Wu et al., 2003).

Via de β -catenina: Essa via é conhecida como a via canônica de WNT, responsável por afetar a determinação de destino celular, através da regulação de expressão gênica. Basicamente, a ligação de WNT a receptores específicos leva à ativação da proteína Disheveled (DSV) que inativa o complexo GSK3 β /AXIN/APC, responsável pela degradação de β -catenina no citoplasma celular. Por consequência, β -catenina acumula e penetra no núcleo da célula, onde interage com proteínas de ligação ao DNA ativando a transcrição de genes específicos (Carnac et al., 1996; Brannon et al., 1997; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997).

Via de PCP: A via PCP (do inglês: *Planar Cell Polarity*) é responsável por regular a polaridade celular, e os movimentos morfogenéticos durante o desenvolvimento. Sua ação ocorre através da ativação de JNK por um dos receptores FZD ligado a WNT, levando à organização assimétrica do citoesqueleto celular e polarização coordenada das células. Outras proteínas envolvidas nesta via são FNI, KNY e PDZ (Huelsenken & Behrens, 2002), mas seus mecanismos de ação ainda são pouco conhecidos.

Via de WNT/ Ca^{2+} : A via WNT/ Ca^{2+} regula a adesão e motilidade celular, e é mediada pela liberação de Ca^{2+} através de estimulação por WNT, envolvendo a ativação de proteína quinase C, de uma quinase dependente de cálcio, e de calmodulina (Kuhl et al., 2000; Strutt, 2003; Veeman et al., 2003).

Figura 3: Representação esquemática das cascatas de transdução de sinal de WNT.

A) Via canônica: a interação de WNT com FZD resulta na inibição do complexo AXIN/GSK3B/APC, resultando no acúmulo de β-catenina, que por sua vez penetra no núcleo ativando a transcrição de genes alvo. B) Via PCP: A interação de WNT com FZD resulta na ativação de JNK promovendo uma organização assimétrica do citoesqueleto celular e polarização coordenada das células. C) Via WNT/ Ca^{2+} : A interação WNT com FZD resulta na liberação de Ca^{2+} intracelular modulando a adesão e motilidade celular.

Em humanos, 19 genes WNTs já foram identificados (Miller, 2002). Para um estudo aprimorado da função das respectivas proteínas, foram construídos camundongos *knockouts*, com mutações causando perda de função em diversas WNTs, com fenótipos extremamente informativos. Por exemplo, camundongos *knockout* de WNT1 não desenvolvem uma porção do cérebro e do cerebelo (McMahon

& Bradley, 1990), *knockouts* de *WNT3a* têm perda total do hipocampo (Lee et al., 2000) e camundongos *knockout* de *WNT7a* apresentam defeitos de maturação de sinapses (Hall et al., 2000). Esses dados demonstram uma variedade de funções atribuídas às WNTs durante o desenvolvimento do SNC e indicam sua participação em processos e regiões de grande importância para a EZ. Além disso, há evidências do envolvimento de WNTs no desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos (Castelo-Branco et al., 2003).

Outras proteínas têm sido demonstradas como pertencentes à via WNT, mesmo que de uma forma indireta. Sabe-se que GSK3 β é substrato de AKT1, por quem é fosforilada e inibida. Recentemente, *AKT1* foi associado com EZ, no estudo de Emamian et al. (Emamian et al., 2004), o qual demonstrou que o haplótipo associado também levava a um decréscimo no nível de AKT (em linfócitos e tecido cerebral), conseqüentemente resultando em uma menor fosforilação e maior atividade de GSK3 β . GSK3 β , quando ativa, além de fosforilar β -catenina, fosforila também a proteína MAP1B (Goold & Gordon-Weeks, 2003). MAP1B é uma proteína regulada ao longo do desenvolvimento, expressa em altos níveis em neurônios em diferenciação e nas regiões do sistema nervoso adulto com plasticidade neuronal ou capacidade de regeneração após injúria (Gordon-Weeks & Fischer, 2000). Nos neurônios a expressão de *MAP1B* é particularmente alta em axônios em desenvolvimento (Mansfield et al., 1991; Black et al., 1994; Bush et al., 1996). Seu importante papel no desenvolvimento de neuritos tem sido demonstrado pelos fenótipos obtidos através de camundongos *knockout* para esse gene (Edelmann et al., 1996; Takei et al., 1997; Gonzalez-Billault et al., 2000; Meixner et al., 2000).

WIF1 é um fator inibitório de WNT, uma proteína secretada que se liga às proteínas WNT inibindo suas atividades. Acredita-se que esse inibidor extracelular module os efeitos espaço/temporais de WNTs ou que atue no transporte das WNTs através do espaço intercelular, liberando-as nas localizações apropriadas (Hsieh et al., 1999).

NRG1 é um gene com alto nível de expressão no sistema nervoso (central e periférico), em seu estágio inicial do desenvolvimento (Orr-Urtreger et al., 1993). Por análise da sinalização de *NRG1* pode-se concluir que essa glicoproteína está envolvida na modulação da plasticidade sináptica no SNC adulto (Huang et al., 2000), além de ter papel fundamental na expressão e ativação de receptores de neurotransmissores, incluindo os glutamatérgicos (Stefansson et al., 2002). Seu envolvimento indireto na via do WNTs se dá pela ativação de AKT1 (Flores et al., 2000; Li et al., 2001).

Na via de WNTs, selecionamos para nossos estudos os seguintes genes: *WIF1*, *AKT1*, *WNT7a*, *MAP1B*, *FZD3* e *NRG1*.

3.6.2. Via Sinalizadora de NOTCH

A via sinalizadora de NOTCH é conservada em diversas espécies, sendo responsável pela regulação da diferenciação celular durante e após o desenvolvimento (Shimizu et al., 2000). Em mamíferos, os processos que têm NOTCH como essencial incluem a regulação da simetria bilateral, determinação do destino celular do pâncreas endócrino e exócrino, proliferação e diferenciação de células tronco neurais, e desenvolvimento de células sensoriais do aparelho auditivo (Hrabe de Angelis et al., 1997; Apelqvist et al., 1999; Kiernan et al., 2001; Kim & Hebrok, 2001; De Bellard et al., 2002; Przemeck et al., 2003). De modo geral, mas não absoluto, a atividade de NOTCH leva à inibição de sinais de diferenciação celular, preservando progenitores que responderiam a esses sinais, atuando, portanto, na manutenção de células tronco indiferenciadas (Kopan & Turner, 1996).

As proteínas NOTCH são inicialmente sintetizadas como proteínas de cerca de 300-KDa, que são então processadas pela protease *FURIN*, gerando um fragmento extracelular e um transmembrana. Em mamíferos há várias proteínas ligantes para NOTCH, entre elas *JAGGED1*, *JAGGED2*, *DELTA1*, *DELTA3* E *DELTA4*. As três primeiras foram descritas como ligantes de NOTCH1, 2 e 3 (Shimizu et al., 2000). Quando os receptores de NOTCH se ligam a seus respectivos ligantes, NOTCH é clivada liberando um domínio intracelular que é translocado para o núcleo. No núcleo esse domínio intracelular forma um complexo com a proteína de ligação ao DNA, denominada CBF1 (Schroeter et al., 1998; Shimizu et al., 2000). Esse complexo age ativando a transcrição dos genes *HES1* e *HES5*, que por sua vez antagonizam os fatores de transcrição bHLH (Sakamoto et al., 2003). Uma representação esquemática desta via pode ser vista na figura 4.

Um importante exemplo de um desses fatores é a proteína *ASCL1*, o homólogo humano de *Mash1* de camundongo. Este fator de transcrição, com motivo HLH (do inglês: "*helix-loop-helix*"), é expresso no sistema nervoso em desenvolvimento (Horton et al., 1999), e possui papel crítico no desenvolvimento do neocórtex de mamíferos e nos processos gerais de neurogênese (Ito et al., 2003). O aumento da expressão desse gene é crucial para a transição de proliferação para neurogênese celular (Ross et al., 2003). A ausência de *Mash1* causa uma notável redução na via sinalizadora de NOTCH (Yun et al., 2002). *Mash1* também tem papel comprovado na

seleção do destino de diferenciação neuronal ou formação de células da glia a partir de células tronco neurais. Além disso, camundongos mutantes para os genes *Mash1* e *Neurogenin2* apresentam inúmeros defeitos de desenvolvimento do córtex cerebral, incluindo uma redução de neurogênese e geração prematura ou excessiva de precursores de astrócitos (Nieto et al., 2001).

NEUROD2 também é um fator de transcrição neuronal com motivo HLH, cuja expressão induz diferenciação neuronal (Franklin et al., 2001; Mie et al., 2003). Em camundongos *knockout* para NEUROD2 observa-se diminuição de tamanho e alta taxa de apoptose em diversas áreas cerebrais (Olson et al., 2001).

Diversos estudos têm demonstrado que NUMB e NUMBL são importantes inibidores citosólicos de NOTCH (Lundell et al., 2003; McGill & McGlade, 2003). Essas duas enzimas são homólogos altamente conservados da proteína NUMB de *Drosophila*. Ambas possuem papéis redundantes, mas críticos para a manutenção de células neurais progenitoras durante a embriogênese por determinar se a progênie irá ou não se diferenciar em linhagens neuronais (Petersen et al., 2002; Petersen et al., 2004). Apesar de alguns estudos sugerirem que NUMB e NUMBL inibem NOTCH promovendo a diferenciação neuronal, estudos recentes envolvendo mutações nesses genes em camundongos sugeriram que eles devem ser essenciais para a manutenção de progenitores neurais (Cayouette & Raff, 2002; Petersen et al., 2002).

Figura 4: Proteínas envolvidas na via sinalizadora de NOTCH, com ênfase nos genes estudados nesse trabalho.

A interação JAGGED2/NOTCH resulta na clivagem de NOTCH por uma γ -secretase, liberando o domínio intracelular de NOTCH (DICN). Este domínio penetra no núcleo, formando um complexo com CBF1 e outras proteínas, promovendo a transcrição de genes alvo como HES1 e HES5. Essas proteínas antagonizam genes proneurais, tais como ASCL1, consequentemente inibindo a diferenciação neuronal. As proteínas NUMB and NUMBL tem geralmente sido consideradas inibidores de NOTCH, promovendo diferenciação neuronal. Entretanto, estudos recentes sugerem que elas sejam essenciais para a manutenção de progenitors neurais. Essa figura foi retirada de Gregorio et al., 2006a (anexo II) sendo uma adaptação da ilustração encontrada em (Yoon & Gaiano, 2005).

Estudos envolvendo mutações em *NOTCH2* têm demonstrado que este gene é essencial no desenvolvimento do SNC (Hamada et al., 1999). A expressão de *NOTCH2* em cérebros de camundongos pode ser detectada ao redor dos ventrículos cerebrais (região denominada zona ventricular) já no 10º dia do desenvolvimento embrionário de camundongos, e é encontrada em diversas regiões do cérebro pós-natal, incluindo hipocampo (Higuchi et al., 1995). *NOTCH2* foi capaz de regular a neuritogênese (Solecki et al., 2001) e, juntamente com *DELTA1*, capaz de regular a simetria no desenvolvimento das porções direita e esquerda do corpo (Krebs et al., 2000). Os genes Notch e seus ligantes possuem um perfil de expressão no SNC que é consistente com a inibição lateral e devem regular gradualmente a diferenciação neuronal. Os genes *JAGGED2* e *DELTA1* possuem expressão complementar durante o desenvolvimento, o que sugere que ambos são responsáveis por regular o destino

celular de uma mesma linhagem encaminhando-a para vias distintas de diferenciação (Ikeuchi & Sisodia, 2003).

NOTCH3 já foi associado a uma demência hereditária autossômica dominante, denominada CADASIL, caracterizada por enxaquecas e derrames recorrentes levando a sintomas neuropsiquiátricos com redução de substância branca no cérebro afetado (Sourander & Walinder, 1977; Sonninen & Savontaus, 1987). Há relato de um caso de co-ocorrência de CADASIL e EZ (Lagas & Juvonen, 2001), o que sugere que esse gene possa ter um envolvimento com esta psicose. Um estudo conduzido nos EUA, envolvendo *NOTCH3* e transtorno bipolar não encontrou associação significativa entre ambos (Ahearn et al., 2002).

Sabe-se que as vias de NOTCH e WNTs se comunicam em vários níveis, tais como através da ligação do domínio extracelular de NOTCH a WNT (Wesley, 1999) ou DSV (Axelrod et al., 1996). Também já foi demonstrado que GSK3 β , proteína envolvida na via de WNT, como descrito anteriormente, também fosforila membros da via NOTCH (Espinosa et al., 2003).

Dentro da via de NOTCH, selecionamos para nossos estudos os seguintes genes: *NOTCH2*, *HEYL*, *ASCL1*, *NUMB*, *JAG2*, *NOTCH3*, *NUMBL*, *DLL1*.

3.6.3. Via das Semaforinas

Diversas famílias gênicas envolvidas com direcionamento axonal têm sido identificadas em organismos modelo. Dentre elas, podemos citar a família das semaforinas e seus receptores, neuropilinas e plexinas, que desempenham seus papéis não apenas durante o desenvolvimento do sistema nervoso, mas também no sistema nervoso adulto. No cérebro adulto, esses fatores têm função de manter as conexões pré-estabelecidas, evitando o brotamento espontâneo e anormal de axônios.

Até o momento, na família de semaforinas já foram identificados 20 membros, divididos em 8 classes, sendo que 5 dessas classes representam semaforinas de vertebrados, enquanto que as outras compreendem semaforinas virais e de invertebrados (Semaphorin Nomenclature Committee, (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). Todas as semaforinas possuem um domínio conservado de cerca de 500 aminoácidos, denominado domínio sema (Kolodkin et al., 1993; Luo et al., 1993).

Dentre os receptores de semaforinas, foram identificadas as famílias das neuropilinas e das plexinas (Winberg et al., 1998; Tamagnone et al., 1999; Raper, 2000). As neuropilinas atuam como ligantes de semaforinas e as plexinas como

transdutores de sinais. Não há especificidade de interação dos membros das famílias de neuropilinas e plexinas com as diferentes semaforinas.

Com o intuito de identificar as funções dos membros das vias das semaforinas, diversos estudos têm analisado os efeitos de deleções de seus genes *in vivo*. Deste modo, *knockouts* de membros das semaforinas da classe 3, resultaram em fenótipos com defasciculação de nervos no sistema nervoso periférico, e direcionamento anormal de axônios em hipocampo (Behar et al., 1996; Catalano et al., 1998; Feiner et al., 2001; Sahay et al., 2003). Em estudo de *knockout* de um membro da classe 6 de semaforinas, foi encontrado um fenótipo de direcionamento anormal de axônios em córtex e tálamo cerebral (Leighton et al., 2001). *Knockouts* de membros da família de neuropilinas levam a uma defasciculação de nervos tanto do SNC como do sistema nervoso periférico (Kitsukawa et al., 1997; Cloutier et al., 2002; Walz et al., 2002) e o *knockout* de um membro da família de plexinas resulta em defasciculação e anomalias de direcionamento axonal no SNC (Cheng et al., 2001; Bagri et al., 2003).

O envolvimento de semaforinas na formação de sinapses também tem sido demonstrado por estudos de *knockout* de membros das classes 1 e 2 (Matthes et al., 1995; Winberg et al., 1998; Godenschwege et al., 2002).

O envolvimento de GSK3 na via das semaforinas foi demonstrado, permitindo estabelecer uma conexão entre esta via e a dos WNTs (Eickholt et al., 2002).

Dentro da via das Semaforinas, selecionamos para nossos estudos, polimorfismos nos genes: *SEMA6C*, *NRP1*, *NETO1*, *SEMA3D*.

3.6.4. Via das Protocaderinas

O poder de processamento cerebral é dependente da densidade, estrutura e sofisticação das conexões sinápticas que se formam durante o desenvolvimento e são modificadas durante a vida. Um dos principais componentes estruturais e funcionais das sinapses são as caderinas (Bamji, 2005). As protocaderinas são membros dessa superfamília e se distinguem das caderinas clássicas por possuírem um maior número de repetições do ectodomínio. O *cluster* de genes que codificam as 53 diferentes protocaderinas foi identificado recentemente (Wu & Maniatis, 1999) e se encontra organizado em três *subclusters* α , β e γ (figura 5a).

Além do cluster de protocaderinas localizado no cromossomo 5q31, também foram descritas protocaderinas nos cromossomos sexuais (Blanco et al., 2000), localizadas no bloco de homologia Yp11.2/Xq21.3, denominadas *PCDHY* e *PCDHX*, sendo esses genes predominantemente expressos em tecido nervoso.

Todas as protocaderinas são proteínas transmembrana que apresentam domínios extracelulares e citoplasmáticos. Durante o desenvolvimento cortical se ligam a Reelina (RELN), proteína importante para modulação de sinalização neuronal, participando de suas vias de transdução de sinal (Senzaki et al., 1999). As protocaderinas do cluster *a* se ligam, através do domínio citoplasmático, à proteína FYN. Camundongos deficientes em FYN exibem diversas anormalidades neuronais, incluindo um decréscimo na atividade sináptica, comportamentos emocionais anormais e sensibilidade ao etanol (Yagi, 1999). Esses dados sugerem que as protocaderinas participem na função fisiológica de regulação da formação da rede neural e do funcionamento cerebral.

Neurônios individuais aparentam expressar diferentes combinações de protocaderinas (Kohmura et al., 1998), sendo que uma enorme variedade e complexidade de combinações poderiam surgir de célula para célula. Assim, acredita-se que as protocaderinas poderiam determinar a geração de especificidade sináptica tanto no desenvolvimento cerebral quanto na formação de memória (Hilschmann et al., 2001; Noonan et al., 2003).

Em uma análise comparativa do cluster de protocaderinas de humanos e camundongos observou-se uma alta similaridade entre os ortólogos (Vanhalst et al., 2001; Wu et al., 2001), o que sugere que esses genes têm funções altamente conservadas no desenvolvimento do cérebro de mamíferos.

Inúmeros SNPs foram descritos em promotores dos genes das protocaderinas (Noonan et al., 2003). Além disso, uma deleção polimórfica de 16.7kb que trunca o gene *PCDHa8* e elimina completamente os genes *PCDHa9* e *PCDHa10* foi detectada (Noonan et al., 2003, figura 5b). Esta deleção é polimórfica, com frequência variável entre as populações européia, asiática e afroamericana (de 6% a 17%). A presença dessa deleção em homozigose é baixa variando de 1,4% a 2%. Ainda não existem estudos investigando uma possível associação entre essa deleção, ou mesmo de SNPs em promotores destes genes, e a EZ.

Figura 5. Organização do cluster de protocaderinas no cromossomo 5q31 (Noonan et al, 2003).

a) Os três subclusters de protocaderinas: *a*, *b* e *g*. Os clusters *a* e *g* são caracterizados por possuírem exons variáveis e exons citoplasmáticos compartilhados entre os variáveis. O cluster *b* é constituído apenas por exons variáveis. b) Esquema ilustrando a região de deleção polimórfica (destacada sobre a seta) do cluster *a*, compreendendo os genes PCDHa8, PCDHa9 e PCDHa10. As barras pretas verticais antes dos genes marcam a localização de seus promotores.

Reelina, como descrito anteriormente, é um ligante de protocaderinas que tem sido associado a processos de modulação do sistema de sinalização neuronal, bem como de plasticidade e transmissão sináptica (Fatemi, 2001). Em esquizofrênicos foi descrita uma redução de 50% na quantidade de reelina no hipocampo (Fatemi et al., 2000), bem como reduções na substância branca (Eastwood & Harrison, 2003), córtex pré-frontal e cerebelo (Guidotti et al., 2000). Essa redução também foi encontrada em outras desordens psiquiátricas, tais como transtorno bipolar, autismo e depressão (Fatemi et al., 2001a; Fatemi et al., 2001b). Entretanto, um estudo envolvendo SNPs no promotor de *RELN* não encontrou associação entre os polimorfismos e a EZ (Chen et al., 2002). Outro estudo envolvendo um microssatélite CGG polimórfico na região 5'UTR do mRNA e EZ também gerou resultados negativos de associação (Akahane et al., 2002).

Dentro da via das protocaderinas, selecionamos para nossos estudos os seguintes genes: PCDH12, PCDH β11, PCDH3a, *RELN*, e a deleção no cluster de PCDHa.

3.6.5. Família Gênica ADAMS

Descritos inicialmente em 1995 (Wolfsberg et al., 1995), os membros da família gênica ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease domain) são proteínas transmembrana que contém um domínio desintegrina e um de metaloprotease possuindo portanto, atividades potenciais de adesão celular e protease. Atualmente, 29 membros desta família já foram descritos, mas pouco se sabe sobre a função da maioria dos seus produtos gênicos (Primakoff & Myles, 2000).

Com relação aos produtos com função já conhecida, diversos processos biológicos têm sido relacionados aos papéis das ADAMs, tais como: fertilização, neurogênese, miogênese e resposta inflamatória (Primakoff & Myles, 2000).

Estudos de expressão têm demonstrado a presença de diversos membros dos ADAMs no SNC, sugerindo sua importância para a neurogênese (Bernstein et al., 2003; Bernstein et al., 2004; Sun et al., 2004). Um estudo de *knockout* de um dos membros dessa família (*ADAM10*) resultou em anomalias no SNC (Hartmann et al., 2002), com alterações significativas na sinalização da via Notch, evidenciando o envolvimento da família ADAM nessa outra via de sinalização. Dentro da via das ADAMs, selecionamos para nossos estudos os seguintes genes: *ADAM15*, *ADAMTS4*, *ADAM22*, *ADAM28*.

3.6.6. MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificador capazes de regular a expressão gênica em nível pós transcricional (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Meister & Tuschl, 2004). Em animais, microRNAs maduros possuem aproximadamente 22 nucleotídeos e são gerados a partir de um transcrito primário semelhante aos mRNAs, contendo promotor, sendo sintetizado pela RNAPolIII, e possuindo cauda poli(A) e *capping* na extremidade 5' (Lee et al., 2004). Esse transcrito primário é processado por nucleases pertencentes à família de ribonucleases III (RNaseIII). Inicialmente, no núcleo, a enzima DROSHA cliva o transcrito primário, gerando um precursor com estrutura do tipo *stem-loop* contendo 70 nucleotídeos, que por sua vez é clivado pela DICER, no citoplasma, gerando o fragmento correspondente ao miRNA maduro, de ~22 bases (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Lee et al., 2003). Uma das fitas desse fragmento é então incorporada ao complexo RISC (do inglês: RNA-induced Silencing Complex), e guiada à seqüências alvo do mRNA, regulando negativamente sua tradução de duas diferentes formas, de acordo com o grau de complementariedade com seqüências no mRNA. Caso seu

pareamento seja incompleto, essa regulação negativa ocorre através da inibição da tradução do mRNA, e caso o pareamento seja completo, esta ocorre através da degradação do mRNA (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Meister & Tuschl, 2004; Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

A figura 6 ilustra as etapas de processamento e a regulação feita pelos miRNAs. Milhares de miRNAs têm sido preditos ou identificados em diversas espécies e centenas já foram encontrados no genoma humano. Estima-se que cada miRNA esteja envolvido com a regulação de pelo menos 200 diferentes transcritos, deste modo, acredita-se hoje que miRNAs sejam a principal classe de moléculas reguladoras pós-transcricionais (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Bentwich et al., 2005; Berezikov et al., 2005; Lewis et al., 2005; Hertel et al., 2006).

Alguns estudos têm procurado desvendar a importância dos microRNAs (miRNAs) no desenvolvimento. Em um desses estudos foram gerados peixes “paulistinha” (*Danio rerio*) *knockout* para Dicer (Giraldez et al., 2005), os quais apresentaram anomalias em determinados processos de morfogênese, tais como: gastrulação, somitogênese, desenvolvimento do coração e do cérebro, além do desenvolvimento neuronal. Outro estudo avaliou os efeitos do *knockout* de Dicer em camundongos, observando que os animais morrem antes do nascimento e apresentam defeitos de angiogênese (Yang et al., 2005b).

Figura 6 – A biogênese dos microRNAs.

Os genes que codificam os microRNAs (miRNAs) são geralmente transcritos pela RNAPolIII no núcleo, formando transcritos primários que são processados pela RNaseIII Drosha e seu co-fator Pasha, liberando um precursor do miRNA maduro, de ~70nt (a sequência do miRNA maduro está destacada em vermelho). Em seguida esse precursor é transportado para o citoplasma, onde uma segunda RNaseIII, Dicer, o processa, gerando um duplex de 22pb. Esse duplex é então separado em miRNAs fita-simples, que se associam ao complexo RISC, e ligam-se a sítios complementares de um mRNA alvo, regulando negativamente sua expressão gênica. Essa regulação pode ocorrer de duas formas: na primeira, o miRNA se pareia com complementariedade imperfeita ao mRNA, geralmente em sítios na sua porção 3'UTR, bloqueando sua tradução; na segunda, se pareia com complementariedade perfeita ou quase perfeita ao mRNA alvo, geralmente em sítios na sua sequência codificadora, induzindo a sua clivagem. Fonte: Esquela-Kerscher & Slack, 2006.

Até o momento três diferentes estudos demonstram a atuação de miRNAs específicos em diferentes estágios do desenvolvimento do SNC, em mamíferos. No primeiro (Krichevsky et al., 2003), um arranjo de oligonucleotídeos correspondentes a 44 miRNAs isolados de tecido nervoso de ratos e camundongos foi usado para hibridizar RNAs de cérebro de ratos em diferentes estágios (3 embrionários, um

juvenil e um adulto). Neste estudo, 20% dos miRNAs apresentaram alterações em seu nível de expressão de acordo com o estágio do desenvolvimento. No segundo estudo (Miska et al., 2004) um micro-arranjo contendo 138 microRNAs foi utilizado para análise de expressão de cérebros de camundongos em diferentes estágios, evidenciando a importância de 66 miRNAs durante o desenvolvimento do SNC. Já no último (Smirnova et al., 2005), a expressão diferencial e específica de determinados miRNAs em linhagens neuronais específicas foi evidenciada, através de estudo com culturas de neurônios e astrócitos de camundongos.

Dada a grande importância dos miRNAs para a neurogênese, seu envolvimento na etiologia da EZ foi especulado recentemente (Perkins et al., 2005). No entanto, até hoje não existem estudos que procuraram relacionar polimorfismos em miRNAs com alguma doença.

Através de critérios de seleção específicos, descritos na seção de materiais e métodos, selecionamos 9 microRNAs envolvidos com neurodesenvolvimento para este estudo: *MIR-18*, *MIR-199B*, *MIR-206*, *MIR-210*, *MIR-211*, *MIR-221*, *MIR-222*, *MIR-266*, *MIR-320*.

3.6.7. Filaminas A e B

As filaminas compõem uma família de proteínas do citoesqueleto que têm função de organizar a actina filamentosa em redes de fibras. As filaminas ancoram várias proteínas transmembrana ao citoesqueleto de actina, promovendo uma estrutura de sustentação para uma série de proteínas sinalizadoras no citoplasma (Stossel et al., 2001; van der Flier & Sonnenberg, 2001). A filamina A (*FLNA*) possui alto nível de expressão no córtex em desenvolvimento, sendo requerida no processo de migração neuronal. A expressão de uma *FLNA* mutante resulta na doença genética Heterotopia Ventricular (HV), caracterizada por falha de migração neuronal e formação de nódulos na superfície ventricular cerebral (Fox et al., 1998; Sheen et al., 2001).

Recentemente, foi descrito que *FLNA* interage com os receptores de Dopamina D2 e D3 (Lin et al., 2001). Esse e outro estudo (Lin et al., 2002) descrevem a importância dessa interação para que haja uma apropriada expressão dos receptores de dopamina na superfície celular. A associação desses receptores com a *FLNA*, promove um mecanismo, pelo qual subtipos específicos de receptores de dopamina se comunicam com componentes de sinalização via citoesqueleto de actina.

FLNA também interage com *FLNB*, sendo ambas altamente expressas durante o desenvolvimento do SNC, sendo capazes de formar homodímeros ou heterodímeros

entre si. Trabalhos sugerem essas duas proteínas possuem papéis redundantes, especialmente durante o desenvolvimento do córtex cerebral (Sheen et al., 2002). Diante de seu papel importante papel fisiológico, selecionamos ambos os genes para inclusão neste estudo.

3.6.8. RTN4

O gene *RTN4*, mais conhecido como *NOGO*, apresenta um alto nível de expressão em oligodendrócitos localizados em tecidos mielinizados do SNC, durante o desenvolvimento fetal de ratos e também em ratos adultos (Huber et al., 2002).

A proteína NOGO tem papel importante em processos regenerativos e de reparo no SNC devido a sua habilidade de inibir o crescimento de neuritos e terminações nervosas (Chen et al., 2000). Dessa forma, NOGO tem um importante papel na plasticidade sináptica e migração neuronal, sendo que uma expressão alterada desse gene poderia contribuir para uma organização neuronal anormal.

A expressão do mRNA de *NOGO* encontra-se elevada em cérebros de pacientes esquizofrênicos (Novak et al., 2002). No estudo de Novak et al. um polimorfismo na região 3'UTR do mRNA de *NOGO* (uma inserção CAA) foi detectado, tendo sido especulado que esta estaria eventualmente contribuindo para uma regulação anormal da expressão do gene. Neste estudo, a prevalência de homozigotos para a inserção CAA em esquizofrênicos foi estatisticamente significativa ($p=0,0022$) e, deste modo, também incluímos este gene no estudo.

3.6.9. BDNF

BDNF (do inglês: "Brain Derived Neurotrophic Factor") é um membro da família de neurotrofinas, proteínas importantes para a sobrevivência neuronal, que têm papel no crescimento, desenvolvimento, manutenção do SNC. BDNF, propriamente dito, tem papel fundamental para o crescimento e sobrevivência neuronal, modulação da neurotransmissão, remodelagem da transmissão sináptica, e neurogênese do adulto (Russo-Neustadt, 2003). Sendo assim, BDNF é importante para a manutenção de uma cognição normal e funcionamento emocional.

Estudos envolvendo BDNF e EZ apontam para uma redução na produção e disponibilidade de BDNF em córtex pré-frontal (Weickert et al., 2003) e soro (Toyooka et al., 2002) de pacientes esquizofrênicos. Há alguns estudos envolvendo polimorfismos de *BDNF* com EZ, e enquanto um associou o polimorfismo VAL66MET e uma boa resposta ao tratamento com Clozapina em esquizofrênicos (Hong et al.,

2003) e outro associou uma repetição dinucleotídica polimórfica com EZ tardia (Krebs et al., 2000), outros estudos não foram capazes de encontrar associações (Hawi et al., 1998; Wassink et al., 1999).

3.6.10. ASPM

Microcefalia Primária (MCPH) é uma desordem de neurodesenvolvimento caracterizada por uma redução global no volume cerebral. O cérebro microcefálico possui volume comparável ao dos primeiros hominídeos, levando a crer que os genes responsáveis pela MCPH podem ter tido um papel chave na expansão do córtex cerebral em mamíferos, especialmente primatas. Mutações no gene *ASPM*, que codifica um homólogo humano de uma proteína de *Drosophila*, são as causas mais conhecidas de MCPH (Bond et al., 2002; Bond et al., 2003; Pichon et al., 2004). Estudos procurando avaliar as seqüências genômicas dos ortólogos humano e de primatas do velho mundo identificaram um alto nível de alterações consistentes com uma forte seleção positiva ao longo da evolução (Zhang, 2003; Evans et al., 2004; Kouprina et al., 2004). Esses dados sugerem que a seleção evolutiva de segmentos específicos da seqüência de *ASPM* estão fortemente relacionados com diferenças no tamanho do córtex cerebral.

3.6.11. NEFH

Neurofilamentos são heteropolímeros constituídos por três subunidades. São estruturas dinâmicas, que contêm sítios de fosforilação para um grande número de proteínas quinases, tais como PKA, PKC, ERK e GSK3 (Chertoff et al., 1995; Julien & Mushynski, 1998; Sasaki et al., 2002). NEFH codifica uma subunidade do neurofilamento, a qual contém um domínio funcional que consiste de 43 motivos repetidos dos aminoácidos Lys-Ser-Pro (KSP) espaçados por 3 a 5 aminoácidos entre eles. Estudos têm demonstrado que a serina desses domínios KSP pode ser fosforilada, resultando em uma intensa fosforilação desses domínios. Há fortes evidências de que a fosforilação dessa proteína resulta no estabelecimento da densidade de neurofilamentos, bem como do calibre axonal (Sanchez et al., 2000).

3.6.12. RAI1

O gene *RAI1* possui alta expressão em tecidos nervosos (Toulouse et al., 2003) e tem sua expressão induzida por ácido retinóico no processo que leva à diferenciação neuronal (Imai et al., 1995). Mutações ou deleções nesse gene têm sido

extensivamente associadas à Síndrome de Smith-Magenis (SMS), caracterizada por presença de retardo mental e anomalias crânio-faciais (Bi et al., 2004; Girirajan et al., 2005; Schoumans et al., 2005; Vlangos et al., 2005).

Esse gene possui um microssatélite CAG polimórfico, que foi foco de um estudo envolvendo EZ. Nesse estudo, a repetição foi associada ao fenótipo e ao nível de resposta a neurolépticos por pacientes (Joober et al., 1999).

3.6.13. SMPD1

O gene *SMPD1* codifica uma fosfodiesterase lisossômica que hidroliza esfingomielina em ceramida e fosfocolina. A atividade deficiente dessa enzima resulta nos tipos A e B da doença de Niemann-Pick (Schuchman et al., 1992; Levran et al., 1993a, 1993b), que se caracteriza pelo acúmulo de esfingomielina em alguns tecidos, incluindo o cerebral, e fenótipos tais como retardo mental e distúrbios neurológicos severos (Crocker & Farber, 1958).

3.6.14. NUDT6

FGF2 é um fator de crescimento envolvido com o desenvolvimento da neuroectoderme. O gene *NUDT6* é codificado pela fita antisense do bloco genômico que codifica *FGF2*, e parece regular sua expressão (Murphy & Knee, 1994).

O envolvimento de *NUDT6*/FGF2 na via de PI3K/AKT foi recentemente demonstrado (Gu et al., 2004), o que sugere um possível envolvimento desse gene na via sinalizadora de WNT.

3.6.15. PPT1

PPT1 é uma pequena glicoproteína responsável por remover grupos palmitato de resíduos de cisteína em proteínas modificadas por lipídeos (Camp et al., 1994). PPT1 é expressa em tecidos cerebrais, estando localizada em sinaptossomos e vesículas sinápticas, indicando um possível papel na modulação de sinapses (Lehtovirta et al., 2001). Camundongos *knockout* para PPT1 apresentam anormalidades motoras e morrem aos 10 meses de idade. O cérebro desses animais apresenta extensiva perda neuronal por elevada taxa de apoptose (Gupta et al., 2001).

3.6.16. SIM1

A proteína SIM1 é expressa no SNC e é essencial para a formação dos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo (Holder et al., 2000). Em *Drosophila*, o

homólogo desse gene tem papel fundamental na neurogênese. Devido à sua importância para a formação do hipotálamo, esse gene tem sido associado à obesidade (Holder et al., 2000; Michaud et al., 2001).

3.6.17. ALOX12

O gene codificador da lipoxigenase 12 (*ALOX12*) humana foi recentemente clonado (Sun et al., 1998), sendo este pertencente a uma família de lipoxigenases previamente conhecida. Lipoxigenases metabolizam o ácido araquidônico liberado por fosfolipídios de membrana, dando origem a produtos biologicamente ativos, os eicosanóides, que têm como principais funções a regulação de canais iônicos de membrana, além de participarem nos processos de neuromodulação e plasticidade sináptica (Piomelli, 1994). Dentre as lipoxigenases, *ALOX12* é a mais expressa em tecido cerebral (Bendani et al., 1995).

O gene *ALOX12* está mapeado no cromossomo 17p, loco previamente descrito como importante tanto para EZ, quanto para transtorno bipolar (Park et al., 2004). Recentemente nosso grupo encontrou associação entre um SNP não sinônimo (nsSNP) G/A (rs1126667), resultando na troca de uma arginina por uma glutamina no aminoácido 261 (R261Q), dentro do domínio de lipoxigenase da proteína, e o Transtorno Bipolar (Fridman et al., 2003). Ainda não existem estudos envolvendo esse polimorfismo e EZ, mas como acredita-se haver genes em comum para as duas doenças (Berrettini, 2004), *ALOX12* torna-se mais um gene candidato para este estudo.

3.6.18. FBXO16

O gene *FBXO16* foi clonado em 1999 (Winston et al., 1999) e sua expressão é detectada em cérebro embrionário de camundongo, e não em cérebro adulto (Cheng et al., 2002). Esse gene faz parte da família de proteínas F-box, que compõem subunidades do complexo SCF, o qual se liga à ubiquitina, fazendo parte, portanto, desta via proteolítica que controla a degradação de proteínas em eucariotos (Cheng et al., 2002). A expressão restrita desse gene ao cérebro embrionário sugere a sua importância durante o neurodesenvolvimento.

3.6.19. SYN1

SYN1 é a principal proteína localizada em vesículas sinápticas (Thiel, 1993), tendo como função a regulação da liberação de neurotransmissores. Foi inicialmente

descoberta e caracterizada como alvo para quinases reguladas por cAMP e calmodulina (Browning et al., 1985). Sua fosforilação resulta em uma maior liberação de neurotransmissores (Hemmings et al., 1989). Além disso, é capaz de associar-se a microtúbulos e neurofilamentos em ensaios *in vitro* (Steiner et al., 1987), tendo sido sugerido que possa ter também a função de regular a arquitetura do citoesqueleto nos terminais pré-sinápticos (Yamagata, 2003).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Baseando-nos na Hipótese do Neurodesenvolvimento para a EZ, e nos locos associados à doença, detectados por estudos de ligação, nosso estudo teve como objetivo principal avaliar a possível associação entre polimorfismos de DNA localizados em genes envolvidos com neurogênese, mapeados nos locos associados, e a EZ, em uma população Brasileira de 400 indivíduos (200 casos / 200 controles).

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Buscar, através de análises *in silico* e da literatura especializada, genes que estivessem envolvidos com neurodesenvolvimento;
- Buscar, através da revisão de estudos de ligação gênica, locos genômicos associados com EZ;
- Cruzar as informações acima obtidas, definindo um painel de genes candidatos de estudo;
- Em todos os genes candidatos, buscar polimorfismos de DNA, dando ênfase aos que pudessem ter maior impacto funcional;
- Avaliar estes polimorfismos em uma amostra Brasileira de 200 casos e 200 controles;
- Para os polimorfismos que se mostrassem associados à EZ na amostra Brasileira, procurar replicar os achados através da análise de um segundo *set* amostral, composto por amostras de casos e controles Dinamarqueses;
- Realizar, através de um programa estatístico específico, uma análise multilocus para todos os polimorfismos avaliados, procurando identificar um *set* de alterações gênicas que, quando simultaneamente herdadas, contribuiriam para a determinação do fenótipo EZ.

4.3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. Casos e controles

No total, 200 pacientes esquizofrênicos isolados (122 homens e 78 mulheres; idade média: 33.9 ± 10.4) foram selecionados, diagnosticados através de entrevistas estruturadas baseadas no DSM-IV, critério internacional já implementado no IPq/FM-USP, sob responsabilidade de nossos colaboradores clínicos (ambulatório GARPE, IPq/FM-USP), sob a coordenação clínica do Prof. Dr. Wagner Gattaz (Prof. Titular do Depto de Psiquiatria do HCFMUSP e Diretor do Laboratório de Neurociências, LIM27). Após aceitarem participar do estudo, os pacientes ou seus responsáveis assinaram um termo de consentimento informado, livre e esclarecido, contendo as propostas gerais e natureza dos estudos a serem desenvolvidos. Para cada paciente foi aplicada uma entrevista criteriosa a fim de se coletar dados clínicos relevantes para o estudo, tais como: idade de início da doença, histórico familiar de doenças psiquiátricas, subtipo de EZ, resposta a drogas, histórico de uso de álcool ou drogas, número e tempo de internações, além de avaliação de gravidade dos sintomas pela escala PANSS (do inglês: *Positive and Negative Syndrome Scale* - escala que avalia a intensidade de cada sintoma, e através da soma dos *scores* atribuídos, pode indicar a gravidade geral da doença) (Kay et al., 1987).

Para obtenção de amostras de indivíduos controle, estabelecemos uma colaboração com o Hemocentro do Hospital das Clínicas, FM-USP, que nos permitiu coletar um grande número de amostras. No total, 500 doadores foram selecionados por não possuírem histórico pessoal de doenças psiquiátricas (considerando até parentes de primeiro grau). Um pequeno volume de sangue (5 a 10 ml) foi coletado destes doadores, durante o processo de doação de sangue no Hemocentro HCFMUSP. As amostras foram coletadas após informarmos o objetivo do estudo, a após termos tido a concordância dos doadores que também assinaram o termo de consentimento informado, livre e esclarecido. Dentre as 500 amostras coletadas junto ao hemocentro, selecionamos 200 (122 homens e 78 mulheres; idade média: 36.6 ± 11) que puderam ser pareadas com os nossos casos esquizofrênicos. Os indivíduos controle selecionados são oriundos da mesma faixa econômico-social dos casos, além de estarem pareados por sexo, etnia declarada e idade, sendo esta igual ou maior a idade de início da doença dos casos, de forma a assegurar a exclusão de falsos-negativos, que ainda não tenham tido tempo de manifestar quadro psicótico compatível com EZ.

Este número de amostras a ser avaliado foi determinado de acordo com a capacidade de detecção de associação, de acordo com Glatt & Freimer (Glatt &

Freimer, 2002). De acordo com estes autores, para sermos capazes de detectar um OR de 2,5X, na nossa população de 200 casos e 200 controles, precisamos de uma frequência de 50% para os alelos variantes. Com este mesmo N amostral, devemos ser capazes de detectar associações mais fortes de acordo com a frequência dos variantes. Quando o alelo variante estiver na faixa de 20% de frequência, devemos ser capazes de observar uma associação se esta for de pelo menos 3x, ou ainda podemos detectar uma associação de pelo menos 4x (OR) com alelos que tenham uma frequência mínima de 10% nesta casuística.

O DNA foi extraído a partir de uma amostra de sangue periférico (5 a 10ml), utilizando-se protocolo baseado em *salting-out* (Laitinen et al., 1994).

Em nosso estudo utilizamos ainda um segundo grupo amostral, que foi utilizado para validar os resultados obtidos com as amostras brasileiras. Estas amostras foram gentilmente enviadas por nosso colaborador Dr. Thomas Werge, (Research Institute of Biological Psychiatry, Sct. Hans Hospital, Roskilde, Dinamarca). No total, tivemos acesso a 350 amostras de DNA de pacientes esquizofrênicos (212 homens e 138 mulheres; idade média: $43,7 \pm 12,1$) e 350 amostras de controles pareados (212 homens e 138 mulheres; idade média: $45,1 \pm 10,5$). Para cada uma destas amostras recebemos em média 2.000 ng de DNA genômico. Os pacientes foram recrutados pelos departamentos psiquiátricos de cinco hospitais da área de Copenhagen (Dinamarca), sendo diagnosticados pelo critério ICD-10. A confiabilidade do diagnóstico clínico foi confirmada em 100 destes pacientes, através do uso de entrevistas semi-estruturadas baseadas no instrumento OPCRIT (valor positivo de predição >98%) (McGuffin et al., 1991). Os controles selecionados também eram Dinamarqueses e recrutados da mesma área geográfica de Copenhagen, tendo sido pareados aos pacientes por sexo e idade. Essas amostras foram analisadas apenas para os polimorfismos que se mostraram promissores em nosso estudo, servindo como validação externa.

4.3.2. Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisas do HCFMUSP, tendo sido aprovado na reunião de 19/12/2002 (protocolo nº 1070/02).

4.4. COLETA DE DADOS DE MORFOMETRIA CEREBRAL

Para 25 dos pacientes esquizofrênicos incluídos no estudo, dados de morfometria cerebral foram coletados pelo Dr. Paulo Clemente Sallet, do IPq/FM-USP. Imagens estruturais seriadas do cérebro, obtidas através de Imagem de Ressonância Magnética (IRM), foram obtidas utilizando o scanner 1.5T Philips Gyroscan S15-ACS, e transferidas para a estação de trabalho SUN, na qual as medidas foram feitas manualmente, através do software Gyroview-HR2.1. As regiões de interesse foram escolhidas baseando-se nas que têm sido mais frequentemente descritas na literatura como associadas à EZ. Foi dado foco especial às alterações nos ventrículos, hipocampo, planum temporale e ao índice de girificação cortical, por serem os achados morfométricos mais relevantes nesta doença. Detalhes mais técnicos e anatômicos a respeito das análises encontram-se em Sallet et al. (Sallet et al., 2003a; Sallet et al., 2003b).

4.5. SELEÇÃO DE GENES E POLIMORFISMOS CANDIDATOS

4.5.1. Seleção de genes candidatos.

Inicialmente, foi feita seleção de genes de interesse de estudo. Para serem selecionados, os genes deveriam:

- Apresentar expressão em cérebro, especialmente em cérebro de embriões. Esses dados foram obtidos através da análise de dados de projetos de transcriptoma, disponíveis em bancos de dados de ESTs (*expressed sequence tags*) e SAGE (*Serial analysis of gene expression*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - links para Gene, Unigene, Sage, Omim, PubMed, etc.), além de dados da literatura.
- Estar preferencialmente mapeados dentro dos locos genômicos comprovadamente associados à EZ. No caso de o gene selecionado não estar em uma dessas regiões, o critério de seleção do mesmo foi a existência de estudos comprovando seu envolvimento com neurogênese e, algumas vezes, sugerindo sua importância na EZ.
- Ter função relacionada com desenvolvimento neuronal (tais como: direcionamento axonal, formação de sinapses, diferenciação neuronal, etc), ou com o SNC. A base desta seleção foi a literatura científica especializada, além de bancos de dados, tais como Gene Ontology (<http://www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>).

- Apresentarem polimorfismos de interesse, validados *in silico*, e com provável repercussão funcional.
- No caso de microRNAs selecionamos alguns com função ligada ao desenvolvimento do SNC (de acordo com os estudos de Krichevski et al., 2003; Miska et al., 2004 e Smirnova et al., 2005), que possuísem ortólogos humanos conservados a nível de seqüência primária, e estivessem mapeados em locos importantes para EZ. Por último, apenas os que tiveram polimorfismos identificados através de reseqüenciamento de um set de amostras (descrito detalhadamente adiante) tiveram seu estudo continuado.

4.5.2. Seleção de Polimorfismos Candidatos.

A seleção dos polimorfismos candidatos para este estudo de associação foi feita através de diferentes etapas:

1) Seleção inicial, priorizando polimorfismos com provável repercussão funcional: A estratégia desse estudo foi focar principalmente os polimorfismos com provável repercussão funcional, buscando identificar alterações causais, e não marcadores de bloco haplotípico, que estivessem em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo causal. Para isso, selecionamos principalmente nsSNPs, SNPs localizados em região promotora, ou microssatélites e INDELs localizados em região codificadora. Para identificação desses polimorfismos utilizamos buscas no dbSNP, além de BLAST contra ESTs e seqüências NR. No caso de microRNAs, por não existirem dados referentes a SNPs no banco de dados dbSNP, buscamos novos SNPs através do re-seqüenciamento de um fragmento de aproximadamente 400pb contendo o microRNA. O re-seqüenciamento foi feito, para todos os miRNAs selecionados, em um set de 96 amostras controle providas de diferentes etnias, e alinhamos as seqüências utilizando o software SIP ("Sistema de Identificação de Polimorfismos", desenvolvido pela Scylla Bioinformática, Campinas, SP, Brasil, em conjunto com o nosso laboratório), capaz de identificar variações encontradas entre as seqüências. Selecionamos para maior estudo os SNPs identificados nesse fragmento, mesmo quando localizados fora dos 22 nucleotídeos no microRNA, pois poderiam estar afetando o processamento do transcrito primário, e por consequência, a produção dos microRNAs candidatos.

2) Validação *in silico*: O seqüenciamento completo do genoma humano, aliado a diversos projetos complementares de seqüenciamento de transcriptomas, gerou um grande acúmulo de dados de seqüências humanas nos bancos de dados. Estes dados permitem uma cobertura variável do genoma, mas encontramos blocos com boa

redundância no seqüenciamento, o que geralmente ocorre nas regiões codificadoras, graças às ESTs (*Expressed Sequence Tags*) geradas por diversos projetos. Nestas regiões, temos várias seqüências cobrindo a mesma região, o que permite detectar discrepâncias, que podem ser erros de seqüenciamento (muito comuns nas ESTs) ou eventuais polimorfismos de DNA.

Devido a erros de seqüenciamento, encontrados em seqüências dos bancos de dados, mas com maior freqüência nas ESTs, antes de iniciarmos a confirmação da existência dos SNPs em bancadas, fizemos anteriormente uma confirmação *in silico*, de modo a reduzir a probabilidade de seleção de SNPs falsos, causados por artefatos de seqüenciamento. Deste modo, apenas os SNPs que foram confirmados por mais de uma seqüência de bancos de dados (no caso de ESTs, quando estas vinham de bibliotecas de cDNA diferentes), foram selecionados para a validação em bancada. Avaliamos os tipos de alterações sugeridos, com especial atenção às trocas G:A e C:T, erros mais freqüentemente gerados pelas DNA polimerases (Kunkel, 1985b, 1985a). Todos os polimorfismos selecionados para esse estudo passaram inicialmente por esta validação *in silico*, realizada através de análises utilizando a ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), contra os bancos NR e dbEST. Para alguns SNPs encontramos validações prévias feitas pelo próprio banco de dados dbSNP, ou pela empresa Applied Biosystems (USA), que disponibiliza os dados desta validação, que incluem a freqüência do SNP para diferentes populações (www.appliedbiosystems.com). No caso de microssatélites, variações no número de repetições deveriam ser encontradas nas seqüências genômicas ou de ESTs que cobrissem a região polimórfica.

3) Validação *in vitro*: Após a seleção e validação *in silico* dos polimorfismos candidatos, foi feita uma validação *in vitro* de sua existência, através da genotipagem de 100 alelos (50 de casos e 50 de controles). O polimorfismo foi considerado validado quando pelo menos um dos 100 alelos genotipados continha a variação esperada. Caso isso não ocorresse, o estudo do polimorfismo era descontinuado, pois ou essa variação aparentemente é artefactual, ou se encontra com freqüência inferior à necessária para esse estudo.

4) Determinação de freqüência: Após a validação *in vitro*, os polimorfismos selecionados tiveram sua freqüência determinada através da genotipagem de 400 alelos. Apenas os polimorfismos encontrados com freqüência maior que 5% tiveram seu estudo continuado, pois o estudo dos polimorfismos com freqüência menor que esta necessitaria de uma amostragem maior que a utilizada em nosso estudo.

5) Genotipagem de todas as amostras do estudo: Todos os polimorfismos que resistiram às análises anteriores de seleção, tiveram seu estudo continuado até completarmos todas as amostras brasileiras (200 casos e 200 controles). Após essa genotipagem, análises estatísticas foram realizadas e o prosseguimento com o estudo do gene foi definido de acordo com os resultados estatísticos obtidos.

6) Os polimorfismos que demonstraram associação estatisticamente significativa ($P < 0.05$) dentro das amostras brasileiras, tiveram sua associação com a EZ desafiada com amostras de casos e controles dinamarqueses.

O Fluxograma mostrado na figura 7 ilustra as etapas acima descritas.

Figura 7: Fluxograma - Etapas de avaliação dos polimorfismos de DNA incluídos no estudo.

4.6. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

4.6.1. Genotipagem de SNPs

Quatro diferentes abordagens foram utilizadas para genotipar SNPs nesse estudo:

Seqüenciamento direto: Inicialmente, a região genômica contendo o polimorfismo foi mascarada (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>) e utilizada para o *design* de iniciadores flanqueando o polimorfismo, com auxílio do software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Os fragmentos foram amplificados por PCR, e analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os segmentos amplificados foram então submetidos a técnicas padrão de seqüenciamento utilizando-se o método de terminação de cadeia, com dideoxinucleotídeos fluorescentes (BigDye Terminator cycle Sequencing Kit – Applied Biosystems) e analisados em um seqüenciador automático de DNA ABI3100 (Applied Biosystems). As seqüências foram analisadas com os softwares SeqAnalysis (Applied Biosystems) ou Chromas (versão 2.13 – Technelysium). A tabela 4 a seguir mostra os genes avaliados por esse método, bem como as seqüências dos oligos utilizados, e a figura 8 ilustra a genotipagem de um SNP por seqüenciamento.

Os genes avaliados por esse método foram: *NUDT6/FGF2*, *HEYL*, *SYN1*, *NETO1*, *FBXO-16* e *SIM1*.

Tabela 4: Genes avaliados por seqüenciamento direto.

GENE	OLIGOS UTILIZADOS PARA PCR	TAMANHO DO FRAGMENTO	OLIGONUCLEOTÍDEO UTILIZADO PARA SEQÜENCIAMENTO
<i>NUDT6</i>	NUDT6F 5' ACACAGCGGTTTCGAGAAGTT3' NUDT6R 5' TGCTGGTGATGGGAGTTGTA3'	240pb	NUDT6R
<i>HEYL</i>	HEYLF 5' GAGCATTGGTTTTCGGGAGT3' HEYLR 5' GATGATGCCTGTGGCTCTG3'	337pb	HEYLF
<i>SYN1</i>	SYN1F 5' CTGCCATAACCCCAATGTCT3' SYN1R 5' CTAGCTTCTTTGCCCTCCT3'	424pb	SYN1F
<i>NETO1</i>	NETO1F 5' CTTTGCAGATGTGGCAGATG3' NETO1R 5' TGGACGGCTTTATCGTGTCT3'	321pb	NETO1F
<i>FBXO-16</i>	FBXOF 5' AACACCACCACCACCAAT3' FBXOR 5' GTATTGAAATCTACCCATACGC3'	575pb	FBXOF
<i>SIM1</i>	SIM1F 5' AATCCAGGTGCTTGTGGAAG3' SIM1R 5' CTTCAAGTTCAAACCATGTCG3'	374pb	SIM1R

Figura 8: Genotipagem do SNP C/A (rs1908916), no íntron 1 do gene FBXO16, através de seqüenciamento direto.

Os eletroferogramas foram obtidos através de análise em ABI3100 e software SeqAnalysis (Applied Biosystems). As setas vermelhas apontam para a base polimórfica. A- Genótipo homozigoto C/C. B- Genótipo heterozigoto. C- Genótipo homozigoto A/A

Seqüenciamento de base única: Inicialmente, a região genômica contendo o polimorfismo foi amplificada por PCR, e os produtos analisados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. Em seguida, os segmentos amplificados foram submetidos a uma reação de seqüenciamento de base única (Snapshot Multiplex Kit, Applied Biosystems), utilizando apenas um terceiro oligonucleotídeo iniciador, cuja extremidade 3' era adjacente à base polimórfica, e apenas os dideoxinucleotídeos (ddNTPs), que levavam ao término da elongação logo após a sua inserção, de modo complementar à base polimórfica. Os fragmentos resultantes desse seqüenciamento foram injetados em um seqüenciador automático de DNA ABI3100 (Applied Biosystems). As variações foram analisadas através do software GenScan (Applied Biosystems). Através do uso de oligos de diferentes tamanhos na reação de seqüenciamento de base única, foi possível fazer reações multiplex que permitiram a genotipagem simultânea de alguns SNPs. A tabela 5 a seguir mostra os genes avaliados por esse método, bem como as seqüências dos oligos utilizados, e a figura 9 ilustra a genotipagem de SNPs por SnapShot. Os genes avaliados por esse método foram: *JAG2*, *NEUROD2*, *NUMB*, *WIF1*, *RELN*, *BDNF*, *PCDH12*, *PCDHB11*, *SMPD1*.

Tabela 5: Genes avaliados por Sequenciamento de Base Única

GENE	PRIMERS UTILIZADOS PARA PCR	TAMANHO DO FRAGMENTO	PRIMER UTILIZADO PARA SNAPSHOT
<i>JAG2</i>	JAG2F 5'AGGGCATCAACTGCCATATC3' JAG2R 5'CTGCCCTACAGCTCCCAGAG3'	463pb	JAG2SNAP 5'GCGAGCTGGAACGAGAC3'
<i>NEUROD2</i>	NEUROF 5'TCCGTGGAGAAGAGGGGACGGAG3' NEUROR 5'TTGTCCAGGGCTGCGTTCAGGTC3'	252pb	NEUROSnap 5'AAAAACGAGCGGCCCAAGAAG 3'
<i>NUMB</i>	NUMBF 5'AGGACCTAGAGGGCTTTCG3' NUMBR 5'AGGAAAACCTCGGAAAGAGC3'	280pb	NUMBSnap 5'AAAAAAGCATCAGAAGTAGGAGAG3'
<i>WIF1</i>	WIF1F 5'AAAGAACTGCAAGGAAAGCAA3' WIF1R 5'AGCCAAGAAACCGAAGTGAA3'	282pb	WIF1SNAP 5'AAAAAAAAACTTTTGATTCTAGCTGTCTG3'
<i>RELN</i>	REELINF 5' AAGCTGGGTTTGATTGTGC 3' REELINR 5' TGCTATTGTGCTTAACCTTGCCT3'	267pb	REELINSnap 5'AAAAAAAAAAAAAAAAAATGGAGGAGAGTCATAGTG3'
<i>BDNF</i>	BDNFF 5'AAACATCCGAGGACAAGGTG3' BDNFR 5'AGAAGAGGAGGCTCCAAAGG3'	249pb	BDNFSnap 5' AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTGACACTTTTGAACAC 3'
<i>PCDH12</i>	PC12F 5'TTGTGGCAAGAGATGCAGAC3' PC12R 5'CTGGCATTGGTGACATTGAC3'	130pb	PC12SNAP 5'AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCTCTACAGCATCCGCA 3
<i>PCDHB11</i>	PC11F 5'TGGTGGACAAGTCAGAGACG3' PC11R 5'TCCTTTGCCAGATTGCCTAC3'	222pb	PC11SNAP 5'AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAGAACCAAGGGACAC 3'
<i>SMPD1</i>	SMPDF 5'AGTTGGTGGGATAGGGGAAG3' SMPDR 5'CATAGGTTTCTCGAGCCCTG3'	271pb	SMPD1SNAP 5'AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGATGGAACTACTCC 3'

Figura 9 – Genotipagens por seqüenciamento de base única.

Picos laranja denotam o padrão de tamanhos em pares de bases. Picos de outras cores correspondem aos alelos genotipados (verde- A; azul – G; preto- C; vermelho- T). A a D – genotipagens de um único SNP; E e F – Reação de genotipagem de três SNPs (em BDNF, PCDHB11 e SMPD1) simultaneamente (triplex).

PCR-RFLP: Alguns dos SNPs estavam localizados em sítios reconhecidos por enzimas de restrição. O desenho dos iniciadores, a PCR e o modo de análise dos fragmentos foram feitos como descrito anteriormente. Para todos os nossos ensaios, nós determinamos as regiões-alvo a serem amplificadas, posicionando os iniciadores de modo que o fragmento resultante tivesse dois sítios de restrição para as enzimas selecionadas. Além de cortarem os sítios que continham os polimorfismos, cortam também outro sítio não polimórfico do fragmento, gerando uma banda que independe do genótipo da amostra avaliada, que serviu como controle positivo de digestão, reduzindo muito eventuais erros de genotipagem. As bandas amplificadas foram digeridas com enzimas de restrição e os produtos foram analisados em géis de poliacrilamida corados com prata (*ADAMTS4* e *FLNB*), de acordo com Sanguinetti et al. (Sanguinetti et al., 1994) ou em géis de agarose corados com brometo de etídio (*FZD3*). A tabela 6 lista os genes avaliados por PCR-RFLP, os oligos e enzimas utilizadas, bem como os mapas de restrição conforme os genótipos observados, e as figuras 10 a 12 ilustram os resultados das análises por RFLP. Os genes avaliados por esse tipo de análise foram: *FZD3*, *ADAMTS4*, *FLNB*.

Tabela 6: Genes avaliados por PCR/RFLP

GENE	OLIGOS PARA PCR	TAMANHO DO FRAGMENTO DA PCR	ENZIMA DE RESTRIÇÃO UTILIZADA	PERFIL DE RESTRIÇÃO DE ACORDO COM GENÓTIPO		
				0/0	0/1	1/1
<i>FZD3</i>	FZD3F 5´AGGTGTAGGTGGTCCTGCAATCA3´ FZD3R 5´CCACACTCGCCGCTCCTTCTC3´	492pb	Eco88I	214pb 206pb 72pb	420pb 214pb 206pb 72pb	420pb 72pb
<i>ADAMTS4</i>	ADAMTS4F 5´GGTGGTGTCCAGTTCTCCTC3´ ADAMTS4R 5´TGAGTGGAATCCTGGACTGG3´	687pb	HpaII / MspI	471pb 170pb 46pb	641pb 471pb 170pb 46pb	641pb 46pb
<i>FLNB</i>	FLNBF 5´CCGTCTCTTACCTTCCACA3´ FLNBR 5´CTTTGATCCTGCTGGTGTCC3´	411pb	TaqI	230pb 142pb 39pb	269pb 230pb 142pb 39pb	269pb 142pb

Legenda: Genótipos 0/0: homozigoto selvagem; 0/1: heterozigoto; 1/1: homozigoto para o polimorfismo.

Figura 10: Resultado da análise por PCR-RFLP do polimorfismo de ADAMTS4, analisado em gel de poliacrilamida 8% corado com prata.

As setas, do lado direito do gel, indicam as bandas diagnósticas do genótipo. L: Marcador de tamanho (100pb). Canaletas 1, 6, 8 e 11: homozigotos GG; canaletas 2, 4, 5, 7, 9 e 10: heterozigotos GA; Canaleta 3: homozigoto AA.

Figura 11: Resultado da análise por PCR-RFLP do polimorfismo de FLNB, analisado em gel de poliacrilamida 8%.

L: Marcador de escala de 100pb. Canaletas 6 e 11: homozigotos GG; 3, 4, 5, 7, 8, 9 E 10: heterozigotos GA; 1 E 2: homozigoto AA.

Figura 12: Análise por PCR-RFLP do polimorfismo de *FZD3*, analisado em gel de agarose 1,5%.

L: Marcador de escala de 100pb. Canaletas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 14 e 15: homozigotos CC; 8 e 16: heterozigotos CT; 13: homozigoto TT.

PCR em Tempo Real: Nessa abordagem são desenhados oligonucleotídeos flanqueando a região polimórfica para amplificação dos produtos por PCR, além de duas sondas que se anelam sobre uma pequena sequência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos. Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente ("dye reporter"), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada "quencher". Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os "dyes reporters" e os "quenchers" impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a *Taq* polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do "dye" repórter e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela será detectada. Como cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente, através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra. É importante citar que além do "dye" repórter e da molécula "quencher", uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) também está afixada à sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo uma ligação mais específica, e evitando que ela se ligue inespecificamente à sequência correspondente ao outro alelo.

A detecção da fluorescência emitida na reação é feita por uma câmara CCD localizada no aparelho ABI7300 ou ABI7500 (Applied Biosystems), capaz de detectar diferentes comprimentos de onda e os genótipos são determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Os oligos e sondas foram preparados pela empresa Applied Biosystems. Alguns dos ensaios que selecionamos já se encontravam prontos e padronizados pela empresa. Para outros, desenhamos os ensaios, e encomendamos a sua síntese. Ensaios foram encomendados para polimorfismos dos genes: *WNT7a*, *PCDH3a*, *DLL1*, *ASPM*, *NRG1*, *ADAM22*, *FLNA*, *NOTCH3*, *MAP1B*, *NEFH*, *SEMA3D*, *SEMA6C*, *NRP1*, *NOTCH2*, *ADAM28*, *PPT1*, *ADAM15*, *AKT1* (2 polimorfismos diferentes).

Padronização do método de PCR em Tempo Real: Antes de iniciarmos as genotipagens pelo método de PCR em tempo real, realizamos uma série de experimentos de padronização a fim de otimizar o uso do ensaio e avaliar sua confiabilidade e reprodutibilidade. Em um primeiro experimento, procuramos reduzir o volume de reação de forma a reduzir proporcionalmente a quantidade de ensaio (reagente contendo os oligonucleotídeos e sondas marcadas), de *Taq* PCR Mastermix (Applied Biosystems) e de DNA utilizados. Observamos que mesmo após reduzirmos 5 vezes o volume total de reação (indo dos 25ul propostos pelo fabricante, para 5ul

finais), os sinais de fluorescências ainda eram detectáveis e bastante confiáveis. A plataforma na qual é realizada a reação de PCR em tempo real permite a detecção e acompanhamento de nível de fluorescência emitida ao final de cada ciclo de PCR. Entretanto, ensaios envolvendo genotipagens de SNPs requerem leituras do tipo “end-point”, nas quais é necessária apenas uma leitura, ao final da reação, na qual são analisados os comprimentos de onda correspondentes à emissão de fluorescência de cada fluoróforo distinto. Dessa forma, foi possível gerar os amplicons em termocicladores usuais disponíveis em nosso laboratório, sendo posteriormente feitas as leituras de fluorescência emitida no aparelho. Para algumas amostras, realizamos ambos os processos (leitura em tempo real e leitura do tipo end-point) a fim de avaliar a reprodutibilidade e confiabilidade do protocolo, e em 100% dos casos obtivemos correspondência entre os genótipos obtidos. A determinação dos genótipos, após a leitura “end-point”, pode ser feita manualmente, ou pelo próprio software. Para determinação dos genótipos, usamos as duas alternativas, de forma a compará-las e verificar se correspondiam entre si. Em 100% dos casos as determinações feitas manualmente foram idênticas às feitas através do software. Essa comparação foi muito importante no sentido de aumentar a confiabilidade dos genótipos gerados.

As informações detalhadas dos ensaios solicitados se encontram nas tabelas 7 e 8, e a figura 13 ilustra os resultados obtidos com esse tipo de análise.

Tabela 7: Genes avaliados por PCR em tempo real (Assays by Design - Applied Biosystems)

GENE	SEQÜÊNCIAS DOS INICIADORES (F e R)	SEQÜÊNCIAS DAS SONDAS (A e B)	MARCAÇÃO Sonda A	MARCAÇÃO Sonda B
<i>AKT1</i>	AKT1F 5'TCTGTGGCGCGTAAGTATCC3' AKT1R 5'GCCAACCCCCCAATCTGAAT3'	AKT1-A 5'CCCGAGA G GCCAAG3' AKT1-B 5'CCCGAGA A GCCAAG3'	VIC	FAM
<i>NRG1</i>	NRG1F 5'CTGGTGATCAGAGTTGTTTTTCATTCTC3' NRG1R 5'CCGATTCTGGCTTTTCATCTCT3'	NRG1-A 5'CCTCCCC G ATTGAA3' NRG1-B 5'CCTCCCC A ATTGAA3'	VIC	FAM
<i>ADAM15</i>	ADAM15F 5'AGCTGGCGGGAATCTGTAC3' ADAM15R 5'CCTCACCCGGCGAATGT3'	ADAM15-A 5'ACACTCAGA C GCCACC3' ADAM15-B 5'CACTCAGA A GCCACC3'	VIC	FAM
<i>NOTCH2</i>	NOTCH2F 5'CCAGGACACTGCCAGCAT3' NOTCH2R 5'GCACTGGCACTGGTAGGAA3'	NOTCH2-A 5'AGGCAG G TGCCACC3' NOTCH2-B 5'AGGCAG A TGCCACC3'	VIC	FAM
<i>MAP1B</i>	MAP1BF 5'CCCAAAGTTGAAAGCAAAGAAAGGT3' MAP1BR 5'CAGTCACTGAAGGTTTGGTCTCT3'	MAP1B-A 5'AAGCCA G TAAAAAC3' MAP1B-B 5'AAGCCA A TAAAAAC3'	VIC	FAM
<i>NOTCH3</i>	NOTCH3F 5'CTGGCAGTCCCAGGACATG3' NOTCH3R 5'AGGAAGCGGGCCTTTGG3'	NOTCH3-A 5'AAGCC A GTA AAAAC3' NOTCH3-B 5'CCAGCC G CCGGGTA3'	VIC	FAM
<i>FLNA</i>	FLNAF 5'CCCGCCGCCTCACT3' FLNAR 5'CAGGTGGGCGGTTTCTCT3'	FLNA-A 5'TTTCTAGCCTT C GGGTGAG3' FLNA-B 5'TTTCTAGCCTT A GGGTGAG3'	VIC	FAM
<i>ADAM28</i>	ADAM28F 5'TGTTCCCAATGGCGGTCA3' ADAM28R 5'CCTCTGATCTTTCTTCTGCTTTCTCT3'	ADAM28-A 5'CGGATT A CCATAGCAAC3' ADAM28-B 5'CCGATT A CTATAGCAAC3'	VIC	FAM
<i>PPT1</i>	PPT1F 5'GGCTCAGAGATGCCCTTCA3' PPT1R 5'AGAGGCAAAGTTACCTTGATGTTGT3'	PPT1-A 5'CTCCCATGATCAATCT3' PPT1-B 5'TCCCATG A CCAATCT3'	VIC	FAM
<i>PCDH3A</i>	PCDH3AF 5'GTGTATGTCATGAATTAGCACAATTGATAGTG3' PCDH3AR 5'TCGGTCACTCCTCAAAGTCCTTATA3'	PCDH3A-A5'AAGTTCTAAGGAAA T TTTAG3' PCDH3A-B 5'TTCTAAGGAAA G ATTTAG3'	VIC	FAM
<i>ASPM</i>	ASPMF 5'GCTGCCATTATTATTCAGAAGCATTGT3' ASPMR 5'GCACTGCAGTTAGTTTTCTGTATCTT3'	ASPM-A 5'CATTATCTCC A ATTAGAGC3' ASPM-B 5'CATTATCTCC A CTTAGAGC3'	VIC	FAM
<i>SEMA3D</i>	SEMA3DF 5'CCAGAGGGCAGAGCATGA3' SEMA3DR 5'CAACCGTGACTCAGCCAATAGAT3'	SEMA3D-A 5'CCTTGACCT T CCCCTCC3' SEMA3D-B 5'TTGACCT G CCCCTCC3'	VIC	FAM
<i>NEFH</i>	NEFH 5'CCCCAGAGAAGGCGAAATCT3' NEFHR 5'CCTCTTCTTTTGGGATCTCCTT3'	NEFH-A 5'CTGAAG G CGGATGC3' NEFH-B 5'CTGAAG G AGGATGC3'	VIC	FAM
<i>DLL1</i>	DLL1F 5'GCACCCTGCCACAATGG3' DLL1R 5'GTAGCTTCGGGCACATTGCG3'	DLL1-A 5'ACACATAG C GTGGCC3' DLL1-B 5'CACATAG C GTGGCC3'	VIC	FAM
<i>SEMA6C</i>	SEMA6CF 5'GGCTCCAATGATGGGACAGT3' SEMA6CR 5'GGAGGATGGGCTCAGGTC3'	SEMA6C-A 5'AAGGTGCT G CCCCAG3' SEMA6C-B 5'AGGTGCT A CCCCAG3'	VIC	FAM
<i>NRP1</i>	NRP1F 5'CTGCATGACCTTCTGGTATCACAT3' NRP1R 5'CTTCTGGTAGCGAGTTTGAC3'	NRP1-A 5'CCCA C ATCGGCACAC3' NRP1-B 5'CC A CGTCGGCACAC3'	VIC	FAM
<i>ADAM22</i>	ADAM22F 5'GACGCGCTCGACACG3' ADAM22R 5'CCGGACCGAGCCTCTC3'	ADAM22-A 5'ACCTG C GGGCCAC3' ADAM22-B 5'ACCTG C GGGCCAC3'	VIC	FAM

Tabela 8: Genes avaliados por PCR em tempo real (Assays on Demand - Applied Biosystems)

GENE	CÓDIGO DO ASSAY	MARCAÇÃO SOND A	MARCAÇÃO SOND B	SEQÜÊNCIA CONTEXTO
<i>AKT1</i>	C__11785055_10	VIC	FAM	CACAGGACACCCGGAATGGGCTGGA[A/G]AGGAGGGTATGCAGCAGAAGGGACT
<i>WNT7A</i>	C__9382099_10	VIC	FAM	AGGGGACTTTCGACAAGGTCGAAAA[C/G]GTCTAGAAGACCTGGACAGGGTCAG

Figura 13 – Genotipagem por PCR em tempo Real.

O quadro superior representa resultado da genotipagem. As curvas azul e vermelha representam a amplificação de sinal de ambos os fluoróforos VIC e FAM, de acordo com o número de ciclos de PCR, caracterizando o genótipo de um heterozigoto. O quadro inferior representa um resultado geral para todos os indivíduos genotipados na ocasião. Pontos vermelhos representam homozigotos para alelo 1, verdes representam heterozigotos e azuis homozigotos para alelo 2.

4.6.2. Genotipagem de microssatélites

Para avaliar expansões ou contrações de microssatélites, usamos iniciadores com marcação fluorescente na reação de PCR, seguido de análise dos produtos em aparelho ABI3100 (Applied Biosystems) e softwares específicos para análise dos fragmentos (GeneScan e Genotyper, Applied Biosystems). Antes de sintetizar os oligos fluorescentes, desenhamos oligos normais com os quais padronizamos as reações e confirmamos o *status* polimórfico dos fragmentos por ensaios de seqüenciamento ou ensaios de formação de heteroduplex. Os genes analisados por essa abordagem foram: *ASCL1*, *RAI1* e *NUMBL*. A tabela 9 descreve a seqüência dos oligos utilizados nas reações, bem como o tamanho dos fragmentos obtidos e o tipo de marcação utilizada em um dos oligos. A figura 14 ilustra os resultados desse tipo de análise.

Tabela 9: Genes avaliados por Análise de Tamanho de Fragmento

GENE	OLIGOS PARA PCR	TAMANHO DO FRAGMENTO	MARCAÇÃO FLUORESCENTE
<i>ASCL1</i>	ASCLF 5'GCATGGAAAGCTCTGCCAAGATGGAG3' ASCLR 5'CTTGACTTGCTTGGGCGCTGACTTGT3'	250pb (banda com 12 repeticoes) podendo variar em múltiplos de 3.	6-FAM
<i>RAI1</i>	RAIF 5'CAGGAAACCCTCCATTACCA3' RAIR 5'TGGTAGTACTGCTCTGGGGG3'	162pb (banda com 13 repeticoes) podendo variar em múltiplos de 3	6-FAM
<i>NUMBL</i>	NUMBLF 5'GGACACCTTCAGAGGCTGAG3' NUMBLR 5'GCAGGAACACGGCCACTTG3'	216pb (banda de 20 repeticoes) podendo variar em múltiplos de 3	6-FAM

Figura 14- Genotipagem do microssatélite CAG de RAI1.

Picos laranjas representam marcador de pares de bases. Picos azuis representam alelos genotipados de acordo com tamanho de fragmento obtido. A, D e E são heterozigotos e B e C são homozigotos.

4.6.3. Análise de inserções ou deleções

Para a análise de uma inserção no gene NOGO (RTN4) e de uma deleção de 16.7kb no cluster a de protocaderinas, utilizamos PCR seguida de eletroforese e determinação do tamanho das bandas obtidas. No caso do gene NOGO, a inserção analisada é a inclusão de três nucleotídeos na sequência do 3'UTR do mRNA do gene. Foram desenhados oligos flanqueando a região polimórfica (NOGOF 5' TCAACATGAAATGCCACACA3' e NOGOR 5' CAGTCAGTCTGTGCAATGAAA3') gerando um fragmento de 60pb ou 63pb de acordo com a ausência ou presença da inserção. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, com posterior coloração com nitrato de prata, havendo nítida determinação dos genótipos (figura 15). Esse método de genotipagem em multiplex, por nós desenvolvido, permitiu uma análise mais rápida, mais robusta e menos onerosa desta inserção, quando comparado aos métodos previamente utilizados para a tipagem deste polimorfismo, baseados em seqüenciamento (Novak et al., 2002) ou curvas de desnaturação (Covault et al., 2004).

No caso da deleção no cluster de protocaderinas, também desenvolvemos uma reação em multiplex de modo a simplificar o protocolo original, o qual era baseado na realização de duas PCR distintas para cada amostra, e que era utilizado para analisar o evento (Noonan et al, 2003). Utilizamos dois pares de oligos na mesma reação, estando um par localizado dentro da região deletada (DELPCF 5'-GTGATTCGGGGTAATTTGGATTTT-3' e DELPCR 5'-ACAAATTCATGGCATTGGTGT-3') e o outro par flanqueando esta região (HETPCF, 5'-CAGGGATAAGAAAACCACAATCAA-3'; HETPCR 5'-CCACATTGCGAGGATCAGAAG-3'). O produto gerado pela amplificação com os oligos internos é de 469pb enquanto que o gerado pela amplificação com os oligos externos tem 554pb, e só aparece na presença da deleção (caso contrário eles se encontram separados por cerca de 17Kb, o que impede a sua amplificação), podendo as bandas serem visualizadas e prontamente distinguidas por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (figura 16).

Figura 15: Produtos de PCR de NOGO analisados em gel de poliacrilamida 12% corado com Nitrato de Prata.

1, 4, 7, 8, 10 e 11: homozigotos sem inserção; 2, 3, 6 e 9: heterozigotos (H: heteroduplex); 5, 12 e 13: homozigotos com inserção. As bandas esperadas são mostradas pelas setas. As duas bandas superiores são derivadas de heteroduplex e, como pode ser visto, apenas surgem nos heterozigotos.

Figura 16: Produtos de PCR para análise da deleção de protocaderinas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Canaletas 1, 2, 5, 6 e 7: homozigotos sem deleção; Canaletas 3, 4 e 8: heterozigotos apresentando deleção de um dos alelos.

4.7. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE NOVOS SNPS EM MICRORNAS

Para cada um dos 9 microRNAs selecionados para análise, fizemos uma análise utilizando o banco de dados miRBase, do Sanger Institute (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) de forma a caracterizar as seqüências do microRNA maduro e de seu precursor. Em seguida, desenhamos oligonucleotídeos iniciadores, com auxílio do software "primer3" (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), de modo a amplificar um fragmento de aproximadamente 400pb que contivesse a seqüência do miRNA maduro e seu precursor (tabela 10). No total, 96 amostras de DNA de pacientes esquizofrênicos de diferentes etnias (18 negros, 9 asiáticos, 24 pardos e 45 brancos) foram amplificadas por PCR para cada miRNA. Para fragmentos com alto conteúdo de GC, betaína na concentração final de 1M foi adicionada à reação. Os amplicons foram em seguida seqüenciados, e analisados conforme descrito anteriormente. As seqüências obtidas foram alinhadas usando o software SIP ("Sistema de Identificação de Polimorfismos", Scylla Bioinformática, Campinas, SP, Brasil) de forma a identificar polimorfismos para posterior análise em todo o nosso set amostral. A figura 17 ilustra a identificação de um SNP através do alinhamento de seqüências no SIP.

Tabela 10: Iniciadores utilizados para amplificação dos miRNAs por PCR.

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores		Fragmento amplificado (pb)
	Forward (5' -3')	Reverse (5' -3')	
MIR-18	AAATAGCAGGCCACCATCAG	CCTTGTAAGAACTGAAGATTGTGA	399
MIR-199B	GTCGGTCCAGCTCTCCAGT	TCGGGGTTGGACACTAGGTA	412
MIR-206	CTCTTGCTTCCTTGGTGAGG	GGAAACGTGGTGCTGCTTAT	420
MIR-210	CCGAATGATTTCGCTTACCC	CTGAAGTTGGGCCGAGAG	461
MIR-211	TGGCCATGACAGATCACACT	CGAAGAATACATTGGTCGATGA	700
MIR-221	GGGAGAAGGAAGGAAGGATG	CCCAGCATTTCTGACTGTTG	456
MIR-222	CCAGATTCTCCCTTGTGA	CATGATCCAAAGAAAATGTGCAA	467
MIR-266	CCCTCCCTATAACCCTCACC	GGATGATTCTCCAGCTCTGC	466
MIR-320	CTCCCCGACTCTTAAGTCCA	GTCACAACCTCACCTGCAAC	457

Após a análise por reseqüenciamento dos fragmentos amplificados para esses 9 miRNAs, tendo identificado SNPs com freqüência acima de 5% em cinco deles (tabela 11), estes foram selecionados para análise em nosso estudo. Apesar de os SNPs identificados não estarem situados dentro do miRNA maduro ou de seu precursor, optamos por estudá-los mesmo assim pois podem estar mapeados no transcrito primário destes genes, afetando seu processamento, e consequentemente a produção do miRNA maduro.

Figura 17: Alinhamento de seqüências obtidas durante análise de polimorfismos em região genômica contendo o microRNA MIR-211, através do software SIP.

O quadro superior mostra o alinhamento das seqüências e, destacadas pela barra vertical, estão as bases variantes para aquela posição, caracterizando um SNP G/A. O quadro inferior mostra os eletroferogramas de duas das seqüências alinhadas no quadro acima, podendo ser vistas as bases G ou A para o SNP (setas vermelhas).

Tabela 11. Descrição dos SNPs identificados após análise por reseqüenciamento dos fragmentos contendo os miRNAs de interesse.

miRNA	Mapeamento	Sequencia (miRNA maduro)	Polimorfismo encontrado	Distância a partir do miRNA maduro	Frequência	Código dbSNP
<i>mir-18</i>	13q31.3	5'TATCTGCACTAGATGCACCTTA3'	SNP A/C	- 70 bp	0.5%	Novo SNP
<i>mir-199b</i>	9q34.11	5'GAACAGATAGTCTAAACACTGGG3'	-	-	-	-
<i>mir-206</i>	6p12.2	5'CCACACACTTCCTTACATTCCA3'	SNP T/G	+ 207 bp	26.8%	Novo SNP
<i>mir-210</i>	11p15.5	5'CAGCCGCTGTACACGCACAG3'	SNP A/G	+ 77 bp	48%	rs7395206
<i>mir-211</i>	15q13.3	5'AGGCAAAGGATGACAAAGGGAA3'	SNP G/A	- 157 bp	45%	rs919001
<i>mir-221</i>	Xp11.3	5'GAAACCCAGCAGACAATGTAGCT3'	-	-	-	-
<i>mir-222</i>	Xp11.3	5'GAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCT3'	-	-	-	-
<i>mir-266</i>	22q11.21	5'CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT3'	SNP C/G	- 116 bp	16.5%	rs861843
<i>mir-320</i>	8p21.3	5'TCGCCCTCTCAACCCAGCTTTT3'	SNP T/G	+ 173 bp	9%	Novo SNP

Estão destacados em negrito os miRNAs que tiveram SNPs em sua proximidade selecionados para análise neste estudo. A frequência dos SNPs mostrada nesta tabela é referente à encontrada após análise do set de 96 amostras de DNA por reseqüenciamento.

Para os SNPs identificados em *MIR-320*, *MIR-266* e *MIR-210* fizemos sua genotipagem através de seqüenciamento direto de produtos de PCR. Para análise dos SNPs de *MIR-206* e *MIR-211* conseguimos identificar enzimas de restrição que permitiram o uso de ensaios de PCR-RFLP. Em ambos os casos, buscamos e encontramos enzimas que apresentavam dois sítios de digestão dentro do fragmento amplificado (um associado ao polimorfismo e o outro independente deste). Deste modo, controles internos de digestão foram disponíveis em todos estes ensaios realizados. No caso de *MIR-206* a enzima utilizada foi *HphI* e para *MIR-211* utilizamos a enzima *XcmI*. O perfil de digestão esperado a partir de cada um dos genótipos destes polimorfismos é apresentado na tabela 12 a seguir:

Tabela 12: Perfil de digestão obtido para a análise dos polimorfismos de MIR-206 e MIR-211

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores	
	Genótipo	Perfil de digestão
MIR-206	TT	25, 26, 369
	TG	25, 26, 307, 369
	GG	25, 26 62, 307
MIR-211	GG	102, 198, 400
	GA	102, 198, 400, 598
	AA	102, 598

As bandas que permitem a determinação do genótipo estão marcadas em negrito. As demais referem-se aos controles positivos da digestão.

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os polimorfismos estudados neste trabalho foram descritos inicialmente em função das frequências genotípicas e frequências alélicas, encontradas neste estudo. A

conformidade entre as frequências genótípicas observadas e as frequências genótípicas esperadas sob a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi investigada utilizando o teste de qui-quadrado e testes exatos, os quais são mais robustos, principalmente quando a tabela de contingência apresenta células com valores muito baixos. Estes cálculos foram realizados através de algoritmos implementados em uma ferramenta web (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para populações humanas, a maioria dos locos apresenta frequências genótípicas em conformidade com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Desvios destas expectativas normalmente estão associados a erros de genotipagem, estratificação populacional ou em caso de grupos de indivíduos afetados, uma associação entre o loco e susceptibilidade a doença em questão (Wigginton et al., 2005).

A associação individual entre cada polimorfismo e o fenótipo EZ foi calculada através de teste exato, qui-quadrado e teste de tendência de Armitage (Sasieni, 1997). Significância estatística foi considerada quando obtido um $\alpha \leq 0,05$ para o parâmetro analisado.

O fato de que a maioria das doenças comuns em humanos são causadas por complexas interações entre múltiplos genes e fatores ambientais torna interessante a possibilidade de testarmos estas interações. Este aspecto é particularmente importante quando tratamos de doenças complexas, onde alterações de pequeno efeito, em múltiplos genes, se somam para determinar a doença. Em situações como esta as análises de locos individuais tendem a perder poder em detectar estas associações a não ser que números realisticamente impossíveis de casos e controles sejam estudados (Wille et al., 2003; Zondervan & Cardon, 2004). Com a disponibilidade e possibilidade de investigar múltiplos marcadores em estudos de associação, o desenvolvimento de métodos com alto poder estatístico para detecção de interações é um campo em pleno desenvolvimento (Wille et al., 2003). Tradicionalmente as interações entre gene-gene e gene-fatores ambientais podem ser detectadas através de procedimentos para o ajuste de modelos de regressão logística, muito embora seja reconhecido que esta análise leva a um aumento do erro tipo 2 e uma redução em poder (Hahn et al., 2003; Ritchie et al., 2003). Os métodos para análise multilocos podem ser divididos em métodos paramétricos e não paramétricos. Entre os paramétricos estão a regressão logística e métodos baseados em redes neurais. Entre os métodos não paramétricos tem-se métodos baseados em dois passos, métodos combinatoriais e métodos de segmentação recursiva (Heidema et al., 2006). No caso da EZ, tem-se uma doença tipicamente complexa com causas multifatoriais e geneticamente atribuída à interação de múltiplos genes de pequeno

efeito (Shastri, 1999; Chowdari et al., 2002). Para realizar uma análise estatística de todos os polimorfismos ao mesmo tempo, de forma a identificar possíveis interações entre eles que resultam em efeito aditivo para a etiologia da EZ, o método de "Set Association" proposto por Hoh et al. (Hoh et al., 2001) foi utilizado, em análise feita por nossos colaboradores da Universidade Católica de Brasília, sob a coordenação do Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira. A análise por "Set Association" é um método não paramétrico que envolve dois passos. O primeiro passo é gerar uma estatística para cada marcador individualmente, que na verdade é um produto de duas estatísticas. A primeira estatística é uma medida de associação dos genótipos ou alelos com a doença e a segunda estatística mede o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para melhorar a qualidade dos dados, locos que apresentem altos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle são retirados da análise ou têm sua estatística estipulada como zero. O segundo passo é a ordenação decrescente dos locos de acordo com o valor do teste estatístico. Os marcadores são adicionados para gerar a soma do valor do teste estatístico seguindo a ordem estabelecida anteriormente. O nível de significância (p) para cada valor de soma é testado utilizando permutações. A idéia é a de que o valor de p diminuirá a medida que locos associados a doença forem adicionados para gerar a soma. A medida que locos não associados forem adicionados o valor de p começará a aumentar. Essa análise encontra-se disponível através do software SUMSTAT: "<http://linkage.rockefeller.edu/ott/sumstat.html>").

Para análise da possível associação entre os polimorfismos e os dados de morfometria cerebral, as análises estatísticas foram empregadas com auxílio do software SPSS 10.0. Inicialmente teste-t ou ANOVA foram utilizados, analisando-se um polimorfismo por vez, contra as 10 medidas morfométricas existentes. Em seguida, os genes que apresentaram associação com $p < 0.01$ (valor adotado de forma a reduzir a chance de erros tipo I) foram investigados através de GLM (do inglês: "**G**eneral **L**inear **M**odel") multivariado, o qual foi controlado para variáveis demográficas (idade, gênero e educação), tendo o polimorfismo sido usado como fator fixo e as medidas morfométricas como variáveis dependentes. Finalmente, a correção de Bonferroni foi utilizada para esse GLM. Após a correção, associações com $p < 0.05$ foram consideradas significativas.

4.9. ENSAIO DE GENE REPORTER E ANÁLISE DE CONSTITUIÇÃO HAPLOTÍPICA PARA O SNP DO POSSÍVEL PROMOTOR DE FZD3

4.9.1. Ensaio de gene reporter

Para a realização deste ensaio, contamos com a estrutura e apoio da equipe da Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Depto. De Bioquímica do Instituto de Química da USP. O objetivo deste ensaio é medir a atividade de um promotor de interesse através da clonagem do mesmo em um vetor contendo um gene repórter (no caso, o gene que codifica a luciferase de *Photinus pyralis*) cuja atividade pode ser medida por análise de luminescência emitida. Uma linhagem celular de interesse é transfectada (transfecção transiente) com o vetor contendo o gene repórter e o promotor de interesse, e após um determinado período as células são lisadas e, ao extrato protéico obtido, é adicionado um substrato para a luciferase que, ao metabolizá-lo, gera uma reação quimioluminescente cuja intensidade pode ser medida através de análise em um luminômetro. A intensidade medida é proporcional à atividade do promotor. Neste ensaio é também utilizado um controle interno de eficiência de transfecção, com o objetivo de normalizar as medidas de luciferase obtidas. Esse controle interno é um plasmídeo contendo o gene da luciferase de *Renilla reniformis* (Renilla Luciferase) precedido por promotor de citomegalovírus, co-transfectado com os plasmídeos contendo gene da Luciferase de *Photinus pyralis*. A medida de luminescência obtida para Renilla luciferase pode ser utilizada para normalizar a medida obtida para a Luciferase.

O ensaio foi feito em três etapas: preparação das construções em plasmídeos, transfecção transiente e avaliação de atividade de luciferase, que serão descritas a seguir.

4.9.1.1. Obtenção dos vetores a serem transfectados:

Foram utilizados para transfecção os seguintes vetores:

- pGL3basic (Promega, figura 18a), plasmídeo contendo o gene da luciferase de vagalume (*Photinus pyralis*), no qual clonamos os promotores de FZD3 com o alelo C, o alelo T, ou o promotor invertido (utilizado como controle negativo de atividade do promotor);
- pGL3basic sem promotor (utilizado como controle negativo de transfecção);
- pGL3control (Promega, figura 18b) – semelhante ao pGL3basic, mas contendo um promotor de SV40 (Simian vírus 40), funcionando como controle positivo de transfecção;
- pRL-CMV (Promega, figura 18c), plasmídeo contendo o gene da luciferase de *Renilla reniformis* (Renilla Luciferase) precedido por promotor de citomegalovírus, co-transfectado com os plasmídeos contendo gene da Luciferase. Funciona como um controle interno de eficiência de transfecção, sendo que a medida de luminescência obtida para Renilla luciferase pode ser utilizada para normalizar a medida obtida para a Luciferase;
- pRSV-AP-2, vetor de expressão pRSV contendo o gene que codifica para AP-2 (descrito em (Williams & Tjian, 1991), utilizado para superexpressar AP-2 nas culturas transfectadas;
- pRSV, vetor de expressão contendo o promotor de Rous sarcoma vírus (RSV) (descrito em (Williams & Tjian, 1991);
- pAP-2-LUC, plasmídeo pGL2basic (Promega, figura 18d) contendo o gene da Luciferase, precedido por sítio responsivo/ativado por AP-2. Funciona como controle positivo de expressão de AP-2 pela célula transfectada com pRSV-AP-2 (descrito em (Williams & Tjian, 1991).
- pTATA-LUC, plasmídeo pGL2basic (Promega) contendo o gene da Luciferase precedido apenas por um TATAbox adenoviral (descrito em (Xavier-Neto et al., 1998). Funciona como controle negativo de expressão de AP-2 pelas células transfectadas com pRSV-AP-2.

Figura 18. Mapas de alguns dos plasmídeos utilizados nos ensaios de transfecção para análise de atividade do promotor de *FZD3*.

Estão aqui ilustrados alguns dos plasmídeos utilizados nos ensaios, sendo que os plasmídeos pGL3basic (A), pGL3control (B) e pGL2basic (D) possuem o gene que codifica o gene da Luciferase; e o plasmídeo pRL-CMV possui o gene que codifica para Renilla-luciferase. Fonte: Promega (<http://www.promega.com/>)

Para obtenção das construções de pGL3 contendo os promotores de *FZD3*, inicialmente amplificamos o promotor de *FZD3* para a amostra de DNA de um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo, que havia sido previamente genotipada em nosso estudo. A amplificação foi realizada utilizando a enzima TripleMaster (Eppendorf), que possui atividade exonucleásica 3´-5´ (atividade de "Proof-reading"). O produto de PCR foi tratado com fragmento Klenow de forma a se tornar *blunt*, e clonado em vetores pGL3-basic (Promega), previamente abertos com enzimas *Sma*I e defosforilados através do uso de enzima CIAP ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase", Fermentas), e as construções foram usadas para transformação de bactérias *E.coli* quimiocompetentes (DH10b). As colônias foram então transferidas para placas contendo meio líquido 2xYT com ampicilina e crescidas por 16hs a 37°C. Após esse período, os plasmídeos foram purificados por Miniprep (Flexi Prep Kit, Pharmacia Biotech), e seqüenciados com os iniciadores PGL3colF 5´GGCTGTCCCCAGTGCAAGTGC3´ e PGL3colR 5´TGCAAGTTGCTCTCCAGCGGTT3´, de forma a serem determinados os plasmídeos que contivessem os insertos correspondentes ao promotor com alelo selvagem (C), com alelo polimórfico (T), além

de o inserto invertido e o plasmídeo fechado sem inserto. O seqüenciamento também foi importante para avaliar se houve algum erro de incorporação durante a amplificação dos fragmentos.

Após seleção dos clones contendo os insertos desejados as colônias foram crescidas em 25ml de meio LB com ampicilina, por 16hs a 37°C em com agitação de 300RPM. Os plasmídeos foram purificados por Midiprep (kit QIAGEN), resequenciados, e reservados para a etapa de transfecção.

Os outros plasmídeos utilizados nesse estudo foram obtidos já prontos, tendo os plasmídeos de expressão e controles de AP-2 sido gentilmente cedidos pelo Dr. José Xavier Neto, do INCOR-HC-FMUSP, e os outros plasmídeos (pGL3control e pRL-CMV) cedidos pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, do IQ-USP, sendo necessário, para estes, apenas a expansão em *E. coli* seguida de midiprep.

4.9.1.2. Transfecção e Leitura de Atividade de Luciferase

Inicialmente células das linhagens 293T (rim embrionário humano) e SH-SY5Y (neuroblastoma humano) foram semeadas em placas de cultura de 24 poços contendo DMEM ou DMEM:HAM's F12 (1:1), suplementado com 10 ou 15% de soro fetal bovino, respectivamente, na densidade de 2×10^5 células por poço, cultivadas por 24hs a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂/95% ar.

Após o período de 24hs, quando apresentavam confluência acima de 90%, as culturas foram transfectadas com 0.8ug de DNA, através do uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Várias combinações de construções foram utilizadas nas transfecções:

- Para análise das atividades dos promotores de FZD3 na presença ou não de AP-2, foram utilizados 0.2ug de pGL3 contendo o promotor de FZD3 (selvagem ou polimórfico), 0.01ug de pRL-CMV, e pRSV-AP-2 nas condições de 0:1 (0ug), 1:1 (0.2ug) ou 2:1 (0.4ug), sendo que o plasmídeo pRSV foi usado para completar a massa final de 0.8ug de DNA.
- Para os controles de transfecção e atividade do promotor, 0.2ul dos vetores pGL3basic, pGL3control e pGL3 com promotor de *FZD3* invertido foram utilizados juntamente com 0.01ug de pRL-CMV e pRSV q.s.p. 0.8ug.
- Para os controles de superexpressão de AP-2, os plasmídeos pTATA-LUC e pAP-2-LUC foram utilizados nas quantidades de 0.2ug acompanhados ou não de 0.2ug de pRSV-AP-2, sendo também utilizados 0.01ug de pRL-CMV e pRSV q.s.p. 0.8ug.

Após 24hs as células foram lisadas utilizando-se 125ul do tampão PLB5X diluído 1:5 (Passive lysis Buffer, kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega,

Madison, USA). Em seguida, a leitura das quimioluminescências emitidas pela Luciferase e Renilla luciferase, foi realizada em luminômetro, utilizando-se 10ul de cada extrato protéico com 50ul do "Luciferase Assay Reagent" e em seguida adicionando-se 50ul do reagente "Stop & Glo", respectivamente (kit *Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega, Madison, USA).

Para cada linhagem celular, os experimentos foram feitos em duplicatas, sendo que cada experimento continha triplicatas para cada condição testada.

A análise estatística da diferença entre as atividades de luciferase observadas para cada construção foi feita através de ANOVA (One-way ANOVA), seguida da correção post hoc de Tukey.

Soluções e meios de cultura para células de mamíferos utilizados:

- DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium"), Invitrogen, USA.
- Ham's F-12, Gibco.
- FCS: Soro Fetal Bovino, Cultilab e Invitrogen, USA.
- Tripsina: ICN Pharmaceuticals Inc., USA; Invitrogen, UK.
- PBSA ("Phosphate Buffered Saline"): solução salina sem cálcio ou magnésio), tamponada (pH 7.2), composta por NaCl a 140mM; KCl a 2.7mM, Na₂PO₄ a 8mM e KH₂PO₄ a 1.5mM.

4.9.1.3. Western-Blot

Além do uso de controles internos para confirmar a expressão de AP-2 nas células transfectadas com pRSV-AP-2, também fizemos Western-Blot de alguns lisados a fim de uma segunda confirmação dessa expressão.

- *Extração e dosagem de proteínas totais*

Foram utilizados três diferentes lisados, provenientes da lise de células da linhagem 293T transfectadas, feita com tampão PLB1X (de acordo com o kit *Dual Luciferase Assays System*, Promega): 1) *Pool* de lisados da condição onde pRSV-AP-2 não foi transfectado; 2) *Pool* de lisados da condição em que 0.2ug de pRSV-AP-2 foram utilizados na transfecção; 3) *Pool* de lisados em que 0.4ug de pRSV-AP-2 foram utilizados na transfecção. Os lisados foram clarificados por centrifugação (15.000rpm, 10min., 4°C) para separação das proteínas insolúveis e quantificados pelo método de Bradford (Bio-Rad). No total, 50ug de cada lisado foram utilizados nos ensaios, na presença de inibidores de proteases. As alíquotas foram misturadas ao tampão de amostra para concentração final de 1X, seguidas de incubação à 95°C por 5 min e SDS-PAGE.

Tampão de Lise: o tampão utilizado para lise foi o PLB5X, fornecido no kit Dual Luciferase Repórter Assay (Promega), diluído em água para a concentração final de 1X.

Inibidores de protease utilizados (concentração final): PMSF (1mM), Trasylol (1.5%), Ortovanadato de sódio (1mM), Leupeptina (2ug/ml), Pepstatina (2ug/ml).

- *Transferência úmida das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose*

Membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuel BA85 ou BA83) e papéis Whatmann 3MM foram recortados com o mesmo tamanho do gel. A membrana, os papéis, o gel e as espumas do aparato de montagem de transferência foram embebidos em tampão de transferência 1X. A membrana foi primeiramente molhada em água estéril. A montagem foi feita colocando-se na ordem: espuma embebida, 3 folhas de papel 3MM, gel, membrana, 3 folhas de papel 3MM, espuma. O cassete foi fechado e colocado na cuba com a membrana voltada para o pólo positivo. A cuba foi preenchida com tampão de transferência, a qual foi feita a 400mA por 1 hora. A membrana foi corada com 0.1% Ponceau em 10% de ácido acético por 5 minutos de forma a confirmarmos a eficiência da transferência e observarmos se havia diferenças nas quantidades dos lisados utilizados. Em seguida, a membrana foi descorada com água.

- *Imunoreação*

Os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados com 5% BSA, em TBST 0.1% Tween-20 por toda a noite. A membrana foi então lavada com TBST 3 vezes por 10 min. O antisoro (mouse anti-AP-2-alpha, Invitrogen), na diluição 1:500, foi incubado por toda a noite. A membrana foi lavada 3 vezes com TBST, e incubada por 1 hora com anticorpo secundário (anti-mouse IgG na diluição de 1:600, conjugado com fluoresceína). Novamente a membrana foi lavada (3 vezes) e incubada com um anticorpo terciário (anti-fluoresceína, na diluição de 1:2.500, conjugado com fosfatase alcalina), lavada por mais 3 vezes, e revelada com o kit ECF Western Blotting (Amershan) visualizada em aparelho Storm 840 (Amershan). Obs: os anticorpos secundário e terciário também são fornecidos pelo kit ECF Western Blotting (Amershan).

4.9.2. DEFINIÇÃO DO BLOCO HAPLOTÍPICO DE *FZD3*

A associação de um polimorfismo com determinado fenótipo pode ser real (quando este polimorfismo é causal), indireta (devido ao desequilíbrio de ligação com o polimorfismo causal) ou derivada de resultados espúrios que ocorrem principalmente devido a uma estratificação da população (Cardon & Bell, 2001). Para o gene *FZD3* foi realizada uma análise do padrão de desequilíbrio de ligação ao longo do gene, envolvendo o SNP no promotor de *FZD3* e 5 SNPs outros, três *upstream* do SNP do promotor (estando o mais distante localizado 26.7kb *upstream*); e dois *downstream* (estando o mais distante localizado 9.3kb *downstream*), perfazendo uma avaliação de um bloco total de 36kb (figura 19). Os cinco marcadores foram avaliados em um total de 168 amostras de pacientes esquizofrênicos, sendo 118 de Brasileiros pertencentes a diferentes etnias e 50 de indivíduos Dinamarqueses.

Figura 19: SNPs selecionados e sua localização, para estudo de constituição de Blocos haplotípicos envolvendo o SNP no promotor de *FZD3*.

O SNP localizado no promotor de *FZD3* (rs7836920), assim como os outros 5 SNPs estão indicados pelas setas. Retângulos pretos representam regiões codificadoras de proteína, e retângulos brancos indicam regiões não traduzidas (UTR). Exons estão numerados e o promotor está indicado pela letra P. Os números rs correspondem ao código do banco de dados dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Os SNPs foram avaliados por PCR (tabela 13), seguida de seqüenciamento direto (Big Dye Terminator, Applied Biosystems) e injeção em seqüenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems). A análise de desequilíbrio de ligação para determinação dos blocos haplotípicos nas populações foi feita utilizando o software Haploview, obtido através do *site* do International HapMap Project (<http://www.hapmap.org/downloads/index.html.en>). O programa Haploview estima haplótipos através de algoritmos e maximização de expectativas e calcula valores de r^2 e D' como medidas de desequilíbrio de ligação. O programa Haploview possui também algoritmos para gerar blocos haplotípicos. O algoritmo padrão é aquele inicialmente publicado por Gabriel (2002) (Powchik et al., 1998), onde intervalos de confiança em 95% para D' são calculados e classificados como com *forte desequilíbrio de ligação*, *inconclusivo* ou *forte recombinação*. Um bloco é formado se 95% das comparações informativas (não inconclusivas) entre pares de SNPs contíguos são classificadas como *forte desequilíbrio de ligação*.

Tabela 13: Iniciadores utilizados para amplificar os SNPs selecionados para o estudo de haplótipos de FZD3.
Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores

Polimorfismo	Primer forward (5´-3´)	Primer reverse (5´-3´)	Fragmento Amplificado (pb)
rs1908916	AACACCACCACCACCAAT	GTATTGAAATCTACCCATACGC	575
rs5743399	TTCCAGGTTTCAGAGCAGAAAA	GAAAGCCTCATTCCCTAGCC	964
rs3735725	CGGAAAGCATCATCTTCAGG	AGGGTGCTTTTCTTGGCTTT	481
rs2738163	TGCTCCACAGTTCAATTCATTT	TAGGGCAGCTGGGTAAAAA	400
rs13252784	GAGGCTTCACAGAGGAAAGG	CTTCCAGCTCCATTCTCAGC	405
rs17059134	AATGAAGATTGGAATTCATTTACT	AATTTTATGCGCACATCTTTTATA	700
rs960914	CCTGTCCTCAATTCTAAAACC	GTTGTCCCATCAGCCAATCT	483

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. GENES E POLIMORFISMOS CANDIDATOS SELECIONADOS

Inicialmente, os bancos de dados OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>), Entrez GENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>), e Gene Ontology (www.godatabase.org/), juntamente a bancos de dados de expressão, tais como UNIGENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>) e SAGE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>), foram utilizados para identificação de genes envolvidos com neurodesenvolvimento e com expressão documentada em cérebro, gerando uma lista de 316 genes (em fev/2003).

Em seguida, esses genes foram mapeados e os dados de mapeamento foram cruzados com uma lista de locos associados à EZ, elaborada através de revisão da literatura. Dos 316 genes associados com neurogênese e documentados em tecido cerebral, 109 se encontravam mapeados em locos relevantes para a EZ.

Posteriormente, esses genes foram analisados individualmente em busca de potenciais regiões polimórficas, dando-se preferência àquelas com maior potencial de consequência funcional. Os potenciais polimorfismos foram validados *in silico* por busca de seqüências nos bancos de dados que comprovassem as alterações sugeridas. Para microRNAs, os SNPs selecionados foram identificados por re-sequenciamento de amostras e análise utilizando o software SIP (descrito em Materiais e métodos).

Os genes selecionados ao final destes processos são apresentados na tabela 14. Para cada gene selecionado foi feita uma revisão bibliográfica a fim de se confirmar a real atuação desse gene em vias de neurogênese.

No total, 49 polimorfismos foram selecionados, estando mapeados em 47 genes diferentes (dois dos genes tiveram dois polimorfismos selecionados para análise). Dentre os polimorfismos, 44 são do tipo SNP, 2 são *indels* e 3 são micro-satélites. Os 44 SNPs incluem 32 nsSNPs, 3 SNPs em regiões promotoras, 5 SNPs em transcritos primários de miRNAs, 2 SNPs intrônicos, 1 SNP em 3'UTR, e um SNP em região intergênica. Todos os microsatélites são repetições trinucleotídicas, localizados em regiões codificadoras. Dentre os dois *indels*, um se localiza na porção 3'UTR do gene *NOGO*, enquanto que o outro envolve uma grande deleção em um *cluster* de protocaderinas.

Dos 47 genes selecionados, 35 (74,5%) nunca foram anteriormente estudados em EZ. Da mesma forma dentre os 49 polimorfismos estudados, 42 (85,7%) nunca haviam sido investigados na EZ. Esses dados demonstram o grau de ineditismo das nossas análises.

Através de uma análise, com objetivo de caracterizar a cobertura haplotípica dos polimorfismos selecionados, utilizando o banco de dados HapMap, e como parâmetro a constituição haplotípica de uma população de caucasianos norte-americanos (30 trios, residentes nos Estados Unidos), com ascendência Européia (população denominada CEU, no HapMap), observamos que em média nossos polimorfismos selecionados abrangem um bloco haplotípico de 15.6kb, variando de 0 a 146kb, e cobrem em média 36% do gene, sendo que 15 polimorfismos abrangem mais que 50% do gene, dentre os quais 6 cobrem haplotipicamente toda a região gênica.

Também pudemos avaliar, utilizando as ferramentas SIFT e PolyPhen, o possível impacto dos nsSNPs selecionados para a função e atividade protéica. Oito, dos 32 nsSNPs, foram considerados danosos para a proteína, 22 foram considerados benignos, e dois não possuíam dados suficientes para análise por essas ferramentas. Devemos notar que talvez os polimorfismos mais importantes na EZ estejam dentre os chamados benignos (22 dos nossos SNPs), pois é bastante provável que a doença seja causada por uma coleção de alterações de pequeno efeito. Cabe ainda ressaltar que 9 destes 22 nsSNPs estão localizados dentro de domínios protéicos e 10 resultam na mudança de carga ou hidrofobicidade entre os aminoácidos.

Tabela 14. Lista de genes candidatos selecionados (1/5)

DADOS REFERENTES AO GENE						DADOS REFERENTES AO POLIMORFISMO				
NOME	LOCUS ID	DESCRIÇÃO	REFSEQ	MAPEAMENTO	CÓDIGO UNIGENE	POLIMORFISMO	CÓDIGO dbSNP	Cobertura haplotípica (% cobertura do gene)	Predição Polyphen e SIFT	Tipo de troca de aminoácido
NOTCH2*	4853	Notch homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	NM_024408	1p13-p11	Hs.8121	SNP T846C (ILE197THR)*	rs8002	143/158,1kb (90,4%)	PolyPhen: Benigna SIFT: Danosa	Hidrofóbico grande por hidrofílico médio
PPT1*	5538	palmitoyl-protein thioesterase 1	NM_000310	1p32	Hs.3873	SNP C459T (THR134ILE)*	rs1800205	7/24,59kb (28,4%)	Benigna	Hidrofóbico grande por hidrofílico médio
HEYL*	26508	heiry/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	NM_014571	1p34.3	Hs.23823	SNP C556T (LEU179PHE)*	rs1180318	10/15,49kb (64,5%)	Benigna	Propriedades semelhantes
SEMA6C*	10500	Semaphorin 6C	NM_030913	1q21.2	Hs.54937	SNP C1663A (PRO455THR)*	rs4971007	7/14,94kb (46,8%)	Benigna	Hidrofóbico por hidrofílico, na porção extracelular, dentro do domínio SEMA
ADAM15*	8751	A disintegrin and Metalloproteinase Domain 15 (metargidin)	NM_003815	1q21.3	Hs.312098	SNP C673A (THR191LYS)*	rs6427128	6/11,49kb (52,2%)	Benigna	Neutro médio por básico grande no propeptídeo
ADAMTS4*	9507	A disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, 4	NM_005099	1q21-q23	x	SNP G2304A (ARG626GLN)*	rs4233367	5/9,3kb (53,7%)	Polyphen: Danosa SIFT: Benigna	Básico por neutro
ASPM	259266	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>)	NM_018136	1q31	Hs.121028	SNP A7939C (ILE2657LEU)	rs3762271	57/62,11kb (91,7%)	Benigna	Dentro do domínio IQ28
RTN4	57142	Reticulon 4	NM_007008	2p14-p13	Hs 65450	Inserção CAA no 3'UTR do mRNA	x	4/78,41kb (5,1%)	x	x
FLNB*	2317	filamin B, beta	NM_001457	3p14.3	Hs.81008	SNP A3600G (ASN1157ASP)*	rs1131356	31/163,8kb (18,9%)	Polyphen: Desconhecida SIFT: Danosa	Neutro por ácido dentro de região de interação com <i>FBLP1</i>
WNT7A	7476	wingless-type MMTV integration site family, member 7A	NM_004625	3p25	Hs 72290	SNP G/C (Intron 2)*	rs4685046	10/61,74kb (16,2%)	x	x
NUDT6*	11162	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type	NM_007083	4q26	Hs .422889	SNP G658A (ARG209GLN)*	rs1048201	0/29,96kb (0%)	Polyphen: Desconhecida SIFT: Danosa	Básico grande por neutro médio
MAP1B	4131	microtubule-associated protein 1B	NM_005909	5q13	Hs.103042	SNP G2002A (VAL468ILE)*	rs1866374	0/99,72kb (0%)	Benigna	Propriedades semelhantes

Tabela 14: Lista de genes candidatos selecionados (continuação-2/5)

DADOS REFERENTES AO GENE						DADOS REFERENTES AO POLIMORFISMO				
NOME	LOCUS ID	DESCRIÇÃO	REFSEQ	MAPEAMENTO	CÓDIGO UNIGENE	POLIMORFISMO	CÓDIGO dbSNP	Cobertura haplotípica	Predição Polyphen e SIFT	Tipo de troca de aminoácido
PCDH12*	51294	Protocadherin 12	NM_016580	5q31	Hs 115897	SNP G3130A (SER640ASN)*	rs164515	12/14,1kb (85%)	Benigna	Neutro pequeno por neutro médio, na porção extracelular, dentro do motivo Cadherin6
PCDHB11*	56125	Protocadherin Beta 11	NM_018931	5q31	Hs 283084	SNP G20A (ARG7HIS)*	rs917535	0/3,37kb (0%)	Benigna	Propriedades semelhantes
PCDH a CLUSTER*	x	Protocadherin a cluster (PCDHa8 a PCDHa10)	x	5q31	x	Deleção de 16.7Kb*	X	x	x	x
PCDH3a*	56145	Protocadherin alpha 3	NM_018906 NM_031497	5q31	Hs. 247734	SNP T332G (promotor)*	rs3756340	46/211,1kb (21,8%)	x	x
MIR-206*	x	microRNA 206	x	6p12.2	x	SNP T/G*	Novo SNP	5/0,022kb (100%)	x	x
SIM1*	6492	single-minded homolog 1	NM_005068	6q16.3-q21	Hs.105925	SNP1: T1319C (VAL371ALA)* SNP2: A1261C (THR352PRO)*	SNP1: rs3734355 SNP2: rs3734354	11/74,8kb (14,7%)	Benignas	SNP1: Neutro grande por neutro pequeno, no motivo "sinal de localização nuclear" ; SNP2: hidrofílico por hidrofóbico
DLL1*	28514	Delta-like 1 (<i>Drosophila</i>)	NM_005618	6q27	Hs.368657	SNP G/C (GLY502ARG)*	rs2747761	0/8,18kb (0%)	Benigna	Neutro pequeno por básico grande no domínio EGF-like8
ADAM22*	53616	A disintegrin and Metalloproteinase Domain 22	NM_004194	7q21	Hs.256398	SNP C321G (ARG81PRO)*	rs2279542	0/262,7kb (0%)	Polyphen: Danosa SIFT: Benigna	Neutro hidrofóbico por básico hidrofílico no propeptídeo
SEMA3D*	223117	Semaphorin 3D	NM_152754	7q21.12	Hs.187319	SNP C2141A (GLN340LYS)*	rs7800072	65/126,4kb (51,4%)	Benigna	Neutro por básico, no domínio SEMA
RELN	5649	Reelin	NM_005045	7Q22	Hs12246	SNP C3148G (VAL997LEU)*	rs362691	1/517,7kb (0,2%)	Benigna	Propriedades semelhantes

Tabela 14: Lista de genes candidatos selecionados (continuação-3/5)

DADOS REFERENTES AO GENE						DADOS REFERENTES AO POLIMORFISMO				
NOME	LOCUS ID	DESCRIÇÃO	REFSEQ	MAPEAMENTO	CÓDIGO UNIGENE	POLIMORFISMO	CÓDIGO dbSNP	Cobertura haplotípica	Predição Polyphen e SIFT	Tipo de troca de aminoácido
FZD3	7976	frizzled homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	NM_017412	8p21	Hs.40735	SNP C-68T (promotor)*	rs7836920	85/70,19kb (100%)	x	x
FBXO16*	157574	F-box protein 16	NM_172366	8p21.1	Hs.532253	SNP C/A (UTR)*	rs1908916	0/61,86kb (0%)	x	x
ADAM28*	10863	A disintegrin and Metalloproteinase Domain 28	NM_014265	8p21.2	Hs.174030	SNP A2095G (ILE684MET)*	rs7829965	0/61,09kb (0%)	Benigna	Propriedade semelhantes, na porção transmembrana
MIR-320*	x	microRNA 320	x	8p21.3	x	SNP T/G*	Novo SNP	4/0,022kb (100%)	x	x
NRG1	3084	Neuregulin 1	NM_004495	8p21-p12	Hs.172816 Hs.453951	SNP A560G (GLN38ARG)*	rs3924999	5/216kb (2,3%)	Benigna	Básico grande para neutro médio, na porção extracelular, dentro do domínio Ig-like C2-type
NRP1*	8829	neuropilin 1	NM_003873	10p12	Hs.173548	SNP A2721G (ILE733VAL)*	rs2228638	36/157,4kb (22,8%)	Benigna	Propriedades semelhantes, na porção extracelular, domínio MAM
BDNF	627	Brain-Derived Neurotrophic Factor	NM_001709	11p13	Hs 56023	SNP G483A (VAL66MET)	rs6265	59/66,9kb (88%)	PolyPhen: Benigna SIFT: Danosa	Propriedades semelhantes, no propeptídeo
SMPD1*	6609	Sphingomyelin Phosphodiesterase 1	NM_000543	11p15.4-p15.1	Hs 77813	SNP G1696A (GLY506ARG)*	Schuchman et al., 1992; Ida et al., 1993	2/4,57kb (43,8%)	Desconhecida	Neutro pequeno por básico grande
MIR-210*	x	microRNA 210	x	11p15.5	x	SNP A/G*	rs7395206	5/0,022kb (100%)	x	x
WIF1*	11197	WNT Inhibitory Factor 1	NM_007191	12q13.13	Hs.284122	SNP G1048A (CYS310CYS)*	rs1026024	0/70,68kb (0%)	Desconhecida	x
ASCL1	429	Achaete-scute complex-like 1	NM_004316	12q22-q23	Hs 1619	Microsatélite CAG (Q)	x	0/2,824kb (0%)	x	x
NUMB*	8650	Numb Homolog (<i>Drosophila</i>)	NM_003744	14q24.3	Hs 78890	SNP C1015A (THR232ASN)*	rs1050477	0/183,4kb (0%)	Benigna	Propriedades semelhantes

Tabela 14: Lista de genes candidatos selecionados (continuação-4/5)

DADOS REFERENTES AO GENE						DADOS REFERENTES AO POLIMORFISMO				
NOME	LOCUS ID	DESCRIÇÃO	REFSEQ	MAPEAMENTO	CÓDIGO UNIGENE	POLIMORFISMO	CÓDIGO dbSNP	Cobertura haplotípica	Predição Polyphen e SIFT	Tipo de troca de aminoácido
JAG2*	3714	Jagged 2	NM_002226	14q32	Hs 166154	SNP G1905A (GLU502LYS)*	rs1057744	23/27,09kb (82,4%)	Benigna	Ácido por básico, na porção extracelular, domínio EGF-like8
AKT1	207	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	NM_005163	14q32.32	Hs. 368861	SNP1: C13531T (intron 5) SNP2: C-5025T (intergênica)*	SNP1: rs3730358 SNP2: rs2498784	SNP1: 0/26,39kb (0%) SNP2: 0/26,39kb (0%)	x	x
MIR-211*	x	microRNA 211	x	15q13.3	x	SNP G/A*	rs919001	0/0,022kb (0%)	x	x
RAI1	10743	Retinoic Acid Induced 1	NM_030665	17p11.2	Hs 110953	Microsatélite CAG (Q)	x	14/130kb (10,8%)	x	x
NEUROD2*	4761	Neurogenic Differentiation 2	NM_006160	17p13.1	Hs322431	SNP G508C (GLY104ARG)*	rs17852042	13/3,125kb (100%)	Polyphen: Danosa SIFT: Desconhecida	Neutro pequeno por básico grande
ALOX-12	239	arachidonate 12-lipoxygenase	NM_000697	17p13.1	Hs.422967	SNP G815A (ARG261GLN)	rs1126667	6/14,65kb (40,9%)	Benigna	Neutro médio por básico grande
NETO1*	81832	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	NM_138966	18q22-q23	Hs.60563	SNP A1726G (ASN481SER)*	rs922999	0/120kb (0%)	Benigna	Propriedades semelhantes, na porção citoplasmática
NOTCH3*	4854	Notch homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	NM_000435	19p13.2-p13.1	Hs.8546	SNP T6746C (VAL2223ALA)*	rs1044009	5/41,35kb (12,1%)	Benigna	Propriedades semelhantes, na porção citoplasmática
NUMBL*	9253	Numb Homolog (<i>Drosophila</i>)-Like	NM_004756	19q13.13-q13.2	Hs 199291	Microsatélite CAG (Q)*	x	17/23,94kb (71%)	x	x
MIR-266*	x	microRNA 266	x	22q11.21	x	SNP C/G*	rs861843	6/0,022kb (100%)	x	x
NEFH*	4744	Neurofilament, heavy polypeptide 200kDA	NM_021076	22q12.2	Hs.198760	SNP C2447A (ALA805GLU)*	rs165602	0/11,06kb (0%)	Polyphen: Desconhecida SIFT: Danosa	Ácido hidrofílico grande por neutro hidrofóbico pequeno

Tabela 14: Lista de genes candidatos selecionados (continuação-5/5)

DADOS REFERENTES AO GENE						DADOS REFERENTES AO POLIMORFISMO				
NOME	LOCUS ID	DESCRIÇÃO	REFSEQ	MAPEAMENTO	CÓDIGO UNIGENE	POLIMORFISMO	CÓDIGO dbSNP	Cobertura haplotípica	Predição Polyphen e SIFT	Tipo de troca de aminoácido
SYN1*	6853	synapsin I	NM_006950	Xp11.23	Hs.225936	SNP C-3847T (promotor)*	rs8177086	11/46,99kb (23,4%)	x	x
FLNA*	2316	Filamin A	NM_001456	Xq28	Hs.195464	SNP G7194A (ARG2341GLN)*	rs3179473	7/25,96kb (26,9%)	Benigna	Básico por neutro

Dados referentes ao Locus ID, REFSEQ e Código Unigene podem ser acessados no website "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>" (links para Entrez Gene, Nucleotide e Unigene, respectivamente. Código dbSNP refere-se ao banco de dados dbSNP, acessível através do website "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>". Dados de cobertura haplotípica estão descritos como: tamanho do bloco haplotípico onde o polimorfismo se encontra/Tamanho total do gene (% do gene coberto pelo SNP haplotipicamente). Predição Polyphen e SIFT refere-se à predição feita por estas duas ferramentas (disponíveis nos websites <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html> e <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>, sobre se a alteração de aminoácidos feita pelo SNP é benigna ou danosa para a função e atividade da proteína. Genes e Polimorfismos marcados com * nunca foram antes estudados em esquizofrenia.

5.2. RESULTADOS DAS GENOTIPAGENS

De acordo com o fluxograma proposto para esse estudo (figura 7), após a validação *in silico*, na qual baseamo-nos para a seleção dos polimorfismos candidatos de estudo, a próxima etapa seria a validação experimental da existência destas variações, que consistiu na genotipagem de 100 alelos, sendo considerado validado o polimorfismo que apresentasse pelo menos um alelo variante dentre os 100 avaliados. Caso o polimorfismo não aparecesse nessa primeira série de genotipagens o seu estudo era abandonado, pois ou ele poderia não ser real (apesar da sugestão positiva pela validação *in silico*), ou poderia ter uma frequência muito baixa (abaixo de 1%) na população brasileira. Dentre os 49 polimorfismos testados, 5 não foram validados (10.2%), sendo estes os localizados nos genes *HEYL* (rs1180318), *SYN1* (rs8177086), *DLL1* (rs2747761), *NEUROD2* (rs17852042) e *NUMB* (rs1050477).

Em seguida, partimos para a determinação de frequência alélica dos polimorfismos validados através da genotipagem de 400 alelos. Dentre os 44 polimorfismos validados, 3 apresentaram frequência menor que 5%, sendo estes os localizados nos genes *WIF1* (rs1026024), *NETO1* (rs922999) e *FLNA* (rs3179473).

Tendo descontinuado o estudo dos 8 polimorfismos que não passaram pelas duas etapas de validação anteriores, partimos para a genotipagem dos 41 polimorfismos restantes (em 39 genes) para todo o set amostral de nosso estudo (200 casos e 200 controles). A tabela 15 contém as frequências alélicas e genotípicas obtidas para os polimorfismos avaliados em nossas amostras, assim como as análises estatísticas de associação dos polimorfismos com a EZ.

Tabela 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microssatélites analisados (1/7).

GENE	POLIMORFISMO	CONTROLES	FREQ (%)	ESQUIZOFRÊNICOS	FREQ (%)	Pvalue	X ²	OD (CI)	
		200		200					
SNPs									
NOTCH2	T/C (ILE197THR)								
Genótipos	TT	136	68,00	141	70,50	0,588	0,29	0,4 (0,14-1,16)	
	TC	59	29,50	53	26,50	0,504	0,45		
	CC	5	2,50	6	3,00	0,760	0,09		
Alelos	T	331	82,75	335	83,75	0,705	0,14		
	C	69	17,25	65	16,25	0,705	0,14		
PPT1	C/T (THR134ILE)								
Genótipos	TT	180	90,00	185	92,50	0,376	0,78		
	TC	20	10,00	14	7,00	0,282	1,16		
	CC	0	0,00	1	0,50	0,316	1,00		
Alelos	T	380	95,00	384	96,00	0,495	0,47		
	C	20	5,00	16	4,00	0,495	0,47		
SEMA6C	C/A (PRO455THR)								
Genótipos	CC	126	63,00	133	66,50	0,463	0,54		
	CA	62	31,00	62	31,00	1,000	0,00		
	AA	12	6,00	5	2,50	0,083	3,01		
Alelos	C	314	78,50	328	82,00	0,214	1,55		
	A	86	21,50	72	18,00	0,214	1,55		
ADAM15	C/A (THR191LYS)								
Genótipos	CC	153	76,50	155	77,50	0,812	0,06		
	CA	43	21,50	42	21,00	0,903	0,01		
	AA	4	2,00	3	1,50	0,703	0,15		
Alelos	C	349	87,25	352	88,00	0,747	0,10		
	A	51	12,75	48	12,00	0,747	0,10		
ADAMTS4	G/A (ARG626GLN)								
Genótipos	GG	95	47,50	88	44,00	0,482	0,49		
	GA	80	40,00	86	43,00	0,543	0,37		
	AA	25	12,50	26	13,00	0,880	0,02		
Alelos	G	270	67,50	262	65,50	0,549	0,36		
	A	130	32,50	138	34,50	0,549	0,36		
ASPM	A/C (ILE2657LEU)								
Genótipos	CC	109	54,50	111	55,50	0,841	0,04		
	CA	78	39,00	73	36,50	0,606	0,27		
	AA	13	6,50	16	8,00	0,563	0,33		
Alelos	C	296	74,00	295	73,75	0,936	0,01		
	A	104	26,00	105	26,25	0,936	0,01		
FLNB	A/G (ASN1157ASP)								
Genótipos	GG	78	39,00	82	41,00	0,683	0,17		
	GA	90	45,00	89	44,50	0,920	0,01		
	AA	32	16,00	29	14,50	0,676	0,17		
Alelos	G	246	61,50	253	63,25	0,609	0,26		
	A	154	38,50	147	36,75	0,609	0,26		
WNT7a	G/C (Intron 2)								
Genótipos	GG	45	22,50	47	23,50	0,812	0,06		
	GC	103	51,50	109	54,50	0,548	0,36		
	CC	52	26,00	44	22,00	0,349	0,88		
Alelos	G	193	48,25	203	50,75	0,479	0,50		
	C	207	51,75	197	49,25	0,479	0,50		
NUDT6	G/A (ARG209GLN)								
Genótipos	GG	154	77,00	157	78,50	0,718	0,13		
	GA	39	19,50	36	18,00	0,700	0,15		
	AA	7	3,50	7	3,50	1,000	0,00		
Alelos	G	347	86,75	350	87,50	0,751	0,1		
	A	53	13,25	50	12,50	0,751	0,1		

Tabela 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microssatélites analisados (2/7).

GENE	POLIMORFISMO	CONTROLES	FREQ (%)	ESQUIZOFRÊNICOS	FREQ (%)	Pvalue	X²	OD (CI)
		200		200				
	SNPs (continuação)							
MAP1B	G/A (VAL468ILE)							
Genótipos	GG	123	61,50	122	61,00	0,918	0,01	0,21 (0,04-1,00)
	GA	68	34,00	76	38,00	0,405	0,69	
Alelos	AA	9	4,50	2	1,00	0,0323	4,58	
	G	314	78,50	320	80,00	0,601	0,27	
	A	86	21,50	80	20,00	0,601	0,27	
PCDH12	G/A (SER640ASN)							
Genótipos	GG	121	60,50	123	61,50	0,837	0,04	
	GA	67	33,50	67	33,50	1,000	0,00	
Alelos	AA	12	6,00	10	5,00	0,661	0,19	
	G	309	77,25	313	78,25	0,734	0,12	
	A	91	22,75	87	21,75	0,734	0,12	
PCDHB11	G/A (ARG7HIS)							
Genótipos	GG	181	90,50	175	87,50	0,338	0,92	
	GA	13	6,50	20	10,00	0,203	1,62	
Alelos	AA	6	3,00	5	2,50	0,760	0,09	
	G	375	93,75	370	92,50	0,485	0,49	
	A	25	6,25	30	7,50	0,485	0,49	
PCDH3a	T/G (promotor)							
Genótipos	TT	34	17,00	32	16,00	0,788	0,07	
	GT	109	54,50	107	53,50	0,841	0,04	
Alelos	GG	57	28,50	61	30,50	0,661	0,19	
	T	177	44,25	171	42,75	0,669	0,18	
	G	223	55,75	229	57,25	0,669	0,18	
MIR-206	T/G							
Genótipos	TT	109	54,50	109	54,50	1,000	0,00	
	TG	75	37,50	78	39,00	0,758	0,09	
Alelos	GG	16	8,00	13	6,50	0,563	0,33	
	T	293	73,25	296	74,00	0,810	0,06	
	G	107	26,75	104	26,00	0,810	0,06	
SIM1	T/C (VAL371ALA)							
Genótipos	GG	139	69,50	141	70,50	0,827	0,05	
	GA	58	29,00	55	27,50	0,738	0,11	
Alelos	AA	3	1,50	4	2,00	0,703	0,15	
	G	336	84,00	337	84,25	0,923	0,01	
	A	64	16,00	63	15,75	0,923	0,01	
ADAM22	C/G (ARG81PRO)							
Genótipos	GG	72	36,00	73	36,50	0,917	0,01	
	GC	96	48,00	93	46,50	0,764	0,09	
Alelos	CC	32	16,00	34	17,00	0,788	0,07	
	G	240	60,00	239	59,75	0,942	0,01	
	C	160	40,00	161	40,25	0,942	0,01	
SEMA3D	C/A (GLN340LYS)							
Genótipos	AA	99	49,50	98	49,00	0,920	0,01	
	AC	82	41,00	83	41,50	0,919	0,01	
Alelos	CC	19	9,50	19	9,50	1,000	0,00	
	A	280	70,00	279	69,75	0,938	0,01	
	C	120	30,00	121	30,25	0,938	0,01	
RELN	C/G (VAL997LEU)							
Genótipos	CC	160	80,00	167	83,50	0,365	0,82	
	CG	36	18,00	32	16,00	0,594	0,28	
Alelos	GG	4	2,00	1	0,50	0,177	1,82	
	C	356	89,00	366	91,50	0,233	1,42	
	G	44	11,00	34	8,50	0,233	1,42	

Tabela 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microsatélites analisados (3/7).

GENE	POLIMORFISMO	CONTROLES	FREQ (%)	ESQUIZOFRÊNICOS	FREQ (%)	Pvalue	X ²	OD (CI)
		200		200				
	SNPs (continuação)							
FZD3	C/T (promotor)							
Genótipos	CC	155	77,50	149	74,50	0,482	0,49	2,81 (1,08-7,34)
	CT	39	19,50	35	17,50	0,606	0,26	
Alelos	TT	6	3,00	16	8,00	0,0283	4,81	
	C	349	87,25	333	83,25	0,111	2,54	
FBXO16	T	51	12,75	67	16,75	0,111	2,54	
	C/A (5'UTR)							
Genótipos	CC	152	76,00	149	74,50	0,728	0,12	
	CA	44	22,00	49	24,50	0,554	0,35	
Alelos	AA	4	2,00	2	1,00	0,411	0,68	
	C	348	87,00	347	86,75	0,917	0,01	
ADAM28	A	52	13,00	53	13,25	0,917	0,01	
	G/A (MET684ILE)							
Genótipos	GG	185	92,50	175	87,50	0,0956	2,78	1,76 (0,90-3,45) 1,76 (0,90-3,45)
	GA	15	7,50	25	12,50	0,0956	2,78	
Alelos	AA	0	0,00	0	0,00	1,000	0,00	
	G	385	96,25	375	93,75	0,105	2,63	
MIR-320	A	15	3,75	25	6,25	0,105	2,63	
	T/G							
Genótipos	TT	167	83,50	171	85,50	0,580	0,31	
	TG	30	15,00	26	13,00	0,564	0,33	
Alelos	GG	3	1,50	3	1,50	1,000	0,00	
	T	364	91,00	368	92,00	0,612	0,26	
NRG1	G	36	9,00	32	8,00	0,612	0,26	
	A/G (GLN38ARG)							
Genótipos	GG	90	45,00	79	39,50	0,265	1,24	
	GA	84	42,00	98	49,00	0,159	1,98	
Alelos	AA	26	13,00	23	11,50	0,647	0,21	
	G	264	66,00	256	64,00	0,553	0,35	
NRP1	A	136	34,00	144	36,00	0,553	0,35	
	A/G (ILE733VAL)							
Genótipos	GG	162	81,00	156	78,00	0,457	0,55	
	GA	36	18,00	39	19,50	0,700	0,14	
Alelos	AA	2	1,00	5	2,50	0,253	1,31	
	G	360	90,00	351	87,75	0,311	1,02	
BDNF	A	40	10,00	49	12,25	0,311	1,02	
	G/A (VAL66MET)							
Genótipos	GG	149	74,50	144	72,00	0,572	0,32	
	GA	45	22,50	50	25,00	0,557	0,35	
Alelos	AA	6	3,00	6	3,00	1,000	0,00	
	G	343	85,75	338	84,50	0,619	0,25	
SMPD1	A	57	14,25	62	15,50	0,619	0,25	
	G/A (GLY/ARG)							
Genótipos	GG	133	66,50	143	71,50	0,280	1,17	
	GA	58	29,00	53	26,50	0,577	0,31	
Alelos	AA	9	4,50	4	2,00	0,158	1,99	
	G	324	81,00	339	84,75	0,159	1,98	
MIR-210	A	76	19,00	61	15,25	0,159	1,98	
	A/G							
Genótipos	AA	64	32,00	57	28,50	0,447	0,58	
	AG	80	40,00	88	44,00	0,418	0,66	
Alelos	GG	56	28,00	55	27,50	0,911	0,01	
	A	208	52,00	202	50,50	0,671	0,18	
	G	192	48,00	198	49,50	0,671	0,18	

Tabela 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microssatélites analisados (4/7).

GENE	POLIMORFISMO	CONTROLES	FREQ (%)	ESQUIZOFRÊNICOS	FREQ (%)	Pvalue	X ²	OD (CI)
		200		200				
	SNPs (continuação)							
JAG2	G/A (GLU502LYS)							
Genótipos	GG	45	22,50	34	17,00	0,167	1,91	
	GA	105	52,50	106	53,00	0,920	0,01	
	AA	50	25,00	60	30,00	0,263	1,25	
Alelos	G	195	48,75	174	43,50	0,136	2,22	
	A	205	51,25	226	56,50	0,136	2,22	
AKT1	C/T (intergênico)							
Genótipos	GG	144	72,00	150	75,00	0,497	0,46	
	GA	47	23,50	43	21,50	0,632	0,23	
	AA	9	4,50	7	3,50	0,610	0,26	
Alelos	G	335	83,75	343	85,75	0,431	0,62	
	A	65	16,25	57	14,25	0,431	0,62	
AKT1	C/T (intron 5)							
Genótipos	CC	118	59,00	132	66,00	0,148	2,09	
	CT	77	38,50	58	29,00	0,044	4,04	0,65 (0,43-0,99)
	TT	5	2,50	10	5,00	0,188	1,73	
Alelos	C	313	78,25	322	80,50	0,431	0,62	
	T	87	21,75	78	19,50	0,431	0,62	
MIR-211	G/A							
Genótipos	GG	64	32,00	62	31,00	0,829	0,05	
	GA	92	46,00	102	51,00	0,317	1,00	
	AA	44	22,00	36	18,00	0,317	1,00	
Alelos	G	220	55,00	226	56,50	0,669	0,18	
	A	180	45,00	174	43,50	0,669	0,18	
ALOX-12	G/A (ARG261GLN)							
Genótipos	GG	76	38,00	61	30,50	0,114	2,50	
	GA	95	47,50	106	53,00	0,271	1,21	
	AA	29	14,50	33	16,50	0,580	0,31	
Alelos	G	247	61,75	228	57,00	0,171	1,87	
	A	153	38,25	172	43,00	0,171	1,87	
NOTCH3	T/C (VAL2223ALA)							
Genótipos	TT	87	43,50	79	39,50	0,417	0,66	
	TC	88	44,00	89	44,50	0,919	0,01	
	CC	25	12,50	32	16,00	0,317	1,00	
Alelos	T	262	65,50	247	61,75	0,270	1,22	
	G	138	34,50	153	38,25	0,270	1,22	
MIR-266	C/G							
Genótipos	CC	147	73,50	152	76,00	0,565	0,33	
	CG	40	20,00	35	17,50	0,521	0,41	
	GG	13	6,50	13	6,50	1,000	0,00	
Alelos	C	334	83,50	339	84,75	0,628	0,23	
	G	66	16,50	61	15,25	0,628	0,23	
NEFH	C/A (ALA805GLU)							
Genótipos	AA	147	73,50	150	75,00	0,731	0,12	
	AC	53	26,50	48	24,00	0,565	0,33	
	CC	0	0,00	2	1,00	0,156	2,01	
Alelos	A	347	86,75	348	87,00	0,917	0,01	
	C	53	13,25	52	13,00	0,917	0,01	

Tabela 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microsatélites analisados (5/7).

GENE	POLIMORFISMO	CONTROLES	FREQ (%)	ESQUIZOFRÊNICOS	FREQ (%)	Pvalue	X ²	OD (CI)
		200		200				
	MICROSSATELITES							
RAI1	CAG/CAA (Q)n							
Genótipos	7,14	1	0,50	0	0,00			
	10,13	10	5,00	8	4,00			
	10,14	9	4,50	8	4,00			
	11,13	1	0,50	1	0,50			
	11,14	3	1,50	0	0,00			
	12,12	0	0,00	1	0,50			
	12,13	3	1,50	6	3,00			
	12,14	2	1,00	2	1,00			
	13,13	37	18,50	39	19,50	0,798	0,06	
	13,14	75	37,50	83	41,50	0,413	0,67	
	13,15	1	0,50	2	1,00			
	14,14	49	24,50	47	23,50	0,815	0,05	
	14,15	7	3,50	2	1,00			
	14,16	2	1,00	0	0,00			
	14,18	0	0,00	1	0,50			
Alelos	7	1	0,25	0	0,00			
	8	0	0,00	0	0,00			
	9	0	0,00	0	0,00			
	10	19	4,75	16	4,00			
	11	4	1,00	1	0,25			
	12	5	1,25	10	2,50			
	13	164	41,00	178	44,50	0,317	2,00	
	14	197	49,25	190	47,50	0,620	0,24	
	15	8	2,00	4	1,00			
	16	2	0,50	0	0,00			
	17	0	0,00	0	0,00			
	18	0	0,00	1	0,25			
NUMBL	CAG/CAA (Q)n							
Genótipos	14,18	2	1,00	0	0,00			
	14,20	1	0,50	1	0,50			
	17,18	1	0,50	0	0,00			
	18,18	75	37,50	100	50,00	0,012	6,35	1,67 (1,12-2,48)
	18,20	94	47,00	80	40,00	0,158	1,99	
	19,20	1	0,50	1	0,50			
Alelos	20,20	26	13,00	18	9,00	0,201	1,63	
	14	3	0,75	1	0,25			
	15	0	0,00	0	0,00			
	16	0	0,00	0	0,00			
	17	1	0,25	0	0,00			
	18	246	61,50	280	70,00	0,011	6,42	1,46 (1,09-1,96)
	19	1	0,25	1	0,25			
	20	149	37,25	118	29,50	0,020	5,40	0,70 (0,52-0,95)

Tabela 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microsatélites analisados (6/7).

GENE	POLIMORFISMO	CONTROLES	FREQ (%)	ESQUIZOFRÊNICOS	FREQ (%)	Pvalue	X ²	OD (CI)
		200		200				
	MICROSSATELITES (continuação)							
ASCL1	CAG/CAA (Q)n							
Genótipos	5,13	0	0,00	1	0,50			
	6,13	1	0,50	0	0,00			
	7,12	1	0,50	1	0,50			
	8,12	1	0,50	0	0,00			
	9,12	3	1,50	1	0,50			
	9,13	1	0,50	1	0,50			
	10,13	1	0,50	1	0,50			
	11,12	1	0,50	4	2,00			
	11,13	0	0,00	1	0,50			
	12,12	86	43,00	81	40,50	0,612	0,26	
	12,13	67	33,50	68	34,00	0,916	0,01	
	12,14	6	3,00	6	3,00			
	12,15	4	2,00	6	3,00			
	12,16	0	0,00	2	1,00			
	12,19	1	0,50	0	0,00			
	13,13	10	5,00	18	9,00	0,152	2,05	
	13,14	7	3,50	2	1,00			
	13,15	5	2,50	4	2,00			
	13,16	0	0,00	1	0,50			
	13,17	0	0,00	1	0,50			
	14,14	4	2,00	0	0,00			
	14,15	0	0,00	1	0,50			
	15,15	1	0,50	0	0,00			
Alelos	5	0	0,00	1	0,25			
	6	1	0,25	0	0,00			
	7	1	0,25	1	0,25			
	8	1	0,25	0	0,00			
	9	4	1,00	2	0,50			
	10	1	0,25	1	0,25			
	11	1	0,25	5	1,25			
	12	256	64,00	250	62,50	0,660	0,19	
	13	102	25,50	116	29,00	0,266	1,23	
	14	21	5,25	9	2,25			
	15	11	2,75	11	2,75			
	16	0	0,00	3	0,75			
	17	0	0,00	1	0,25			
	18	0	0,00	0	0,00			
	19	1	0,25	0	0,00			

Tabela 15: Frequências genotípicas e alélicas para os SNPs, INDELs e microssatélites analisados (7/7).

GENE	POLIMORFISMO	CONTROLES	FREQ (%)	ESQUIZOFRÊNICOS	FREQ (%)	Pvalue	X ²	OD (CI)
		200		200				
	INDELs							
NOGO	Inserção CAA no 3'UTR							
	11	84	42,00	87	43,50	0,762	0,09	
	12	86	43,00	89	44,50	0,762	0,09	
	22	30	15,00	24	12,00	0,380	0,77	
	1	254	63,50	263	65,75	0,505	0,44	
PCDHa cluster	2	146	36,50	137	34,25	0,505	0,44	
	Deleção de 16.1kb							
	1,1	172	86,00	169	84,50	0,672	0,18	
	1, del	28	14,00	31	15,50	0,672	1,18	
	del, del	0	0,00	0	0,00	1,000	0,00	
	1	372	93,00	369	92,25	0,685	0,16	
	del	28	7,00	31	7,75	0,685	0,16	

Genótipos e alelos de microssatélites estão expressos como número de repetições. Para NOGO: 11-homozigoto sem inserção; 12-heterozigoto; 22-homozigoto para inserção. Para PCDHa cluster: 1,1-homozigoto sem deleção; 1, del: heterozigoto; del,del:homozigoto com deleção. Resultados para o teste do qui-quadrado são apresentados para todos os genótipos e alelos, com exceção de alguns que apresentaram frequência menor que 5%, no caso de microssatélites. Encontram-se em destaque (negrito) valores de p que se mostraram estatisticamente significativos ($p<0.05$) ou com tendência a significância estatística ($0.05<p<1.0$). Nesses casos, o valor de odds -ratio (OD) também foi inserido, juntamente com o intervalo de confiança (CI).

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS ENTRE CASOS E CONTROLES

Em uma primeira análise, procuramos analisar se os genótipos para os polimorfismos se encontraram dentro do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Dos 41 polimorfismos avaliados, 37 se encontraram dentro do EHW. Não se mostraram em equilíbrio os SNPs de *PCDH11*, *MIR210*, *MIR266* e *NEFH*. O EHW foi descrito no início do século 20 (Hardy, 1908; Weinberg, 1908), como ocorrendo nas ocasiões em que as variações estudadas não estão associadas à migração, mutação, seleção natural, além de deverem estar associadas a gerações que não se sobrepõem e grandes populações com perfil randômico de cruzamento entre os indivíduos da espécie (Chen et al., 2005). Desvios do EHW podem indicar que essas variações não se enquadram dentro dos requisitos necessários, citados anteriormente, ou podem indicar erros de genotipagem (Wigginton et al., 2005). Entretanto, quando desvios de EHW são detectados, é difícil concluir o motivo sem antes realizar outros experimentos para identificar os fatores que causaram o desvio (Leal, 2005).

Além da análise com relação ao EHW, procuramos identificar se nossos genótipos apresentaram diferenças em sua frequência de acordo com o perfil étnico, já que nossa população Brasileira é bem diversificada e em nossa amostragem possuímos indivíduos de diferentes etnias. É importante ressaltar que o método que adotamos para determinação racial de cada indivíduo incluído neste estudo, isto é, através de análise visual da cor da pele, está longe de ser o mais apropriado. Tentamos fazer um controle genotípico de etnia, o que permitiria dizer se casos e controles apresentavam desvios significativos. No entanto, para isto, teríamos que incluir 80 novos marcadores, o que inviabilizaria os custos do projeto. A população Brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultante de 5 séculos de intercrossamentos entre indivíduos provenientes de 4 continentes: os europeus, representados principalmente pelos colonizadores portugueses, mas também por populações migrantes mais recentes provindas da Itália, Espanha e Alemanha; os escravos africanos; os ameríndios, já existentes na América do Sul, antes da colonização do Brasil; e os imigrantes asiáticos (Alves-Silva et al., 2000). Assim, torna-se extremamente difícil afirmar que um indivíduo aparentemente branco ou negro não possua em seu genoma uma forte contribuição dos DNAs de diferentes grupos ancestrais. De fato, um estudo que procurou analisar o DNA mitocondrial (representativo da linhagem materna) de indivíduos assumidos como brancos, revelou que há uma contribuição de mais de 60% dos DNAs de ameríndios e africanos para esse grupo (Alves-Silva et al., 2000), e um estudo que procurou, através da genotipagem de marcadores população-

específicos, determinar o nível de contribuição genética africana entre brancos e negros, revelou que ambos os grupos se posicionavam genomicamente entre os grupos de europeus e africanos, sugerindo que a determinação visual de etnia é um método pobre e pouco eficaz como preditor de ancestralidade (Parra et al., 2003). Entretanto, quando consideramos nossa divisão, pudemos notar uma forte correlação entre as frequências dos genótipos e as diferentes etnias, para uma série dos polimorfismos estudados (*FLNB*, $p=0,006$; *NOGO*, $p=0,045$; *NUDT6*, $p=0,032$; *PCDH12*, $p=0,013$; *SIM1*, $p=0,04$). Essa correlação reforça a necessidade de que estudos de associação gênica procurem parear as amostras dos grupos de casos e controles por esse aspecto, de preferência utilizando marcadores genéticos para uma divisão mais fidedigna. Para nos precavermos de falsas associações derivadas de estratificação étnica não detectada entre nossos casos e controles, adotamos o uso de um segundo set amostral, absolutamente distinto do ponto de vista étnico, composto por 350 casos e 350 controles Dinamarqueses. Esta validação interna foi feita com os marcadores mais sugestivos sugeridos em nossa amostra de brasileiros.

De qualquer forma, pudemos demonstrar, por exemplo, que a associação da inserção CAA na porção 3'UTR no gene *NOGO* (*RTN4*) com a EZ, sugerida por um grupo canadense (Novak et al., 2002), foi provavelmente fruto de um não-pareamento étnico entre os grupos avaliados. Estas conclusões foram a base da primeira publicação desta tese (Gregorio et al., 2005), na qual observamos uma diferença marcante entre as frequências dos alelos com ou sem inserção entre as diferentes etnias (tabela 16): enquanto a frequência do alelos contendo inserção é de 40,7% em euro-americanos, ela é de 20,4% em afro-americanos. O grupo intermediário de pardos possui uma frequência intermediária (28,7%). Dado o pequeno número de amostras avaliadas no estudo de Novak et al. (2002) e a ausência de informações sobre a constituição étnica dos grupos estudados, acreditamos que a correlação encontrada seja um falso positivo. Neste estudo também mostramos que, além de não estar associado à esquizofrenia, esta inserção também não se encontra associada ao Transtorno Bipolar. Neste estudo, demonstramos ainda que este loco aparenta ser monomórfico em primatas não humanos, e o evento aparenta de fato ser uma inserção. Todas as amostras de primatas não humanos avaliadas (derivadas das espécies *Pan troglodites* e *Papio hamadryas*) apresentavam o alelo menor, onde a repetição CAA estava ausente. Isto sugere que o alelo sem a inserção se trata do alelo primitivo, ou ancestral. Aparentemente este polimorfismo surgiu após a divergência entre os grupos Catarrhini e Platyrrhini.

Tabela 16. Frequências da inserção CAA na porção 3'UTR do gene NOGO em controles e pacientes esquizofrênicos, de acordo com o *background* étnico.

NOGO	Brancos		Pardos		Negros	
	CN	EZ	CN	EZ	CN	EZ
n	231	118	99	28	27	17
1,1	84 (36,4%)	42 (35,6%)	49 (49,5%)	16 (57,1%)	17 (63,0%)	10 (58,8%)
1,2	105 (45,4%)	57 (48,3%)	41 (41,4%)	10 (35,8%)	9 (33,3%)	7 (41,2%)
2,2	42 (18,2%)	19 (16,1%)	9 (9,1%)	2 (7,1%)	1 (3,7%)	0 (0%)
1	273 (59,1%)	141 (59,7%)	139 (70,2%)	42 (75,0%)	43 (79,6%)	27 (79,4%)
2	189 (40,9%)	95 (40,3%)	59 (29,8%)	14 (25,0%)	11 (20,4%)	7 (20,6%)

CN-grupo controle; EZ-grupo esquizofrênico; 1,1-Genótipo homozigoto sem inserção; 1,2-Genótipo heterozigoto; 2,2-Genótipo homozigoto com inserção

Os dados dos polimorfismos estudados também foram comparados de acordo com dados de sexo, e com dados clínicos referentes à subtipo de EZ, idade de início da doença, e gravidade da doença de acordo com análise feita através de escala PANSS. Não foram encontradas associações significativas para nenhum destes critérios.

Após uma análise estatística de cada polimorfismo deste estudo, de modo individual, observamos que quatro apresentaram diferença estatisticamente significativa na composição alélica ou genotípica entre os grupos de controles e pacientes. Para estes polimorfismos, não detectamos variação estatisticamente significativa na sua frequência entre os grupos étnicos presentes. No entanto, é novamente importante ressaltar que, mesmo com nosso esforço para buscar o melhor pareamento étnico possível entre nossas amostras, ainda podemos ter achados errôneos, devido a eventuais desvios étnicos entre os nossos grupos. Trabalhos deste tipo, buscando associação em indivíduos da população brasileira, constituem um grande desafio devido ao nosso elevado grau de miscigenação. Acreditamos, no entanto, que tais trabalhos sejam fundamentais, pois a população Brasileira, como descrito anteriormente, vem recebendo populações migrantes de diversos países, há vários anos, e hoje representa, de certo modo, um espelho da diversidade humana no planeta. Com o aumento do fluxo migratório entre as diversas regiões do globo, talvez a população brasileira apresente hoje um grau de miscigenação que seja compatível com a mistura populacional que ocorrerá na população mundial daqui a algumas gerações. Achados em populações isoladas são de tremendo valor, mas talvez não possam ser extrapolados para os demais países, pois talvez atuem dentro de um contexto de variações genético-ambientais peculiares a estas populações.

Diante de um eventual viés de associação criado por características próprias a uma eventual estratificação étnica que teria ocorrido entre nossos casos e controles, para os quatro polimorfismos que se mostraram associados à EZ nas amostras

brasileiras, localizados nos genes FZD3, NUMBL, MAP1B e AKT1, realizamos uma segunda análise, utilizando amostras de DNA dinamarquesas, doadas ao nosso grupo graças a uma colaboração com o grupo do Dr. Thomas Werge. A importância dessa análise se dá principalmente devido ao fato de podermos tentar replicar nossos achados em uma população etnicamente mais homogênea e bastante distinta da população brasileira, o que permite uma melhor análise da contribuição destes polimorfismos para a etiologia da EZ. Deste modo, para cada um destes quatro polimorfismos, além das 400 amostras brasileiras, avaliamos outras amostras Dinamarquesas (cerca de 350 controles e 350 casos) o que nos permitiu testar a real associação.

5.3.1. AKT1

Recentemente um estudo mostrou a associação entre um haplótipo constituído por 5 SNPs no gene *AKT1* e a EZ em uma população norte-americana (Emamian et al., 2004). O SNP que encontramos como associado na população Brasileira (rs3730358, C/T, no 5º intron) é um dos componentes do bloco haplotípico analisado no estudo de Emamian e colaboradores. Para esse SNP encontramos uma diferença significativa entre as frequências de heterozigotos nos grupos controle e esquizofrênico, estando essa aumentada entre os indivíduos controle (38,5% vs 29%, $p=0,044$, $\chi^2=4,04$, $OD=0,65$, 95%CI 0,43-0,99; tabela 15). O outro SNP por nós analisado, mas não analisado por Emamian et al., localizado 5kb *upstream* do gene *AKT1* (rs2498784), não demonstrou associação com a doença (tabela 15). Em uma análise utilizando o software Haploview observamos que em nossa população este SNP não se encontra em desequilíbrio de ligação com o anterior ($D'=0,047$). Esses dados por nós gerados reforçam a hipótese de que realmente *AKT1* se encontra associado à doença, e não algum outro gene em desequilíbrio de ligação com ele. Três outros estudos foram realizados com os marcadores do haplótipo de *AKT1* e EZ, sendo dois com a população Japonesa, tendo resultados contraditórios (associação: (Ikeda et al., 2004); não associação: (Ohtsuki et al., 2004a)), e um com uma população Européia (Schwab et al., 2005) com achados positivos para associação.

Ao tentarmos replicar nossos achados, através da genotipagem das amostras Dinamarquesas, não encontramos associação significativa (tabela 17). Adicionalmente, a distribuição de genótipos e alelos para esta população apresentou-se distinta da encontrada para a população Brasileira (genótipos: $p=0.0056$, $\chi^2=10,34$; alelos: $p=0.0003$, $\chi^2=12.48$).

Tabela 17: Frequências alélicas e genotípicas para o SNP no intron 5 de *AKT1*, nos grupos de controles e pacientes esquizofrênicos dinamarqueses.

	Controles	Freq. (%)	Esquizofrênicos	Freq. (%)
n	246		351	
CC	179	72,76	265	75,50
CT	60	24,39	77	21,94
TT	7	2,85	9	2,56
C	418	84,96	607	86,47
T	74	15,04	95	13,53

O envolvimento de *AKT1* no neurodesenvolvimento tem sido demonstrado através de estudos de expressão. Um deles demonstra sua expressão proeminente no cérebro em desenvolvimento de camundongos, a qual decresce gradualmente durante o desenvolvimento pós-natal, ficando bem reduzida no cérebro adulto (Owada et al., 1997). Outros estudos relatam que a indução ou inibição da expressão de *AKT1* afeta o processo de diferenciação neuronal (Vojtek et al., 2003; Peng et al., 2004).

O fato de não termos replicado nossos achados positivos com a população Brasileira na população Dinamarquesa não descarta o envolvimento desse gene na etiologia de EZ. Uma explicação para essa discrepância seria o fato de, até o momento, não existirem evidências de provável repercussão funcional para nenhum dos SNPs avaliados em *AKT1*, sendo todos SNPs sinônimos ou não codificadores, o que fala a favor da existência de outro SNP causal que esteja em desequilíbrio de ligação com estes SNPs. Assim, dada a provável diversidade de constituição haplotípica entre as diferentes populações, isso poderia explicar tanto a discrepância dos achados entre essas duas populações, quanto entre as populações estudadas nos trabalhos publicados anteriormente. Entretanto, para uma confirmação deste fato, um estudo de haplótipo comparando ambas as populações, deve ser feito para esses genes.

5.3.2. MAP1B

Para o SNP G/A (VAL468ILE) no gene MAP1B, encontramos um genótipo que mostrou possuir efeito protetor. Isso se dá pela maior prevalência desse genótipo, no caso o homozigoto para o alelo A, no grupo de controles, comparados a pacientes (4,5% vs 1%, $p=0,032$, $\chi^2=4,58$, $OD=0,21$, 95%CI 0,04-1,00, tabela 15).

Para MAP1B, Os nossos achados também não se replicaram quando analisamos amostras Dinamarquesas (tabela 18), que apresentaram uma distribuição semelhante de genótipos e alelos entre os grupos.

Tabela 18: Frequências alélicas e genotípicas para o SNP G/A (VAL468ILE) de MAP1B, nos grupos de controles e pacientes dinamarqueses.

	Controles	Freq. (%)	Esquizofrênicos	Freq. (%)
n	346		346	
GG	219	63,29	235	67,92
GA	114	32,95	100	28,90
AA	13	3,76	11	3,18
G	552	79,77	570	82,37
A	140	20,23	122	17,63

Assim como para *AKT1*, esse fato não descarta o envolvimento desse gene na etiologia de EZ. Da mesma forma, esse SNP poderia estar em desequilíbrio de ligação com o agente causal, e uma diferença na constituição haplotípica entre as populações Brasileira e Dinamarquesa poderia explicar a discrepância dos achados entre essas duas populações. Da mesma forma, para uma confirmação desta hipótese, um estudo de haplótipo comparando ambas as populações, deve ser feito para esses genes.

MAP1B é uma proteína regulada ao longo do desenvolvimento, expressa em altos níveis em neurônios em diferenciação e nas regiões do sistema nervoso adulto com plasticidade neuronal ou capacidade de regeneração após injúria (Gordon-Weeks & Fischer, 2000). Nos neurônios a expressão de *MAP1* é particularmente alta em axônios em desenvolvimento (Mansfield et al., 1991; Black et al., 1994; Bush et al., 1996). Seu importante papel no desenvolvimento de neuritos tem sido demonstrado pelos fenótipos obtidos através de camundongos *knockout* para esse gene (Edelmann et al., 1996; Takei et al., 1997; Gonzalez-Billault et al., 2000; Meixner et al., 2000). Alterações neuronais são uma característica da EZ, demonstradas por estudos neuropatológicos que relatam atrofia e perda neuronal, além de anormalidades em dendritos e axônios.

5.3.3. NUMBL

Nossas análises mostraram que o microssatélite CAG/CAA, codificador de uma repetição de glutaminas em NUMBL está associado à EZ, já que podemos observar nesse grupo uma maior prevalência de indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo contendo 18 repetições de glutamina (50% vs 37,5%, $p=0,012$, $\chi^2=6,35$, $OR=1,67$, 95%CI 1,12-2,48; tabela 15), além de uma maior quantidade de alelos com 18 repetições (70% vs 61,5%, $p=0,011$, $\chi^2=6,41$, $OR=1,46$, 95%CI 1,09-1,96; tabela 15), quando comparados a controles. Além disso, o alelo contendo 20 repetições mostrou apresentar um efeito protetor, estando mais presente em controles (37,2% vs 29,5%; $p=0,02$, $\chi^2=5,40$, $OR=0,70$, 95%CI 0,52-0,95; tabela 15). Através de análise no banco de dados dbSNP (build 125) não encontramos a presença de nenhum nsSNP nesse gene, sendo que o microssatélite polimórfico que utilizamos aparenta ser o único polimorfismo de DNA que acarreta em uma alteração na sequência de aminoácidos de NUMBL.

Em Dinamarqueses, também encontramos um excesso de alelos com 18 repetições assim como de genótipos homozigotos 18,18 em esquizofrênicos, com valores de P muito próximos aos adotados em nossa linha de corte (alelo 18Q: 65,4% vs 60,6%, $p=0,065$, $\chi^2=3,40$, $OR=1,23$, 95%CI 0,99-1,53; Genótipo homozigoto para 18Q: 42,9% vs 35,9%, $p=0,059$, $\chi^2=3,55$, $OR=1,34$, 95%CI 0,99-1,82) – Tabela 19.

Quando realizamos uma análise combinada de todos os 1,093 indivíduos (Brasileiros e Dinamarqueses; 550 pacientes e 543 controles) encontramos uma associação ainda maior do alelo 18Q com a EZ (alelo 18Q: 67% vs 61%, $p=0,003$, $\chi^2=8,67$, $OR=1,30$, 95%CI 1,09-1,55; genótipo 18/18: 45,5% vs 36,5%, $p=0,002$, $\chi^2=9,13$, $OR=1,45$, 95%CI 1,14-1,85).

Tabela 19: Frequências Genotípicas e alélicas para o polimorfismo CAG(Q)n de NUMBL em grupos controle e esquizofrênicos do Brasil e da Dinamarca.

	Controles BR (%)	EZ BR (%)	Controles DN (%)	EZ DN (%)	Controles Combinados (%)	EZ Combinados (%)
Alelos						
14	3 (0,7)	1 (0,3)	1 (0,1)	1 (0,1)	4 (0,4)	2 (0,2)
17	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,1)	0 (0)
18	246 (61,4)	280 (70)	416 (60,6)	458(65,5)	663 (61)	738 (67,1)
19	1 (0,3)	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)	1 (0,1)	1 (0,1)
20	149 (37,3)	118(29,4)	269 (39,3)	241(34,4)	417 (38,4)	359 (32,6)
Total	400 (100)	400 (100)	686 (100)	700 (100)	1086 (100)	1100 (100)
Genótipos						
14 , 18	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,4)	0 (0)
14 , 20	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,3)	1 (0,3)	2 (0,4)	2 (0,4)
17 , 18	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)	0 (0)
18 , 18	75 (37,5)	100 (50)	123 (35,8)	150(42,9)	198 (36,4)	250 (45,6)
18 , 20	94 (47)	80 (40)	170 (49,6)	158(45,1)	264 (48,6)	238 (43,3)
19 , 20	1 (0,5)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)	1 (0,2)
20 , 20	26 (13)	18 (9)	49 (14,3)	41 (11,7)	75 (13,8)	59 (10,7)
Total	200 (100)	200 (100)	343 (100)	350 (100)	543 (100)	550 (100)

Alelos e Genótipos estão expressos como número de repetições CAG

Nestas análises, podemos notar, como esperado, uma maior heterogeneidade genética entre indivíduos Brasileiros, comparados aos Dinamarqueses. Enquanto 5 alelos diferentes para NUMBL foram observados em 400 Brasileiros, apenas 3 foram observados em 693 Dinamarqueses. Certamente, este fato decorre da alta taxa de miscigenação racial encontrada no Brasil. Entretanto, não observamos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos as diferenças alélicas entre os dois grupos ($p=0,183$, $\chi^2=6,22$), mostrando que ambos são bastante similares e que as populações podem ser analisadas em conjunto. Além disso, uma segunda análise dos dados utilizando regressão logística aponta para os mesmos achados de associação positiva para este gene, e os resultados não se alteram quando os dados étnicos são incluídos no modelo. Além disso, esses resultados se mostram resistentes à correção de Bonferroni para testes múltiplos, utilizando-se um fator de 25, que excede o número de testes feitos para esse gene.

NUMBL possui papel crítico no controle do número de células progenitoras neurais, apesar de não estar claro o mecanismo pelo qual isso ocorre (promoção de diferenciação neuronal ou manutenção de progenitores neurais). Portanto, o mal funcionamento de NUMBL tem um potencial para afetar o neurodesenvolvimento. Até o momento, nenhum estudo avaliou o impacto deste microssatélite para a

suscetibilidade a nenhuma doença humana. Expansões em repetições de poliglutaminas têm sido associadas a uma série de doenças neurológicas (Reddy & Housman, 1997; Usdin & Grabczyk, 2000; Everett & Wood, 2004) mas nesse caso não encontramos expansão significativa para esse microssatélite, o qual variou entre 14 e 20 glutaminas. É interessante notar que a distribuição alélica para esse microssatélite não apresenta um padrão normal de distribuição. Dois alelos (18Q e 20Q) contribuem para 99.6% das isoformas, e os outros alelos (14Q, 17Q e 19Q) possuem frequência máxima de 0.8% (14Q). O alelo 18Q, assim como o genótipo homozigoto para 18Q aparentam possuir um efeito sutil para a etiologia da EZ. Entretanto, como a EZ é uma doença complexa e poligênica, é esperado que genes de pequeno efeito contribuam para sua etiologia.

Uma possível explicação para esse achado é que uma alteração sutil na atividade de NUMBL possa ter um efeito sobre a diferenciação de precursores neuronais. Entretanto, como esperado para fenômenos complexos como o desenvolvimento e maturação cerebral, assim como para uma doença complexa como a EZ, a simples presença dessa alteração não é absolutamente necessária, nem suficiente para causar o desenvolvimento da psicose. Sua importância deve se dar durante estágios críticos do neurodesenvolvimento e maturação cerebral, nos quais seu efeito é aditivo junto a alterações sutis que devem ocorrer em outros genes. Os dados de NUMBL, assim como de outros genes da via de NOTCH foram agrupados e submetidos à publicação recentemente (Gregório et al., 2006a - anexo 2).

5.3.4. FZD3

O SNP no promotor de *FZD3* (C-68T) mostrou-se associado à EZ em nossa população Brasileira, sendo encontrada uma maior frequência do genótipo homozigoto TT dentre o grupo de esquizofrênicos quando comparado ao de controles (8% vs 3%; $p=0,028$; $\chi^2=4,81$; $OD=2,8$, $CI= 1,08$ to $7,34$; tabela 15).

Como pode ser observado na tabela 20, apesar de na população de esquizofrênicos Dinamarqueses podermos observar também um aumento na frequência de homozigotos TT comparados ao grupo controle (3,4% vs 1,6%), esta diferença não se mostrou significativa ($p=0,115$, $\chi^2=2,48$). Entretanto, dado o fato de as distribuições genotípica e alélica se mostrarem semelhantes entre as amostras Brasileira e Dinamarquesa (genótipos, $p=0,515$, $\chi^2=1,32$; alelos, $p=0,774$, $\chi^2=0,08$), resolvemos agrupá-las, e ao analisarmos novamente as frequências genotípica e alélica entre controles e esquizofrênicos, observamos uma associação mais forte do

que a encontrada na população Brasileira isoladamente ($p=0,0056$; $\chi^2=7,64$; $OD=2,65$, $CI= 1.29$ to 5.43).

Tabela 20: Frequências Genotípicas e Alélicas para o SNP C-68T de FZD3 nas populações Brasileira e Dinamarquesa.

		Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas		Valor de P (TT x outros genótipos)
	n	CC	CT	TT	C	T	
<i>Amostra Brasileira</i>							
Pacientes	200	149 (74,5)	35 (17,5)	16 (8,0)	333 (83,2)	67 (16,8)	0,0282
Controles	200	155 (77,5)	39 (19,5)	6 (3,0)	349 (87,3)	51 (12,7)	
<i>Amostra Dinamarquesa</i>							
Pacientes	277	209 (75,5)	58 (20,9)	10 (3,6)	476 (84,9)	78 (14,1)	0,1151
Controles	317	245 (77,3)	67 (21,1)	5 (1,6)	557 (87,9)	77 (12,1)	
<i>Amostras Brasileira + Dinamarquesa</i>							
Pacientes	477	358 (75,0)	93 (19,5)	26 (5,5)	809 (84,8)	145 (15,2)	0,0056
Controles	517	400 (77,4)	106 (20,5)	11 (2,1)	906 (87,6)	128 (12,4)	

Frequências estão entre parênteses. Valores de p estatisticamente significativos estão marcados em negrito.

Os estudos previamente publicados, envolvendo polimorfismos no gene *FZD3* e a EZ, não incluem nenhum SNP que possua uma provável consequência funcional. Os SNPs até então avaliados incluem alterações sinônimas (rs2241802) ou estão localizados em regiões intrônicas do gene (rs960914, rs352210, rs2323019, rs352203, 352226). Três dos estudos foram conduzidos com populações Japonesas, gerando resultados contraditórios (correlação positiva: (Katsu et al., 2003); sem correlação: (Ide et al., 2004; Hashimoto et al., 2005). Dois estudos foram conduzidos com populações chinesas, ambos encontrando associação positiva com a EZ (Yang et al., 2003a; Zhang et al., 2004b), e um estudo apenas foi conduzido com uma população ocidental (Inglesa), não encontrando associação (Wei & Hemmings, 2004). Nosso estudo é o primeiro a avaliar em *FZD3* um SNP com provável consequência funcional, dada sua localização em possível região promotora do gene.

O fato de, em nossas análises, termos encontrado para SNP resultados mais significativos na população Brasileira poderia sugerir que o SNP fosse um marcador de um bloco haplotípico que contenha o verdadeiro polimorfismo causal. Divergências nos blocos haplotípicos entre as populações do Brasil e da Dinamarca poderiam explicar a maior associação encontrada na primeira população. Para esclarecer estas questões, fizemos uma análise haplotípica desta região, genotipando 5 outros SNPs (figura 19, seção "Materiais e Métodos"), três *upstream* do SNP do promotor de *FZD3* (estando o mais distante localizado 26.7kb *upstream*); e dois *downstream* (estando o mais distante localizado 9.3kb *downstream*), perfazendo uma avaliação de um bloco

total de 36kb. Os resultados mostraram que o SNP do possível promotor de *FZD3* (rs7836920) não se encontra em forte desequilíbrio de ligação com nenhum dos outros polimorfismos avaliados nestas populações, apesar de encontrar-se em certo desequilíbrio de ligação (DL) com o SNP no 1º íntron do gene *FBXO16* (rs1908916, mapeado 4.4Kb *upstream* do SNP rs7836920) tanto na população Brasileira ($D' = 0,51$; $r^2 = 0,22$; $x^2 = 0,22$; $LOD = 17,69$) quanto na Dinamarquesa ($D' = 0,71$; $r^2 = 0,35$; $x^2 = 0,35$; $LOD = 40,19$), sendo esse DL um pouco maior na população da Dinamarca. No entanto, em nenhuma destas populações, o SNP da possível região promotora se encontrava em DL com os demais marcadores estudados pelos demais grupos, inclusive com o SNP rs960914 (mapeado 9.2Kb *downstream* do SNP rs7836920), o qual havia sido relatado como associado à EZ nas populações Japonesa e Chinesa. Um fato interessante é que em uma análise através do HapMap, observamos que nessas duas populações asiáticas, o SNP rs960914 se encontra em desequilíbrio de ligação com o SNP no promotor de *FZD3*, o que também poderia sugerir que a associação encontrada por esses grupos possa ser decorrente do desequilíbrio de ligação com o SNP por nós estudado, caso esse possuísse consequências funcionais para a expressão de *FZD3*.

A fim de testar essa nova hipótese (que o SNP C-68T possuiria consequências funcionais para a expressão de *FZD3*), fizemos inicialmente uma análise em busca de sítios de ligação de fatores de transcrição no promotor de *FZD3*, através do uso da ferramenta PROSCAN (<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/>). Essa análise revelou que o polimorfismo C-68T abole a sequência consenso 5'CCCMNSSS3' (Faisst & Meyer, 1992) requerida para a ligação de AP-2, um dos fatores de transcrição mais críticos para a expressão de genes neurais (Mitchell et al., 1991) (figura 20). De fato, a sequência original que temos neste sítio de ligação é 5'CCCCGGGC3', o que é compatível com um dos sítios de ligação de AP-2; no entanto, na presença do alelo T, a sequência consenso deixa de existir, se tornando 5'CTCCGGGC3'.

Figura 20. Possível sequência promotora de FZD3, predita pelo programa PROSCAN.

A sequência está ilustrada desde seu início, na base -179, com relação ao sítio de início da transcrição do gene (bases marcadas em verde), até o seu fim, na base +72. Sítios de ligação de fatores de transcrição estão demarcados e o sítio de ligação de AP-2, abolido pelo SNP C-68T está destacado em amarelo, estando a base polimórfica marcada em vermelho.

No estudo de (Xu et al., 1999) é demonstrado que um SNP em um sítio de ligação a AP-2, ocorrendo em outro gene, leva a uma menor ligação desse fator e a conseqüente diminuição na atividade transcricional. Dessa forma, decidimos realizar um ensaio de transfecção utilizando gene repórter (luciferase; kit Dual Luciferase Assay System, Promega) precedido pelo nosso promotor de *FZD3*, contendo as duas versões deste alelo, procurando investigar se o SNP estaria acarretando uma alteração na atividade do promotor. Dada a sugestão de que o SNP afetaria a ligação de AP-2, co-transfectamos junto aos plasmídeos com promotor de *FZD3*, plasmídeos de expressão contendo o gene que codifica para AP-2.

No entanto, após a transfecção de células da linhagem 293T, observamos que as construções contendo o promotor de *FZD3* polimórfico (contendo o alelo T) apresentaram atividade 60% maior do que a apresentada para as construções com alelo C (figura 21, $p < 0,001$).

Figura 21. Comparação entre as atividades de luciferase observadas após transfecção de células 293T com construções de pGL3 (Promega) contendo os promotores de FZD3 com o alelo C (C) ou alelo T (T).

INV: controle negativo de atividade do promotor de FZD3 (promotor inserido no sentido inverso em pGL3); + : controle positivo de transfecção (pGL3control); - : controle negativo de transfecção (pGL3basic). As leituras de atividade de luciferase aqui mostradas foram normalizadas de acordo com a leitura de Renilla luciferase (pRL-CMV, controle interno de eficiência de transfecção), e de forma a reunir os dois experimentos em replicata em um só gráfico.

Por outro lado, nas condições em que co-transfectamos os plasmídeos contendo o promotor de FZD3 com plasmídeos de expressão de AP-2, não pudemos observar a ativação de nenhum dos promotores por esse fator de transcrição (Figura 22). Ao contrário, além de não observar diferenças entre as condições sem presença de AP-2 e na presença de AP-2 na proporção de 1:1, observamos uma redução nas atividades dos promotores com alelo C (17%, $p < 0,05$) e alelo T (23%, $p < 0,001$) quando aumentamos a proporção pGL3:AP-2 de 1:1 para 1:2. A superexpressão de AP-2 pelas células, quando transfectadas com AP-2, foi confirmada tanto através do uso de controles internos (figura 22b) quanto através de Western Blot, onde usamos anticorpos específicos anti-AP-2 (figura 23).

Figura 22. Análise dos efeitos da superexpressão de AP-2 sobre a atividade do promotor de FZD3.

(A) Análise dos efeitos da superexpressão de AP-2 sobre a atividade dos promotores de FZD3 selvagem (C) e polimórfico (T), nas condições em que o plasmídeo pRSV-AP-2 foi transfectado junto ao pGL3 nas proporções de 1:1 e 2:1. O gráfico B, ilustra a comprovação de que AP-2 estava sendo expresso pelo vetor pRSV-AP-2, através do uso de um plasmídeo pGL2 contendo um sítio de ativação por AP-2 (AP-2LUC) nas condições com ou sem co-transfecção com pRSV-AP-2, na proporção de 1:1, e do uso de um plasmídeo pGL2 contendo apenas um TATAbox, nas mesmas condições.

Figura 23. Resultado de análise por Western Blot para confirmar a superexpressão de AP-2 em culturas da linhagem 293T transfectadas com diferentes quantidades da construção RSV-AP-2.

A) Extratos revelados com antisoro anti-AP-2, revelando uma banda de 52KDa correspondente ao peso molecular deste fator de transcrição. São mostradas as três condições em que as culturas foram transfectadas, ou seja, quando elas não foram transfectadas com a construção RSV-AP-2, quando foi utilizada a mesma quantidade de RSV-AP-2 (0.2ug) com relação à quantidade de pGL3 contendo o promotor de FZD3 (AP-2 1:1), e quando o dobro da quantidade (0.4ug) foi utilizada (AP-2 2:1). B) Coloração da membrana de nitrocelulose com Ponceau, após a transferência dos extratos separados por SDS-Page do gel para a mesma. Essa coloração foi utilizada como controle de aplicação das mesmas quantidades de cada extrato no gel. PM – Padrão de Peso Molecular (Benchmark, Invitrogen).

Essa redução na atividade do promotor de FZD3 quando na presença de AP-2 pode sugerir que a diferença de atividade que estamos observando entre os promotores, na condição celular basal, deva ocorrer por conta de outro fator de transcrição, que deve se ligar com maior afinidade ao promotor contendo o alelo T. Pode ser também que a expressão de AP-2 possa estar interferindo na ligação desse outro fator de transcrição, o que resultaria nessa diminuição de atividade do promotor quando os níveis de AP-2 celulares são aumentados. De qualquer forma, pudemos comprovar que este polimorfismo aparentemente leva a uma alteração da atividade deste promotor, o que certamente teria consequências sobre a modulação de *FZD3*.

A fim de confirmar que a maior atividade do promotor polimórfico de FZD3 estaria ocorrendo também em linhagens celulares de tecidos nervosos, decidimos realizar um novo experimento de transfecção, comparando as atividades do promotor selvagem e polimórfico, em uma linhagem de neuroblastoma (SH-SY5Y). Quando utilizamos esta linhagem, derivada de sistema nervoso central, observamos um aumento ainda maior na atividade do promotor contendo o alelo T, que neste caso foi 73.6% superior do que a encontrada com o alelo selvagem ($p < 0,001$, figura 24).

Figura 24. Comparação entre as atividades de luciferase observadas após transfecção de células SH-SY5Y com construções de pGL3 (Promega) contendo os promotores de FZD3 com o alelo C (C) ou alelo T (T).

INV: controle negativo de atividade do promotor de FZD3 (promotor inserido no sentido inverso em pGL3); + : controle positivo de transfecção (pGL3control); - : controle negativo de transfecção (pGL3basic). As leituras de atividade de luciferase aqui mostradas foram normalizadas de acordo com a leitura de Renilla luciferase (pRL-CMV, controle interno de eficiência de transfecção), e de forma a reunir os dois experimentos em replicata em um só gráfico.

Independente dos resultados encontrados para as condições de superexpressão de AP-2 em 293T, nossos achados, replicados em duas diferentes linhagens celulares, sugerem que o SNP C-68T resulta em uma maior atividade de *FZD3*, o que pode ter consequências sobre o neurodesenvolvimento. De fato, é interessante notar a recente descrição de um SNP (denominado rSNP, para indicar sua função regulatória) onde o alelo variante apresentava ganho de função, com a criação de um novo elemento promotor, que interfere na ativação normal de de três genes mapeados *downstream* dele e resulta, conseqüentemente, na doença a-talassemia (De Gobbi et al., 2006). Esse pode ser o caso de nossos achados com *FZD3*. Estudos futuros (por exemplo, através de EMSA) podem ajudar a esclarecer se o SNP C-68T, no possível promotor de *FZD3*, estaria criando um novo elemento promotor, responsivo a algum outro fator de transcrição que estaria induzindo sua atividade e acarretando o aumento transcricional do gene, como observamos pelos ensaios de gene-repórter.

Estudos de expressão sugerem que *FZD3* é um transcrito pouco abundante em tecidos humanos adultos (Kirikoshi et al., 2000; Sala et al., 2000). Entretanto, sua expressão no cérebro em desenvolvimento é alta, sugerindo seu importante papel durante a neurogênese (Kirikoshi et al., 2000). Esse dado é consistente com os altos níveis de transcritos *FZD3* no SNC, durante a embriogênese de camundongos (Wang et al., 1996) e dobramentos neurais durante a embriogênese de *Xenopus* (Shi et al., 1998). Além disso, *FZD3* é mais expresso em áreas do SNC envolvidas com doenças psiquiátricas (Kandel, 1991), quando comparado a outros tecidos e regiões cerebrais, incluindo regiões límbicas (Sala et al., 2000). Dessa forma, acreditamos que uma disfunção na expressão de *FZD3* possa resultar em anormalidades de neurodesenvolvimento.

Dois estudos utilizando camundongos knockout para *FZD3* (Wang et al., 2002; Wang et al., 2006) relatam que o cérebro desses animais passa a não possuir ou apresenta uma redução significativa em diversas estruturas cerebrais, tais como: trato corticoespinal, corpo caloso, trato corticotalâmico e comissão hipocampal. Além disso, é observada uma fragmentação dos axônios, o que deve resultar em anomalias no crescimento e direcionamento axonal. Ainda não há estudos nos quais as consequências de superexpressão de *FZD3* tenham sido estudadas, mas dada a importância desse gene para o desenvolvimento cerebral normal, confirmada pelos estudos de *knockout*, é esperado que uma expressão acima do normal, como sugerido por nosso estudo de transfecção, deva afetar o desenvolvimento do SNC.

Ide et al. (2004) avaliou os níveis de expressão de *FZD3* nos cérebros de pacientes esquizofrênicos (27) e controles (27), e não encontrou diferenças

significativas. Entretanto, este estudo utilizou cérebros *post-mortem* e analisou apenas o córtex pré-frontal dorsolateral. Há evidências de que, em cérebro adulto, a expressão de *FZD3* é mais significativa no núcleo caudato, amígdala, corpo caloso e hipocampo, e que sua expressão é quase indetectável em outras áreas cerebrais (Kirikoshi et al 2000). Por outro lado, a expressão de *FZD3* é muito maior em cérebros fetais (Kirikoshi et al 2000), e isso pode explicar os achados negativos em regiões do cérebro adulto de pacientes. Talvez estas alterações ocorram, e sejam de fato importantes, nos estágios iniciais do neurodesenvolvimento.

5.4. ANÁLISE MULTILOCUS

Fenótipos complexos como a EZ devem surgir a partir da interação entre múltiplos genes ou múltiplos elementos regulatórios, que trazem consigo pequenas alterações funcionais. Aparentemente estes agentes estão distribuídos em diversas regiões do genoma e alterações individuais não são suficientes para o estabelecimento da doença. Sendo assim, é apropriado buscar conjuntos de marcadores em diferentes genes e analisar estes marcadores simultaneamente ao invés de testar cada marcador apenas de forma isolada. Atualmente, a grande maioria dos estudos avalia essencialmente um marcador polimórfico por vez. Os polimorfismos que se mostram associados são sugeridos por estarem próximos ou dentro de genes de suscetibilidade. No entanto, a análise de um grande número de polimorfismos pode levar à geração de resultados falsos-positivos (erros tipo I - (Risch & Merikangas, 1996; Yang et al., 2005a; Zou & Zuo, 2006), caso eles sejam tratados de forma independente. Os problemas envolvendo os múltiplos testes utilizados e seus efeitos sobre a geração de erros tipo I tem sido foco de inúmeros debates (Zhang & Zhao, 2001; Fan & Knapp, 2003; Kim et al., 2003; Khat et al., 2004; Yang et al., 2005a; Zou & Zuo, 2006), cada vez mais acentuados diante da possibilidade de avaliarmos, por meio de ferramentas recentes, milhares de SNPs simultaneamente. Se por um lado a análise simultânea de vários marcadores requer correções drásticas para análises múltiplas, a abordagem de testar cada marcador de forma independente ignora completamente a natureza multigênica de fenótipos complexos e não leva em conta as possíveis interações que devem ocorrer entre os genes que conferem suscetibilidade às doenças.

Para contornar esse problema, recentemente Hoh et al. (2001) desenvolveram um método, denominado “set association” (disponível através do software SUMSTAT: “<http://linkage.rockefeller.edu/ott/sumstat.html>”), que realiza testes de significância simultâneos para diversos *sets* de locos, ao passo em que consegue controlar a taxa

de erros tipo I (Kim et al., 2003). De forma a aumentar o poder deste teste, ou seja, para limitar a taxa de falsos-negativos, cada marcador é amplamente avaliado para uma série de critérios: associação alélica, EHW, e evidências de erros de genotipagem. Múltiplos polimorfismos em diferentes locos genômicos são combinados de forma a gerar em *set* que é avaliado pela estatística que seria utilizada para um marcador apenas. De acordo com os autores do método, essa abordagem para detectar marcadores polimórficos que interagem estando associados a um fenótipo, apresenta uma baixa taxa de falsos-positivos, já que menos testes estatísticos necessitam ser utilizados. Adicionalmente, esse método pode ser utilizado no lugar das correções de Bonferroni e FDR (do inglês: False Discovery Rate) (Wille et al., 2003), comumente utilizadas em estudos que realizam análises de vários locos, mas que acabam por gerar erros tipo II (falsos-negativos - (Gyorffy et al., 2005), já que para doenças que são causadas por genes de pequeno efeito, associações estatísticas extremamente significativas, com valores de muito menores que 0,05, como requerido após uma correção de Bonferroni, por exemplo, não são esperadas.

Esse método já se mostrou eficiente em detectar associação de *sets* de marcadores em três estudos publicados recentemente. Um deles encontrou associação de um trio de SNPs, mapeados em três genes envolvidos com o metabolismo de colesterol, e a Doença de Alzheimer (DA) (Papassotiropoulos et al., 2005). Outro identificou um haplótipo composto por 5 SNPs no gene HSD11B1, envolvido com o metabolismo de glucocorticóides, como associado a DA (de Quervain et al., 2004). Por último, um terceiro de farmacogenética, avaliou o efeito de 45 polimorfismos em 19 genes, buscando identificar associação com uma boa ou má resposta à hidroclorotiazida, composto regulador de pressão arterial. Esse estudo foi capaz de identificar dois SNPs em um gene envolvido com canais de Sódio como associados a resposta ao medicamento (Maitland-van der Zee et al., 2005).

Uma limitação deste método é que ele apenas permite avaliar apenas marcadores bialélicos, sendo que microssatélites não podem ser inseridos na análise. Assim, pudemos utilizá-lo apenas para a análise de interação entre os SNPs e indels que estudamos, totalizando 38 marcadores avaliados (dentre os 41 que foram analisados para todo o *set* amostral; foram excluídos da análise os microssatélites de *NUMBL*, *RAI1* e *ASCL1*). Em nosso estudo, após analisarmos os 38 marcadores na população Brasileira, utilizando o método de *set* association, o qual testa a hipótese nula de não associação de nenhum loco com a doença, encontramos a associação de um conjunto de 5 polimorfismos com a esquizofrenia ($p=0,0296$, figura 25). Três destes polimorfismos estão mapeados em genes descritos anteriormente por nós como

associados à EZ: *FZD3*, *MAP1B* e *AKT1*. Além destes, dois outros genes foram adicionados ao set de genes associados, *SEMA6C* e *ADAM28*, genes para os quais havíamos encontrado apenas uma tendência à significância estatística para associação com a EZ (SNP C/A (PRO455THR) em *SEMA6C*, $p=0,083$, $\chi^2=3,01$, OD=0,4, 95%CI 0,14-1,16; SNP G/A (MET684ILE) em *ADAM28*, $p=0,096$, $\chi^2=2,78$, OD=1,76, 95%CI 0,90-3,45, tabela 14).

Figura 25. Resultado da análise multilocus realizada através do uso do método “Set Association”.

O gráfico ilustra o resultado da análise, que se baseia na ordenação dos locos em ordem decrescente, de acordo com os valores estatísticos gerados para eles (como explicado na seção de Materiais e Métodos). A medida que cada loco vai sendo adicionado, um valor de p para o conjunto de locos formado é definido. O conjunto que apresentar o menor valor de p é considerado como associado ao fenótipo.

5.4.1. Possível papel das vias de WNT e NOTCH na etiologia da EZ

É interessante notar que os genes encontrados em nosso estudo como associados à EZ, tanto pela análise individual (*AKT1*, *MAP1B*, *NUMBL*, *FZD3*) quanto pela análise multilocus (*AKT1*, *MAP1B*, *FZD3*, *SEMA6C*, *ADAM28*), se encontram envolvidos direta ou indiretamente com as vias sinalizadoras de WNT e NOTCH.

Como relatado anteriormente (introdução), *FZD3*, *AKT1* e *MAP1B* estão envolvidos na via de WNTs. *FZD3* faz parte da família de receptores Frizzeld, que são os receptores de membrana das proteínas WNT, cuja ligação leva à transdução de sinal desta via por diversos mecanismos. *AKT1* é capaz de fosforilar e inibir GSK3 β , proteína chave da via, que promove a degradação β -catenina, participando da via canônica de WNT. Por outro lado, GSK3 β fosforila, além de β -catenina, a proteína *MAP1B* (Goold et al., 1999). O envolvimento de GSK3 na via das semaforinas foi demonstrado, permitindo estabelecer uma conexão entre esta via e a via dos WNTs (Eickholt et al., 2002). Como o gene *SEMA6C* faz parte desta família, seu envolvimento com a via de WNTs também pode ser postulado.

Já *NUMBL* é componente da via NOTCH, sendo capaz de modulá-la, apesar de não se saber ao certo se isto ocorre através de ativação ou inibição desta via. Por outro lado, um estudo de *knockout* de um dos membros da família gênica ADAMs resultou em alterações significativas na sinalização da Via Notch (Hartmann et al., 2002). Por *ADAM28* pertencer a família gênica ADAMs, seu envolvimento na via NOTCH pode então ser também sugerido.

Muitos estudos demonstram que as vias de NOTCH e WNT têm importante papel durante o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos, incluindo um papel extremamente importante durante a neurogênese (McMahon & Bradley, 1990; Kopan & Turner, 1996; Cadigan & Nusse, 1997; Hrabe de Angelis et al., 1997; Wodarz & Nusse, 1998; Apelqvist et al., 1999; Hall et al., 2000; Lee et al., 2000; Shimizu et al., 2000; Kiernan et al., 2001; Kim & Hebrok, 2001; De Bellard et al., 2002; Castelo-Branco et al., 2003; Przembeck et al., 2003; Wu et al., 2003). O mecanismo de ação dessas vias ocorre através de suas sinalizações durante a embriogênese, que são essenciais para guiar processos celulares básicos necessários para padrões de formação corretos, determinação de destino e polaridade celular.

Há também uma série de estudos que sugerem que essas vias se comunicam através de diversos processos, dentre eles: a ligação do domínio intracelular de NOTCH (D1CN) a WNT (Wesley, 1999) e Disheveled (Axelrod et al., 1996), e a inibição de NOTCH por GSK3 β (Espinosa et al., 2003). A importância da proteína PS1

(presenilina 1) para esse *cross-talk* entre as vias também foi sugerida por esta ligar-se a β -catenina e ao mesmo tempo clivar NOTCH liberando o DICN (De Strooper & Annaert, 2001). Além disso, outros estudos também evidenciam mecanismos de regulação entre essas vias, como através da ligação do domínio extracelular de NOTCH a WNT (Wesley, 1999) ou DSV (Axelrod et al., 1996). Também já foi demonstrado que GSK3 β , proteína envolvida na via de WNT, também fosforila membros da via NOTCH (Espinosa et al., 2003).

O envolvimento da via dos WNTs em EZ tem sido sugerido tanto por estudos que relatam alterações no nível das proteínas ou na expressão de genes dessa via em cérebro de pacientes (Cotter et al., 1998; Miyaoka et al., 1999; Beasley et al., 2001), quanto em estudos de associação, com os genes *NRG1* (Stefansson et al., 2003; Yang et al., 2003b); *AKT1* (Emamian et al., 2004) e *FZD3* (Yang et al., 2003; Katsu et al., 2003; Zhang et al., 2004). Além disso, recentemente foi relatado um caso de co-ocorrência da doença CADASIL, causada por mutações no gene *NOTCH3* pertencente a via sinalizadora NOTCH, e EZ (Lagas & Juvonen, 2001).

Pouco se sabe sobre o envolvimento dos membros da via sinalizadora NOTCH em EZ. Com relação a estudos de associação, apenas o gene *NOTCH4* foi analisado e a grande maioria dos achados foi negativa (Fan et al., 2002; Carmine et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Kaneko et al., 2004; Tochigi et al., 2004).

Ainda não há estudos de associação envolvendo membros da família gênica ADAMs, ou da via de semaforinas em EZ. No entanto, um estudo recente descreveu o aumento da semaforina SEMA3A em cerebelo de pacientes esquizofrênicos (Eastwood et al., 2003).

Com base em todas as informações relatadas acima, sabemos, portanto, que as vias de WNT e NOTCH atuam em conjunto para regular o processo de neurodesenvolvimento, e ao mesmo tempo seu envolvimento na EZ tem sido postulado. Os resultados de nosso estudo sugerem fortemente o envolvimento dessas vias na etiologia da EZ e reforçam estudos anteriores que apresentavam evidência desse fato. O fato de genes envolvidos nessas vias terem sido associados a EZ no presente estudo também reforçam a hipótese do neurodesenvolvimento para a doença, já que essas vias têm papel crucial para o desenvolvimento do SNC. Novos estudos, focando apenas os genes pertencentes a essas vias, poderão contribuir significativamente para a compreensão da magnitude de seu envolvimento na etiologia da EZ.

5.5. CORRELAÇÃO COM DADOS DE MORFOMETRIA CEREBRAL

Após cruzarmos os dados de frequência dos polimorfismos de nosso estudo com os dados de morfometria cerebral, gerados para 25 indivíduos esquizofrênicos, observamos associações estatisticamente significativas para dois genes. O polimorfismo de *RELN* (C/G-Val997Leu) pôde ser associado a três diferentes medidas dos ventrículos cerebrais (Tabela 21). Encontramos, em nossa população, 19 indivíduos com genótipos homozigoto CC e 6 heterozigotos CG. Quando comparados aos indivíduos CG, o grupo CC apresentou medidas volumétricas aumentadas para o ventrículo direito (RVC direito: $2,18 \pm 0,72$ vs $1,33 \pm 0,23$, resultado do teste-t: $p < 0.001$), para volume ventricular total (RVC total: $2,31 \pm 0,86$ vs $1,43 \pm 0,26$, resultado do teste-t: $p = 0,001$), e para o volume do ventrículo esquerdo (RVC esquerdo: $2,45 \pm 1,07$ vs $1,53 \pm 0,32$, resultado do teste-t: $p = 0,058$). Entretanto, após a análise pelo GLM, apenas o volume do ventrículo esquerdo mostrou-se associado com o genótipo para *RELN* ($p = 0,044$). Indivíduos GG para esse polimorfismo não foram encontrados dentre os 25 pacientes testados. Como relatado anteriormente, alguns estudos demonstram uma redução em 50% nos níveis de RNA e proteína para *RELN* em estruturas corticais do cérebro postmortem e soro de pacientes esquizofrênicos (Fatemi et al., 2001; Eastwood and Harrison, 2003), o que se encontra de acordo com os achados recentes de metilação aumentada na região promotora deste gene em EZ (Grayson et al., 2005).

Tabela 21: Associações observadas entre o polimorfismo de *RELN* e as medidas ventriculares cerebrais.

Gene	Medidas dos ventrículos		
	RVCesquerdo	RVC direito	RVC total
<i>RELN</i>			
CC (n=19)	$2,45 \pm 1,07$	$2,18 \pm 0,72$	$2,31 \pm 0,86$
CG (n=6)	$1,53 \pm 0,32$	$1,33 \pm 0,23$	$1,43 \pm 0,26$
Valor de P obtido para o teste T	0,052	0,001*	0,001*
Valor de P obtido para o GLM	0,044*	0,129	0,076

RVC: Razão ventrículo: cérebro. Valores de p significativos estão marcados com *.

O SNP mapeado no gene *PCDH12* (G/A- Ser640Asn) mostrou-se associado ao coeficiente de assimetria do Índice de Girificação cerebral (CAIG) (Tabela 22), uma medida que reflete a taxa de diferenciação cortical cerebral (Zilles et al., 1988). Em indivíduos heterozigotos para esses SNP, o CAIG sugeriu uma maior girificação no hemisfério direito cerebral ($p=0,008$). Para esse gene, na população estudada, encontramos 20 indivíduos com o genótipo homozigoto GG (CAIG = $0,0048 \pm 0,032$) e 5 indivíduos GA (CAIG = $0,052 \pm 0,033$). Essa associação mostrou-se significativa mesmo após a análise através de GLM ($p=0,008$). Em 2002, Crow sugeriu o possível envolvimento de um par de protocaderinas, mapeadas nos cromossomos sexuais, com a assimetria anatômica cerebral (Crow, 2002). Entretanto, um estudo publicado por seu grupo não foi capaz de associar nenhuma variação nesses genes com a psicose (Giouze et al., 2004). Acreditamos que é possível que outros membros dessa mesma família gênica possam estar associados com a assimetria cerebral observada em EZ.

Tabela 22: Associações observadas entre o SNP de *PCDH12* e as medidas de Índice de Girificação Cerebral.

Gene	Medidas do IG		
	IGD	IGE	CAIG
<i>PCDH12</i>			
GG (n=20)	$2,447 \pm 0,175$	$2,434 \pm 0,162$	$0,0048 \pm 0,032$
GA (n=5)	$2,594 \pm 0,129$	$2,465 \pm 0,155$	$0,052 \pm 0,033$
Valor de P obtido para o teste T	0,702	0,092	0,008*
Valor de P obtido para o GLM	0,132	0,967	0,008*

IG: Índice de Girificação; IGE: IG esquerdo; IGD: IG direito; CAIG: coeficiente de assimetria do índice de girificação. Valores de p significativos estão marcados com *.

Nessa população de 25 indivíduos, não fomos capazes de associar alterações no planum temporale nem no hipocampo com os polimorfismos estudados aqui.

Para o presente estudo, não conseguimos realizar a análise de morfometria cerebral para indivíduos controles genotipados. Dessa forma, não podemos afirmar se as associações observadas são específicas para alterações cerebrais observadas em esquizofrênicos, ou se poderiam ser marcadores de variações morfométricas cerebrais na população em geral. Por outro lado, sabemos que alargamento ventricular é um dos achados mais robustos dentre as anormalidades estruturais observadas no cérebro de esquizofrênicos, e um Índice de Girificação aumentado no hemisfério direito cerebral é um achado de um estudo realizado com os mesmos pacientes de nosso estudo (descrito em Sallet et al., 2003). Entretanto, estudos futuros envolvendo

indivíduos normais devem ser realizados para responder a essa questão de nosso estudo.

O estudo de marcadores moleculares neuroanatômicos é um novo campo na área de genômica que tem se mostrado bastante promissor. Recentemente, uma série de estudos têm sido publicados, procurando identificar marcadores genéticos associados com as alterações cerebrais em EZ (Szeszko et al., 2003; Callicott et al., 2005; Ho et al., 2005; Papiol et al., 2005; Prasad et al., 2005), mas a disponibilidade de um número reduzido de pacientes que possuem dados de IRM ainda limita a conclusão da grande maioria destes estudos. Os achados de nosso estudo, relativos aos dados de morfometria cerebral, devem ser vistos com cautela, dado o pequeno número de amostras que pudemos avaliar para esse aspecto, e estudos futuros, com uma maior amostragem, focando os genes aqui relatados, são necessários para confirmar nossas associações. Estes achados foram reunidos em um artigo que recentemente submetemos à publicação (Gregorio et al., 2006b – anexo III).

6. CONCLUSÕES

Após a análise de 41 marcadores polimórficos mapeados em genes envolvidos com neurodesenvolvimento, uma análise individual destes marcadores sugere que:

- *NOGO*: apresenta grande variação de frequência do SNP entre indivíduos de diferentes etnias. O polimorfismo não está associado com EZ, conforme sugerido por estudos anteriores, nem com o transtorno bipolar.
- *AKT1*: Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre um SNP mapeado em *AKT1* e a EZ, porém esta associação não foi replicada após a análise de amostras Dinamarquesas, o que sugere que esse SNP não seja causal e sim marcador de um bloco haplotípico que pode conter o polimorfismo causal, mas é divergente entre as duas populações;
- *MAP1B*: Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre um SNP mapeado em *MAP1B* e a EZ, porém esta associação não foi replicada após a análise de amostras Dinamarquesas; Essa divergência de resultados pode ser explicada da mesma forma que para os achados com o SNP de *AKT1*.
- *NUMBL*: Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre um microssatélite mapeado em *NUMBL* e a EZ, e ao agregarmos amostras Dinamarquesas à análise, esta associação tornou-se ainda mais significativa, sugerindo a contribuição deste polimorfismo para o desenvolvimento da EZ;
- *FZD3*: Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre um SNP mapeado no promotor de *FZD3* e a EZ, e ao agregarmos amostras Dinamarquesas à análise, esta associação tornou-se ainda mais significativa;
- Através de ensaio de gene repórter, concluímos que o promotor de *FZD3* não é ativado pelo fator de transcrição AP-2, como anteriormente sugerido por análises em bancos de dados. Além disso, acreditamos que AP-2 possa estar interferindo na ligação de um outro fator de transcrição ao promotor, já que quando grandes quantidades de AP-2 são expressas em cultura, a atividade do promotor diminui significativamente;
- Observamos ainda que o SNP no promotor de *FZD3* acarreta uma maior atividade transcricional (aumento de 60 a 70%) para o gene, fato constatado após análise de duas linhagens celulares distintas. Aparentemente, este SNP apresenta um 'ganho de função' criando nova região promotora de *FZD3*;
- Através de análise *multilocus*, realizada através no método "*set association*" para 38 marcadores bialélicos, foi sugerida a interação de um *set* de 5 SNPs (*AKT1*, *MAP1B*, *FZD3*, *SEMA6C*, *ADAM28*) contribuindo de forma aditiva para a etiologia da esquizofrenia;

- Tanto a análise individual quanto a análise multilocus para os polimorfismos avaliados neste estudo apontam para o envolvimento das vias sinalizadoras de WNT e NOTCH na etiologia da esquizofrenia;
- Através da análise de correlação entre os polimorfismos avaliados neste estudo e os dados de morfometria cerebral, gerados através de Imagem de Ressonância Magnética, para 25 pacientes esquizofrênicos, encontramos uma correlação entre o SNP de RELN e o tamanho ventricular cerebral, e entre o SNP de PCDH12 e o coeficiente de assimetria do índice de girificação cerebral. Entretanto, esses achados devem ser vistos com cautela e considerados preliminares, dado o pequeno número de amostras disponíveis para avaliação.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dado o grande número de marcadores avaliados em um mesmo universo amostral, o presente estudo pode ser considerado um estudo exploratório gerador de hipóteses. De acordo com os achados deste estudo, estudos subsequentes podem confirmar ou refutar as associações que observamos e podem ainda aprofundar a análise de vias estudadas neste trabalho.

De acordo com a sugestão, evidenciada pelos achados das análises individuais e multilocus, de que as vias de WNT e NOTCH estariam envolvidas com a etiologia da EZ, estudos futuros, focando um maior número de genes destas vias, podem ser delineados, de forma a procurar esclarecer quantos e quais genes pertencentes a essas vias estariam contribuindo para etiologia desta doença.

De acordo com os achados indicando maior atividade para o promotor polimórfico de *FZD3* comparado ao promotor selvagem, ensaios de EMSA (do inglês: “Electrophoretic Mobility Shift Assay”) serão feitos buscando revelar se está ocorrendo uma ligação mais proeminente de algum fator de transcrição à esse promotor. Esse mesmo ensaio também pode reforçar a hipótese de que AP-2 não se liga a este promotor.

Com relação aos achados de correlação entre os polimorfismos de *RELN* e *PCDH12* e algumas variáveis morfométricas cerebrais, um estudo avaliando a morfometria cerebral de um maior número de indivíduos por IRM poderá confirmar esses achados. Este aumento do número de pacientes deverá se concretizar graças à entrada de nosso grupo, junto com outros colegas do HCFMUSP, no projeto CInAPCe com o módulo: “Multi-Modal Approach to Mechanisms of Damage, Plasticity, and Repair in Epilepsy”. Neste projeto, teremos participação ativa no subprojeto 2 (“Epilepsy, Psychiatry and Neurogenesis: Genes, Brain Imaging and Metabolism”) onde teremos acesso a diversos pacientes, para os quais dados de morfometria cerebral serão obtidos utilizando aparelho de IRM de alta resolução (3T). Deste modo, alterações nas regiões cerebrais associadas com *RELN* e *PCDH12* poderão ser confirmadas em pacientes acometidos por epilepsias e a infra-estrutura deste projeto deverá possibilitar o recrutamento de novos casos de EZ, o que permitirá o avanço de nossas análises.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aganova EA, Uranova NA. 1992. Morphometric analysis of synaptic contacts in the anterior limbic cortex in the endogenous psychoses. *Neurosci Behav Physiol* 22:59-65.
- Ahearn EP, Speer MC, Chen YT, Steffens DC, Cassidy F, Van Meter S, Provenzale JM, Weisler RH, Krishnan KR. 2002. Investigation of Notch3 as a candidate gene for bipolar disorder using brain hyperintensities as an endophenotype. *Am J Med Genet* 114:652-658.
- Akahane A, Kunugi H, Tanaka H, Nanko S. 2002. Association analysis of polymorphic CGG repeat in 5' UTR of the reelin and VLDLR genes with schizophrenia. *Schizophr Res* 58:37-41.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444-461.
- Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350-355.
- Ananth H, Popescu I, Critchley HD, Good CD, Frackowiak RS, Dolan RJ. 2002. Cortical and subcortical gray matter abnormalities in schizophrenia determined through structural magnetic resonance imaging with optimized volumetric voxel-based morphometry. *Am J Psychiatry* 159:1497-1505.
- Andreasen NC, Arndt S, Swayze V, 2nd, Cizadlo T, Flaum M, O'Leary D, Ehrhardt JC, Yuh WT. 1994. Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. *Science* 266:294-298.
- Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H. 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400:877-881.
- Arnold SE, Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. 1991. Some cytoarchitectural abnormalities of the entorhinal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 48:625-632.
- Arora RC, Meltzer HY. 1991. Serotonin₂ (5-HT₂) receptor binding in the frontal cortex of schizophrenic patients. *J Neural Transm Gen Sect* 85:19-29.
- Austin J. 2005. Schizophrenia: an update and review. *J Genet Couns* 14:329-340.
- Axelrod JD, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Perrimon N. 1996. Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science* 271:1826-1832.
- Bagri A, Cheng HJ, Yaron A, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M. 2003. Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* 113:285-299.
- Bamji SX. 2005. Cadherins: actin with the cytoskeleton to form synapses. *Neuron* 47:175-178.
- Baranano DE, Ferris CD, Snyder SH. 2001. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 24:99-106.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Bartko JJ, Carpenter WT, Jr. 1976. On the methods and theory of reliability. *J Nerv Ment Dis* 163:307-317.
- Beasley C, Cotter D, Khan N, Pollard C, Sheppard P, Varndell I, Lovestone S, Anderton B, Everall I. 2001. Glycogen synthase kinase-3 β immunoreactivity is reduced in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Neurosci Lett* 302:117-120.
- Behar O, Golden JA, Mashimo H, Schoen FJ, Fishman MC. 1996. Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 383:525-528.
- Bendani MK, Palluy O, Cook-Moreau J, Beneytout JL, Rigaud M, Vallat JM. 1995. Localization of 12-lipoxygenase mRNA in cultured oligodendrocytes and astrocytes by in situ reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Neurosci Lett* 189:159-162.
- Benes FM, Majocha R, Bird ED, Marotta CA. 1987. Increased vertical axon numbers in cingulate cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 44:1017-1021.
- Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37:766-770.
- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. 2005. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120:21-24.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.

- Bernstein HG, Bukowska A, Krell D, Bogerts B, Ansorge S, Lendeckel U. 2003. Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol* 32:153-160.
- Bernstein HG, Keilhoff G, Bukowska A, Ziegeler A, Funke S, Dobrowolny H, Kanakis D, Bogerts B, Lendeckel U. 2004. ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 12 is expressed in rat and human brain and localized to oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 75:353-360.
- Bernstein HG, Stanarius A, Baumann B, Henning H, Krell D, Danos P, Falkai P, Bogerts B. 1998. Nitric oxide synthase-containing neurons in the human hypothalamus: reduced number of immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics. *Neuroscience* 83:867-875.
- Berrettini W. 2004. Bipolar disorder and schizophrenia: convergent molecular data. *Neuromolecular Med* 5:109-117.
- Bi W, Saifi GM, Shaw CJ, Walz K, Fonseca P, Wilson M, Potocki L, Lupski JR. 2004. Mutations of RAI1, a PHD-containing protein, in nondeletion patients with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet* 115:515-524.
- Black MM, Slaughter T, Fischer I. 1994. Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 14:857-870.
- Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. 2001. Schizophrenia and affective disorders-- cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet* 69:428-433.
- Blanco P, Sargent CA, Boucher CA, Mitchell M, Affara NA. 2000. Conservation of PCDHX in mammals; expression of human X/Y genes predominantly in brain. *Mamm Genome* 11:906-914.
- Bloom FE. 1993. Advancing a neurodevelopmental origin for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 50:224-227.
- Bogerts B, Ashtari M, Degreef G, Alvir JM, Bilder RM, Lieberman JA. 1990. Reduced temporal limbic structure volumes on magnetic resonance images in first episode schizophrenia. *Psychiatry Res* 35:1-13.
- Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, Springell K, Mahadevan M, Crow YJ, Markham AF, Walsh CA, Woods CG. 2002. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet* 32:316-320.
- Bond J, Scott S, Hampshire DJ, Springell K, Corry P, Abramowicz MJ, Mochida GH, Hennekam RC, Maher ER, Fryns JP, Alswaid A, Jafri H, Rashid Y, Mubaidin A, Walsh CA, Roberts E, Woods CG. 2003. Protein-truncating mutations in ASPM cause variable reduction in brain size. *Am J Hum Genet* 73:1170-1177.
- Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D. 1997. A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* 11:2359-2370.
- Bray NJ, Owen MJ. 2001. Searching for schizophrenia genes. *Trends Mol Med* 7:169-174.
- Briggs GG, Nebes RD. 1975. Patterns of hand preference in a student population. *Cortex* 11:230-238.
- Browning MD, Dudek EM, Rapier JL, Leonard S, Freedman R. 1993. Significant reductions in synapsin but not synaptophysin specific activity in the brains of some schizophrenics. *Biol Psychiatry* 34:529-535.
- Browning MD, Haganir R, Greengard P. 1985. Protein phosphorylation and neuronal function. *J Neurochem* 45:11-23.
- Bruno A, Allegranza A. 1965. The effect of haloperidol on the urinary excretion of dopamine, homovanillic and vanilmandelic acids in schizophrenics. *Psychopharmacologia* 8:60-66.
- Brzustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, Honer WG, Bassett AS. 2000. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 288:678-682.
- Buchsbaum MS, Someya T, Teng CY, Abel L, Chin S, Najafi A, Haier RJ, Wu J, Bunney WE, Jr. 1996. PET and MRI of the thalamus in never-medicated patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 153:191-199.
- Buckland PR. 2003. Polymorphically duplicated genes: their relevance to phenotypic variation in humans. *Ann Med* 35:308-315.
- Bush MS, Goold RG, Moya F, Gordon-Weeks PR. 1996. An analysis of an axonal gradient of phosphorylated MAP 1B in cultured rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 8:235-248.

- Cadigan KM, Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286-3305.
- Callicott JH, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Verchinski BA, Meyer-Lindenberg A, Balkissoon R, Kolachana B, Goldberg TE, Weinberger DR. 2005. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8627-8632.
- Camp LA, Verkruyse LA, Afendis SJ, Slaughter CA, Hofmann SL. 1994. Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase. *J Biol Chem* 269:23212-23219.
- Cannon M, Walsh E, Hollis C, Kargin M, Taylor E, Murray RM, Jones PB. 2001. Predictors of later schizophrenia and affective psychosis among attendees at a child psychiatry department. *Br J Psychiatry* 178:420-426.
- Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. 1998. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry* 55:67-74.
- Cannon TD, van Erp TG, Glahn DC. 2002. Elucidating continuities and discontinuities between schizotypy and schizophrenia in the nervous system. *Schizophr Res* 54:151-156.
- Cardno AG, Gottesman, II. 2000. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* 97:12-17.
- Cardno AG, Rijdsdijk FV, Sham PC, Murray RM, McGuffin P. 2002. A twin study of genetic relationships between psychotic symptoms. *Am J Psychiatry* 159:539-545.
- Cardon LR, Bell JI. 2001. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2:91-99.
- Carlson RJ. 1988. Choreoathetosis associated with thioridazine: three case reports and literature review. *Psychiatr Med* 6:52-58.
- Carmine A, Chheda MG, Jonsson EG, Sedvall GC, Farde L, Gustavsson JP, Bergman H, Anvret M, Buervenich S, Olson L. 2003. Two NOTCH4 polymorphisms and their relation to schizophrenia susceptibility and different personality traits. *Psychiatr Genet* 13:23-28.
- Carnac G, Kodjabachian L, Gurdon JB, Lemaire P. 1996. The homeobox gene Siamois is a target of the Wnt dorsalisation pathway and triggers organiser activity in the absence of mesoderm. *Development* 122:3055-3065.
- Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas E. 2003. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12747-12752.
- Catalano SM, Messersmith EK, Goodman CS, Shatz CJ, Chedotal A. 1998. Many major CNS axon projections develop normally in the absence of semaphorin III. *Mol Cell Neurosci* 11:173-182.
- Cayouette M, Raff M. 2002. Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from Drosophila to mammals. *Nat Neurosci* 5:1265-1269.
- Chakravarti A, Little P. 2003. Nature, nurture and human disease. *Nature* 421:412-414.
- Chasman D, Adams RM. 2001. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. *J Mol Biol* 307:683-706.
- Check E. 2005. Human genome: patchwork people. *Nature* 437:1084-1086.
- Chen JJ, Duan T, Single R, Mather K, Thomson G. 2005. Hardy-Weinberg testing of a single homozygous genotype. *Genetics* 170:1439-1442.
- Chen ML, Chen SY, Huang CH, Chen CH. 2002. Identification of a single nucleotide polymorphism at the 5' promoter region of human reelin gene and association study with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:447-448.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403:434-439.
- Chen X, Dunham C, Kendler S, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. 2004. Regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) gene is associated with schizophrenia in Irish high density families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129:23-26.
- Cheng H, Ma Y, Ni X, Jiang M, Guo L, Jin W, Xu W, Cao G, Ji C, Yin K, Gu S, Ma Y, Xie Y, Mao Y. 2002. cDNA cloning and expression analysis of a novel human F-box only protein. *Mol Cells* 14:56-59.

- Cheng HJ, Bagri A, Yaron A, Stein E, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M. 2001. Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 32:249-263.
- Chertoff R, Soussan L, Roder H, Michaelson DM. 1995. Phosphorylation and dephosphorylation of distinct isoforms of the heavy neurofilament protein NF-H. *Cell Mol Neurobiol* 15:269-281.
- Chowdari KV, Mirnics K, Semwal P, Wood J, Lawrence E, Bhatia T, Deshpande SN, B KT, Ferrell RE, Middleton FA, Devlin B, Levitt P, Lewis DA, Nimgaonkar VL. 2002. Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 11:1373-1380.
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macchiardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D. 2002. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13675-13680.
- Cloutier JF, Giger RJ, Koentges G, Dulac C, Kolodkin AL, Ginty DD. 2002. Neuropilin-2 mediates axonal fasciculation, zonal segregation, but not axonal convergence, of primary accessory olfactory neurons. *Neuron* 33:877-892.
- Cotter D, Kerwin R, al-Sarraj S, Brion JP, Chadwich A, Lovestone S, Anderton B, Everall I. 1998. Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia--evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport* 9:1379-1383.
- Covault J, Lee J, Jensen K, Kranzler H. 2004. Nogo 3'-untranslated region CAA insertion: failure to replicate association with schizophrenia and demonstration of marked population difference in frequency of the insertion. *Brain Res Mol Brain Res* 120:197-200.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH. 1976. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192:481-483.
- Crocker AC, Farber S. 1958. Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine (Baltimore)* 37:1-95.
- Crow TJ. 2000. Schizophrenia as the price that homo sapiens pays for language: a resolution of the central paradox in the origin of the species. *Brain Res Brain Res Rev* 31:118-129.
- Crow TJ. 2002. Handedness, language lateralisation and anatomical asymmetry: relevance of protocadherin XY to hominid speciation and the aetiology of psychosis. Point of view. *Br J Psychiatry* 181:295-297.
- Csernansky JG, Joshi S, Wang L, Haller JW, Gado M, Miller JP, Grenander U, Miller MI. 1998. Hippocampal morphometry in schizophrenia by high dimensional brain mapping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11406-11411.
- Cummings CJ, Zoghbi HY. 2000. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:281-328.
- Daniel DG, Goldberg TE, Gibbons RD, Weinberger DR. 1991. Lack of a bimodal distribution of ventricular size in schizophrenia: a Gaussian mixture analysis of 1056 cases and controls. *Biol Psychiatry* 30:887-903.
- Danos P, Baumann B, Bernstein HG, Franz M, Stauch R, Northoff G, Krell D, Falkai P, Bogerts B. 1998. Schizophrenia and anteroventral thalamic nucleus: selective decrease of parvalbumin-immunoreactive thalamocortical projection neurons. *Psychiatry Res* 82:1-10.
- De Bellard ME, Ching W, Gossler A, Bronner-Fraser M. 2002. Disruption of segmental neural crest migration and ephrin expression in delta-1 null mice. *Dev Biol* 249:121-130.
- De Gobbi M, Viprakasit V, Hughes JR, Fisher C, Buckle VJ, Ayyub H, Gibbons RJ, Vernimmen D, Yoshinaga Y, de Jong P, Cheng JF, Rubin EM, Wood WG, Bowden D, Higgs DR. 2006. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science* 312:1215-1217.

- de Quervain DJ, Poirier R, Wollmer MA, Grimaldi LM, Tsolaki M, Streffer JR, Hock C, Nitsch RM, Mohajeri MH, Papassotiropoulos A. 2004. Glucocorticoid-related genetic susceptibility for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 13:47-52.
- De Strooper B, Annaert W. 2001. Where Notch and Wnt signaling meet. The presenilin hub. *J Cell Biol* 152:F17-20.
- DeLisi LE, Shaw SH, Crow TJ, Shields G, Smith AB, Larach VW, Wellman N, Loftus J, Nanthakumar B, Razi K, Stewart J, Comazzi M, Vita A, Heffner T, Sherrington R. 2002. A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 159:803-812.
- Devon RS, Anderson S, Teague PW, Burgess P, Kipari TM, Semple CA, Millar JK, Muir WJ, Murray V, Pelosi AJ, Blackwood DH, Porteous DJ. 2001. Identification of polymorphisms within Disrupted in Schizophrenia 1 and Disrupted in Schizophrenia 2, and an investigation of their association with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Psychiatr Genet* 11:71-78.
- Duan S, Yin H, Chen W, Xing Q, chen Q, Guo T, Gao J, Li X, Gao R, Liu Z, Gu N, Feng G, He L. 2005. No association between the serotonin 1B receptor gene and schizophrenia in a case-control and family-based association study. *Neurosci Lett* 376:93-97.
- Eastwood SL, Burnet PW, Harrison PJ. 1995. Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 66:309-319.
- Eastwood SL, Harrison PJ. 1995. Decreased synaptophysin in the medial temporal lobe in schizophrenia demonstrated using immunohistochemistry. *Neuroscience* 69:339-343.
- Eastwood SL, Harrison PJ. 2003. Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. *Mol Psychiatry* 8:769, 821-731.
- Eastwood SL, Law AJ, Everall IP, Harrison PJ. 2003. The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Mol Psychiatry* 8:148-155.
- Edelmann W, Zervas M, Costello P, Roback L, Fischer I, Hammarback JA, Cowan N, Davies P, Wainer B, Kucherlapati R. 1996. Neuronal abnormalities in microtubule-associated protein 1B mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1270-1275.
- Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR. 2001. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6917-6922.
- Eickholt BJ, Walsh FS, Doherty P. 2002. An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J Cell Biol* 157:211-217.
- Ekelund J, Hennah W, Hiekkalinna T, Parker A, Meyer J, Lonnqvist J, Peltonen L. 2004. Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees. *Mol Psychiatry* 9:1037-1041.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA. 2004. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 36:131-137.
- Espinosa L, Ingles-Esteve J, Aguilera C, Bigas A. 2003. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem* 278:32227-32235.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269.
- Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, Hirayama T, Sasaki A, Hirabayashi T, Koide T, Kitsukawa T, Hamada S, Yagi T. 2005. Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the protocadherin-alpha gene cluster in single neurons. *Nat Genet* 37:171-176.
- Evans PD, Anderson JR, Vallender EJ, Choi SS, Lahn BT. 2004. Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size. *Hum Mol Genet* 13:1139-1145.
- Everett OM, Wood NW. 2004. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 127:2385-2405.
- Faisst S, Meyer S. 1992. Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res* 20:3-26.
- Falkai P, Bogerts B. 1986. Cell loss in the hippocampus of schizophrenics. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 236:154-161.

- Fan JB, Tang JX, Gu NF, Feng GY, Zou FG, Xing YL, Shi JG, Zhao SM, Zhu SM, Ji LP, Sun WW, Zheng YL, Liu WQ, Breen G, St Clair D, He L. 2002. A family-based and case-control association study of the NOTCH4 gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:100-103.
- Fan R, Knapp M. 2003. Genome association studies of complex diseases by case-control designs. *Am J Hum Genet* 72:850-868.
- Fatemi SH. 2001. Reelin mutations in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly. *Mol Psychiatry* 6:129-133.
- Fatemi SH, Earle JA, McMenomy T. 2000. Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol Psychiatry* 5:654-663, 571.
- Fatemi SH, Kroll JL, Strydom JM. 2001a. Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport* 12:3209-3215.
- Fatemi SH, Strydom JM, Halt AR, Realmuto GR. 2001b. Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *J Autism Dev Disord* 31:529-535.
- Feiner L, Webber AL, Brown CB, Lu MM, Jia L, Feinstein P, Mombaerts P, Epstein JA, Raper JA. 2001. Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption. *Development* 128:3061-3070.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. 1996. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-P)* New York State Psychiatric Institute Biometrics Research.
- Flores AI, Mallon BS, Matsui T, Ogawa W, Rosenzweig A, Okamoto T, Macklin WB. 2000. Akt-mediated survival of oligodendrocytes induced by neuregulins. *J Neurosci* 20:7622-7630.
- Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA. 1998. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21:1315-1325.
- Frankle WG, Lerma J, Laruelle M. 2003. The synaptic hypothesis of schizophrenia. *Neuron* 39:205-216.
- Franklin A, Kao A, Tapscott S, Unis A. 2001. NeuroD homologue expression during cortical development in the human brain. *J Child Neurol* 16:849-853.
- Freedman R, Leonard S, Olincy A, Kaufmann CA, Malaspina D, Cloninger CR, Svrtak D, Faraone SV, Tsuang MT. 2001. Evidence for the multigenic inheritance of schizophrenia. *Am J Med Genet* 105:794-800.
- Fridman C, Ojopi EP, Gregorio SP, Ikenaga EH, Moreno DH, Demetrio FN, Guimaraes PE, Vallada HP, Gattaz WF, Dias Neto E. 2003. Association of a new polymorphism in ALOX12 gene with bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 253:40-43.
- Galderisi S, Vita A, Rossi A, Stratta P, Leonardi M, Maj M, Invernizzi G. 2000. Qualitative MRI findings in patients with schizophrenia: a controlled study. *Psychiatry Res* 98:117-126.
- Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR. 1998. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:446-453.
- Gaser C, Volz HP, Kiebel S, Riehemann S, Sauer H. 1999. Detecting structural changes in whole brain based on nonlinear deformations-application to schizophrenia research. *Neuroimage* 10:107-113.
- Giouze M, Williams NA, Lonie LJ, DeLisi LE, Crow TJ. 2004. ProtocadherinX/Y, a candidate gene-pair for schizophrenia and schizoaffective disorder: a DHPLC investigation of genomic sequence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129:1-9.
- Girirajan S, Elsas LJ, 2nd, Devriendt K, Elsea SH. 2005. RAI1 variations in Smith-Magenis syndrome patients without 17p11.2 deletions. *J Med Genet* 42:820-828.
- Glatt CE, Freimer NB. 2002. Association analysis of candidate genes for neuropsychiatric disease: the perpetual campaign. *Trends Genet* 18:307-312.
- Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT. 2003. Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies. *Am J Psychiatry* 160:469-476.
- Godenschwege TA, Hu H, Shan-Crofts X, Goodman CS, Murphey RK. 2002. Bi-directional signaling by Semaphorin 1a during central synapse formation in Drosophila. *Nat Neurosci* 5:1294-1301.

- Goff DC, Coyle JT. 2001. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158:1367-1377.
- Gogos JA, Santha M, Takacs Z, Beck KD, Luine V, Lucas LR, Nadler JV, Karayiorgou M. 1999. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nat Genet* 21:434-439.
- Goldberger C, Gourion D, Leroy S, Schurhoff F, Bourdel MC, Leboyer M, Krebs MO. 2005. Population-based and family-based association study of 5'UTR polymorphism of the reelin gene and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 137:51-55.
- Goldsmith SK, Joyce JN. 1995. Alterations in hippocampal mossy fiber pathway in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 37:122-126.
- Gonzalez-Billault C, Demandt E, Wandosell F, Torres M, Bonaldo P, Stoykova A, Chowdhury K, Gruss P, Avila J, Sanchez MP. 2000. Perinatal lethality of microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol Cell Neurosci* 16:408-421.
- Goold RG, Gordon-Weeks PR. 2003. NGF activates the phosphorylation of MAP1B by GSK3beta through the TrkA receptor and not the p75(NTR) receptor. *J Neurochem* 87:935-946.
- Goold RG, Owen R, Gordon-Weeks PR. 1999. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3373-3384.
- Gordon-Weeks PR, Fischer I. 2000. MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc Res Tech* 48:63-74.
- Gottesman, II, Bertelsen A. 1989. Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Risks in the offspring of Fischer's Danish identical and fraternal discordant twins. *Arch Gen Psychiatry* 46:867-872.
- Gottesman I. 1991. *Schizophrenia genesis: The origins of madness*. New York: W-H Freeman.
- Graeff FG. 1997. Serotonergic systems. *Psychiatr Clin North Am* 20:723-739.
- Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, Costa E. 2005. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9341-9346.
- Gregorio SP, Mury FB, Ojopi EB, Sallet PC, Moreno DH, Yacubian J, Tavares H, Santos FR, Gattaz WF, Dias-Neto E. 2005. Nogo CAA 3'UTR Insertion polymorphism is not associated with Schizophrenia nor with bipolar disorder. *Schizophr Res* 75:5-9.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34.
- Gu Q, Wang D, Wang X, Peng R, Liu J, Jiang T, Wang Z, Wang S, Deng H. 2004. Basic fibroblast growth factor inhibits radiation-induced apoptosis of HUVECs. I. The PI3K/AKT pathway and induction of phosphorylation of BAD. *Radiat Res* 161:692-702.
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. 2000. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 57:1061-1069.
- Gupta P, Soyombo AA, Atashband A, Wisniewski KE, Shelton JM, Richardson JA, Hammer RE, Hofmann SL. 2001. Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13566-13571.
- Gur RE, Cowell PE, Latshaw A, Turetsky BI, Grossman RI, Arnold SE, Bilker WB, Gur RC. 2000. Reduced dorsal and orbital prefrontal gray matter volumes in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:761-768.
- Gurling HM, Kalsi G, Brynjolfsson J, Sigmundsson T, Sherrington R, Mankoo BS, Read T, Murphy P, Blaveri E, McQuillin A, Petursson H, Curtis D. 2001. 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* 68:661-673.
- Gyorffy B, Gyorffy A, Tulassay Z. 2005. [The problem of multiple testing and solutions for genome-wide studies]. *Orv Hetil* 146:559-563.
- Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. 2003. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 19:376-382.
- Hall AC, Lucas FR, Salinas PC. 2000. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525-535.

- Hall D, Gogos JA, Karayiorgou M. 2004. The contribution of three strong candidate schizophrenia susceptibility genes in demographically distinct populations. *Genes Brain Behav* 3:240-248.
- Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y. 1999. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* 126:3415-3424.
- Hardy GH. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Yale J Biol Med* 76:79-80.
- Harris JM, Whalley H, Yates S, Miller P, Johnstone EC, Lawrie SM. 2004. Abnormal cortical folding in high-risk individuals: a predictor of the development of schizophrenia? *Biol Psychiatry* 56:182-189.
- Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4):593-624.
- Harrison PJ, Weinberger DR. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40-68; image 45.
- Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lubke T, Lena Illert A, von Figura K, Saftig P. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11:2615-2624.
- Hashimoto R, Suzuki T, Iwata N, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kosuga A, Tatsumi M, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H. 2005. Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm* 112:303-307.
- Hawi Z, Straub RE, O'Neill A, Kendler KS, Walsh D, Gill M. 1998. No linkage or linkage disequilibrium between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) dinucleotide repeat polymorphism and schizophrenia in Irish families. *Psychiatry Res* 81:111-116.
- Heidema GA, Boer JM, Nagelkerke N, Mariman EC, van der AD, Feskens EJ. 2006. The challenge for genetic epidemiologists: how to analyze large numbers of SNPs in relation to complex diseases. *BMC Genet* 7:23.
- Hemmings HC, Jr., Nairn AC, McGuinness TL, Haganir RL, Greengard P. 1989. Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction. *Faseb J* 3:1583-1592.
- Hennah W, Varilo T, Kestila M, Paunio T, Arajärvi R, Haukka J, Parker A, Martin R, Levitzky S, Partonen T, Meyer J, Lonnqvist J, Peltonen L, Ekelund J. 2003. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum Mol Genet* 12:3151-3159.
- Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Fried C, Tanzer A, Flamm C, Hofacker IL, Stadler PF. 2006. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. *BMC Genomics* 7:25.
- Higuchi M, Kiyama H, Hayakawa T, Hamada Y, Tsujimoto Y. 1995. Differential expression of Notch1 and Notch2 in developing and adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 29:263-272.
- Hiltschmann N, Barnikol HU, Barnikol-Watanabe S, Gotz H, Kratzin H, Thinnies FP. 2001. The immunoglobulin-like genetic predetermination of the brain: the protocadherins, blueprint of the neuronal network. *Naturwissenschaften* 88:2-12.
- Hirayasu Y, Tanaka S, Shenton ME, Salisbury DF, DeSantis MA, Levitt JJ, Wible C, Yurgelun-Todd D, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW. 2001. Prefrontal gray matter volume reduction in first episode schizophrenia. *Cereb Cortex* 11:374-381.
- Ho BC, Wassink TH, O'Leary DS, Sheffield VC, Andreasen NC. 2005. Catechol-O-methyl transferase Val158Met gene polymorphism in schizophrenia: working memory, frontal lobe MRI morphology and frontal cerebral blood flow. *Mol Psychiatry* 10:229, 287-298.
- Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, Malhotra AK. 2004. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 75:862-872.
- Hoh J, Wille A, Ott J. 2001. Trimming, weighting, and grouping SNPs in human case-control association studies. *Genome Res* 11:2115-2119.
- Holder JL, Jr., Butte NF, Zinn AR. 2000. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 9:101-108.
- Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, Callahan C, Hwang HS, Ingersoll-Ashworth RG, Fleisher A, Stevanin G, Brice A, Potter NT, Ross CA, Margolis RL. 2001. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet* 29:377-378.

- Honer WG, Bassett AS, Smith GN, Lapointe JS, Falkai P. 1994. Temporal lobe abnormalities in multigenerational families with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 36:737-743.
- Hong CJ, Huo SJ, Liao DL, Lee K, Wu JY, Tsai SJ. 2004. Case-control and family-based association studies between the neuregulin 1 (Arg38Gln) polymorphism and schizophrenia. *Neurosci Lett* 366:158-161.
- Hong CJ, Yu YW, Lin CH, Tsai SJ. 2003. An association study of a brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and clozapine response of schizophrenic patients. *Neurosci Lett* 349:206-208.
- Horton S, Meredith A, Richardson JA, Johnson JE. 1999. Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol Cell Neurosci* 14:355-369.
- Hrabe de Angelis M, McIntyre J, 2nd, Gossler A. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1. *Nature* 386:717-721.
- Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J. 1999. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398:431-436.
- Huang YZ, Won S, Ali DW, Wang Q, Tanowitz M, Du QS, Pelkey KA, Yang DJ, Xiong WC, Salter MW, Mei L. 2000. Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron* 26:443-455.
- Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME. 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 22:3553-3567.
- Huelsken J, Behrens J. 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115:3977-3978.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-838.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949-951.
- Ide M, Muratake T, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Iwamoto K, Takao H, Toyota T, Kaneko N, Minabe Y, Nakamura K, Kato T, Mori N, Asada T, Someya T, Yoshikawa T. 2004. Genetic and expression analyses of FZD3 in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 56:462-465.
- Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N. 2004. Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population. *Biol Psychiatry* 56:698-700.
- Ikeuchi T, Sisodia SS. 2003. The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage. *J Biol Chem* 278:7751-7754.
- Imai Y, Suzuki Y, Matsui T, Tohyama M, Wanaka A, Takagi T. 1995. Cloning of a retinoic acid-induced gene, GT1, in the embryonal carcinoma cell line P19: neuron-specific expression in the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 31:1-9.
- Ismail B, Cantor-Graae E, McNeil TF. 2000. Minor physical anomalies in schizophrenia: cognitive, neurological and other clinical correlates. *J Psychiatr Res* 34:45-56.
- Ito H, Nakajima A, Nomoto H, Furukawa S. 2003. Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1. *J Neurosci Res* 71:648-658.
- Iwata N, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Ozaki N. 2004. No association with the neuregulin 1 haplotype to Japanese schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9:126-127.
- Jacquet H, Raux G, Thibaut F, Hecksweiler B, Houy E, Demilly C, Haouzir S, Allio G, Fouldrin G, Drouin V, Bou J, Petit M, Campion D, Frebourg T. 2002. PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet* 11:2243-2249.
- Jakob H, Beckmann H. 1986. Prenatal developmental disturbances in the limbic allocortex in schizophrenics. *J Neural Transm* 65:303-326.
- Jeste DV, Lohr JB. 1989. Hippocampal pathologic findings in schizophrenia. A morphometric study. *Arch Gen Psychiatry* 46:1019-1024.
- Johnson JM. 1990. Is schizophrenia genetically transmitted? *J Am Osteopath Assoc* 90:346-351.
- Joober R, Benkelfat C, Toulouse A, Lafreniere RG, Lal S, Ajroud S, Turecki G, Bloom D, Labelle A, Lalonde P, Alda M, Morgan K, Palmour R, Rouleau GA. 1999. Analysis of 14 CAG repeat-containing genes in schizophrenia. *Am J Med Genet* 88:694-699.

- Jou RJ, Hardan AY, Keshavan MS. 2005. Reduced cortical folding in individuals at high risk for schizophrenia: a pilot study. *Schizophr Res* 75:309-313.
- Julien JP, Mushynski WE. 1998. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61:1-23.
- Kandel ER. 1991. *Principles of Neural Science*. New York: Elsevier.
- Kaneko N, Muratake T, Amagane H, Sakurai M, Tanaka T, Tsuji S, Someya T. 2004. Transmission disequilibrium test and haplotype analysis of the NOTCH4 gene in Japanese patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 58:199-205.
- Kasai K, Iwanami A, Yamasue H, Kuroki N, Nakagome K, Fukuda M. 2002. Neuroanatomy and neurophysiology in schizophrenia. *Neurosci Res* 43:93-110.
- Katsu T, Ujiike H, Nakano T, Tanaka Y, Nomura A, Nakata K, Takaki M, Sakai A, Uchida N, Imamura T, Kuroda S. 2003. The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett* 353:53-56.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. 1987. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 13:261-276.
- Kegeles LS, Humaran TJ, Mann JJ. 1998. In vivo neurochemistry of the brain in schizophrenia as revealed by magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry* 44:382-398.
- Kendler KS, McGuire M, Gruenberg AM, Walsh D. 1994. An epidemiologic, clinical, and family study of simple schizophrenia in County Roscommon, Ireland. *Am J Psychiatry* 151:27-34.
- Khlat M, Cazes MH, Genin E, Guiguet M. 2004. Robustness of case-control studies of genetic factors to population stratification: magnitude of bias and type I error. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1660-1664.
- Kiernan AE, Ahituv N, Fuchs H, Balling R, Avraham KB, Steel KP, Hrabe de Angelis M. 2001. The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3873-3878.
- Kim S, Zhang K, Sun F. 2003. Detecting susceptibility genes in case-control studies using set association. *BMC Genet* 4 Suppl 1:S9.
- Kim SK, Hebrok M. 2001. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 15:111-127.
- Kirikoshi H, Koike J, Sagara N, Saitoh T, Tokuhara M, Tanaka K, Sekihara H, Hirai M, Katoh M. 2000. Molecular cloning and genomic structure of human frizzled-3 at chromosome 8p21. *Biochem Biophys Res Commun* 271:8-14.
- Kirov G, Ivanov D, Williams NM, Preece A, Nikolov I, Milev R, Koleva S, Dimitrova A, Toncheva D, O'Donovan MC, Owen MJ. 2004. Strong evidence for association between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia in 488 parent-offspring trios from Bulgaria. *Biol Psychiatry* 55:971-975.
- Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995-1005.
- Kockelkorn TT, Arai M, Matsumoto H, Fukuda N, Yamada K, Minabe Y, Toyota T, Ujiike H, Sora I, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. 2004. Association study of polymorphisms in the 5' upstream region of human DISC1 gene with schizophrenia. *Neurosci Lett* 368:41-45.
- Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, Kai N, Yasuda R, Watanabe M, Ishii H, Yasuda M, Mishina M, Yagi T. 1998. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 20:1137-1151.
- Kohn Y, Ebstein RP, Heresco-Levy U, Shapira B, Nemanov L, Gritsenko I, Avnon M, Lerer B. 1997. Dopamine D4 receptor gene polymorphisms: relation to ethnicity, no association with schizophrenia and response to clozapine in Israeli subjects. *Eur Neuropsychopharmacol* 7:39-43.
- Kohn Y, Lerer B. 2002. Genetics of schizophrenia: a review of linkage findings. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 39:340-351.
- Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75:1389-1399.
- Kopan R, Turner DL. 1996. The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr Opin Neurobiol* 6:594-601.

- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275:1784-1787.
- Korostishevsky M, Kaganovich M, Cholostoy A, Ashkenazi M, Ratner Y, Dahary D, Bernstein J, Bening-Abu-Shach U, Ben-Asher E, Lancet D, Ritsner M, Navon R. 2004. Is the G72/G30 locus associated with schizophrenia? single nucleotide polymorphisms, haplotypes, and gene expression analysis. *Biol Psychiatry* 56:169-176.
- Kouprina N, Pavlicek A, Mochida GH, Solomon G, Gersch W, Yoon YH, Collura R, Ruvolo M, Barrett JC, Woods CG, Walsh CA, Jurka J, Larionov V. 2004. Accelerated evolution of the ASPM gene controlling brain size begins prior to human brain expansion. *PLoS Biol* 2:E126.
- Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. 2002. GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:13-25.
- Krebs MO, Guillin O, Bourdell MC, Schwartz JC, Olie JP, Poirier MF, Sokoloff P. 2000. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants association with age at onset and therapeutic response in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 5:558-562.
- Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna* 9:1274-1281.
- Krimer LS, Hyde TM, Herman MM, Saunders RC. 1997. The entorhinal cortex: an examination of cyto- and myeloarchitectonic organization in humans. *Cereb Cortex* 7:722-731.
- Kringlen E, Cramer G. 1989. Offspring of monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 46:873-877.
- Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. 2000. The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16:279-283.
- Kunkel TA. 1985a. The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. *J Biol Chem* 260:5787-5796.
- Kunkel TA. 1985b. The mutational specificity of DNA polymerases-alpha and -gamma during in vitro DNA synthesis. *J Biol Chem* 260:12866-12874.
- Lagas PA, Juvonen V. 2001. Schizophrenia in a patient with cerebral autosomally dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL disease). *Nord J Psychiatry* 55:41-42.
- Laitinen J, Samarut J, Holtta E. 1994. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques* 17:316, 318, 320-312.
- Law AJ, Deakin JF. 2001. Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *Neuroreport* 12:2971-2974.
- Lawrie SM, Abukmeil SS. 1998. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 172:110-120.
- Lawrie SM, Whalley HC, Abukmeil SS, Kestelman JN, Donnelly L, Miller P, Best JJ, Owens DG, Johnstone EC. 2001. Brain structure, genetic liability, and psychotic symptoms in subjects at high risk of developing schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49:811-823.
- Leal SM. 2005. Detection of genotyping errors and pseudo-SNPs via deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. *Genet Epidemiol* 29:204-214.
- Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP. 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127:457-467.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23:4051-4060.
- Lehtovirta M, Kytälä A, Eskelinen EL, Hess M, Heinonen O, Jalanko A. 2001. Palmitoyl protein thioesterase (PPT) localizes into synaptosomes and synaptic vesicles in neurons: implications for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL). *Hum Mol Genet* 10:69-75.
- Leighton PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, Lu X, Pinson K, Scherz P, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 2001. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 410:174-179.
- Lerer B, Segman RH, Hamdan A, Kanyas K, Karni O, Kohn Y, Korner M, Lanktree M, Kaadan M, Turetsky N, Yakir A, Kerem B, Macciardi F. 2003. Genome scan of Arab Israeli families

- maps a schizophrenia susceptibility gene to chromosome 6q23 and supports a locus at chromosome 10q24. *Mol Psychiatry* 8:488-498.
- Levrán O, Desnick RJ, Schuchman EH. 1993a. Identification of a 3' acceptor splice site mutation (g2610c) in the acid sphingomyelinase gene of patients with Niemann-Pick disease. *Hum Mol Genet* 2:205-206.
- Levrán O, Desnick RJ, Schuchman EH. 1993b. Type A Niemann-Pick disease: a frameshift mutation in the acid sphingomyelinase gene (fsP330) occurs in Ashkenazi Jewish patients. *Hum Mutat* 2:317-319.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
- Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lonnqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoega T, Helgason T. 2003. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 73:34-48.
- Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. 2000. Intrinsic excitatory connections in the prefrontal cortex and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Bull* 52:309-317.
- Li T, Ma X, Sham PC, Sun X, Hu X, Wang Q, Meng H, Deng W, Liu X, Murray RM, Collier DA. 2004. Evidence for association between novel polymorphisms in the PRODH gene and schizophrenia in a Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129:13-15.
- Li Y, Tennekoon GI, Birnbaum M, Marchionni MA, Rutkowski JL. 2001. Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol Cell Neurosci* 17:761-767.
- Lieberman AP, Fischbeck KH. 2000. Triplet repeat expansion in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 23:843-850.
- Lin R, Canfield V, Levenson R. 2002. Dominant negative mutants of filamin A block cell surface expression of the D2 dopamine receptor. *Pharmacology* 66:173-181.
- Lin R, Karpa K, Kabbani N, Goldman-Rakic P, Levenson R. 2001. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5258-5263.
- Lindblad K, Schalling M. 1999. Expanded repeat sequences and disease. *Semin Neurol* 19:289-299.
- Liu H, Heath SC, Sobin C, Roos JL, Galke BL, Blundell ML, Lenane M, Robertson B, Wijsman EM, Rapoport JL, Gogos JA, Karayiorgou M. 2002. Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3717-3722.
- Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Knijnik D, Teruchkin B, Ghisolfi E, Henriques A. 2001. Neurodevelopmental risk factors in schizophrenia. *Braz J Med Biol Res* 34:155-163.
- Lundell MJ, Lee HK, Perez E, Chadwell L. 2003. The regulation of apoptosis by Numb/Notch signaling in the serotonin lineage of Drosophila. *Development* 130:4109-4121.
- Luo Y, Raible D, Raper JA. 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75:217-227.
- Maitland-van der Zee AH, Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Klungel OH, Boerwinkle E. 2005. A multilocus approach to the antihypertensive pharmacogenetics of hydrochlorothiazide. *Pharmacogenet Genomics* 15:287-293.
- Mansfield SG, Diaz-Nido J, Gordon-Weeks PR, Avila J. 1991. The distribution and phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP 1B in growth cones. *J Neurocytol* 20:1007-1022.
- Margolis RL, Abraham MR, Gatchell SB, Li SH, Kidwai AS, Breschel TS, Stine OC, Callahan C, McInnis MG, Ross CA. 1997. cDNAs with long CAG trinucleotide repeats from human brain. *Hum Genet* 100:114-122.
- Margolis RL, Chuang DM, Post RM. 1994. Programmed cell death: implications for neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 35:946-956.

- Matthes DJ, Sink H, Kolodkin AL, Goodman CS. 1995. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. *Cell* 81:631-639.
- McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer IA, Shenton ME. 1999. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:1099-1119.
- McGill MA, McGlade CJ. 2003. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278:23196-23203.
- McGrath JJ, Feron FP, Burne TH, Mackay-Sim A, Eyles DW. 2003. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: a review of recent developments. *Ann Med* 35:86-93.
- McGrath JJ, Pemberton MR, Welham JL, Murray RM. 1994. Schizophrenia and the influenza epidemics of 1954, 1957 and 1959: a southern hemisphere study. *Schizophr Res* 14:1-8.
- McGue M, Gottesman, II. 1989. A single dominant gene still cannot account for the transmission of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 46:478-480.
- McGuffin P, Farmer A, Harvey I. 1991. A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Arch Gen Psychiatry* 48:764-770.
- McGuffin P, Tandon K, Corsico A. 2003. Linkage and association studies of schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep* 5:121-127.
- McInnis MG, McMahon FJ, Crow T, Ross CA, DeLisi LE. 1999. Anticipation in schizophrenia: a review and reconsideration. *Am J Med Genet* 88:686-693.
- McMahon AP, Bradley A. 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62:1073-1085.
- Meister G, Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349.
- Meixner A, Haverkamp S, Wassele H, Fuhrer S, Thalhammer J, Kropf N, Bittner RE, Lassmann H, Wiche G, Probst F. 2000. MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151:1169-1178.
- Meltzer HY. 1995. Role of serotonin in the action of atypical antipsychotic drugs. *Clin Neurosci* 3:64-75.
- Merikangas KR, Risch N. 2003. Will the genomics revolution revolutionize psychiatry? *Am J Psychiatry* 160:625-635.
- Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Levy E, Mitchell GA, Himms-Hagen J, Fan CM. 2001. Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 10:1465-1473.
- Mie M, Endoh T, Yanagida Y, Kobatake E, Aizawa M. 2003. Induction of neural differentiation by electrically stimulated gene expression of NeuroD2. *J Biotechnol* 100:231-238.
- Mihara K, Suzuki A, Kondo T, Nagashima U, Ono S, Otani K, Kaneko S. 2000. No relationship between Taq1 a polymorphism of dopamine D(2) receptor gene and extrapyramidal adverse effects of selective dopamine D(2) antagonists, bromperidol, and nemonapride in schizophrenia: a preliminary study. *Am J Med Genet* 96:422-424.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9:1415-1423.
- Miller JR. 2002. The Wnts. *Genome Biol* 3:REVIEWS3001.
- Mimmack ML, Ryan M, Baba H, Navarro-Ruiz J, Iritani S, Faull RL, McKenna PJ, Jones PB, Arai H, Starkey M, Emson PC, Bahn S. 2002. Gene expression analysis in schizophrenia: reproducible up-regulation of several members of the apolipoprotein L family located in a high-susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4680-4685.
- Mirnics K, Middleton FA, Lewis DA, Levitt P. 2001. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci* 24:479-486.
- Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M, Horvitz HR. 2004. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5:R68.
- Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW, Tjian R. 1991. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5:105-119.

- Miyaoka T, Seno H, Ishino H. 1999. Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr Res* 38:1-6.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787-1790.
- Morris DW, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP. 2003. No evidence for association of the dysbindin gene [DTNBP1] with schizophrenia in an Irish population-based study. *Schizophr Res* 60:167-172.
- Morris DW, Rodgers A, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP. 2004. Confirming RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 125:50-53.
- Mowry BJ, Nancarrow DJ. 2001. Molecular genetics of schizophrenia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:66-69.
- Murphy PR, Knee RS. 1994. Identification and characterization of an antisense RNA transcript (gfg) from the human basic fibroblast growth factor gene. *Mol Endocrinol* 8:852-859.
- Murray RM. 1994. Neurodevelopmental schizophrenia: the rediscovery of dementia praecox. *Br J Psychiatry Suppl* 6:1-12.
- Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan HJ. 1998. Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Arch Gen Psychiatry* 55:433-440.
- Ng PC, Henikoff S. 2003. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31:3812-3814.
- Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F. 2001. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401-413.
- Noga JT, Bartley AJ, Jones DW, Torrey EF, Weinberger DR. 1996. Cortical gyral anatomy and gross brain dimensions in monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Schizophr Res* 22:27-40.
- Noonan JP, Li J, Nguyen L, Caoile C, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J, Feldman MW, Myers RM. 2003. Extensive linkage disequilibrium, a common 16.7-kilobase deletion, and evidence of balancing selection in the human protocadherin alpha cluster. *Am J Hum Genet* 72:621-635.
- Novak G, Kim D, Seeman P, Tallerico T. 2002. Schizophrenia and Nogo: elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. *Brain Res Mol Brain Res* 107:183-189.
- Nudmamud S, Reynolds GP. 2001. Increased density of glutamate/N-methyl-D-aspartate receptors in superior temporal cortex in schizophrenia. *Neurosci Lett* 304:9-12.
- O'Connell P, Woodruff PW, Wright I, Jones P, Murray RM. 1997. Developmental insanity or dementia praecox: was the wrong concept adopted? *Schizophr Res* 23:97-106.
- Ohtsuki T, Inada T, Arinami T. 2004a. Failure to confirm association between AKT1 haplotype and schizophrenia in a Japanese case-control population. *Mol Psychiatry* 9:981-983.
- Ohtsuki T, Tanaka S, Ishiguro H, Noguchi E, Arinami T, Tanabe E, Yara K, Okubo T, Takahashi S, Matsuura M, Sakai T, Muto M, Kojima T, Matsushima E, Toru M, Inada T. 2004b. Failure to find association between PRODH deletion and schizophrenia. *Schizophr Res* 67:111-113.
- Olson JM, Asakura A, Snider L, Hawkes R, Strand A, Stoeck J, Hallahan A, Pritchard J, Tapscott SJ. 2001. NeuroD2 is necessary for development and survival of central nervous system neurons. *Dev Biol* 234:174-187.
- Orr-Urtreger A, Trakhtenbrot L, Ben-Levy R, Wen D, Rechavi G, Lonai P, Yarden Y. 1993. Neural expression and chromosomal mapping of Neu differentiation factor to 8p12-p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1867-1871.
- Overall JE, Gorham DR. 1962. The Brief Psychiatric Rating Scale. *Psychol Rep* 10:799-812.
- Owada Y, Utsunomiya A, Yoshimoto T, Kondo H. 1997. Expression of mRNA for Akt, serine-threonine protein kinase, in the brain during development and its transient enhancement following axotomy of hypoglossal nerve. *J Mol Neurosci* 9:27-33.
- Owen MJ. 2005. Genomic approaches to schizophrenia. *Clin Ther* 27 Suppl A:S2-7.
- Pae CU, Artioli P, Serretti A, Kim TS, Kim JJ, Lee CU, Lee SJ, Lee C, Paik IH. 2005. No evidence for interaction between 5-HT2A receptor and serotonin transporter genes in schizophrenia. *Neurosci Res* 52:195-199.

- Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Tsolaki M, Brunner F, Molyva D, Lutjohann D, Nitsch RM, Hock C. 2005. A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 66:940-947.
- Papiol S, Molina V, Desco M, Rosa A, Reig S, Gispert JD, Sanz J, Palomo T, Fananas L. 2005. Ventricular enlargement in schizophrenia is associated with a genetic polymorphism at the interleukin-1 receptor antagonist gene. *Neuroimage* 27:1002-1006.
- Park N, Juo SH, Cheng R, Liu J, Loth JE, Lilliston B, Nee J, Grunn A, Kanyas K, Lerer B, Endicott J, Gilliam TC, Baron M. 2004. Linkage analysis of psychosis in bipolar pedigrees suggests novel putative loci for bipolar disorder and shared susceptibility with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9:1091-1099.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:177-182.
- Peng Y, Jiang BH, Yang PH, Cao Z, Shi X, Lin MC, He ML, Kung HF. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling is involved in neurogenesis during *Xenopus* embryonic development. *J Biol Chem* 279:28509-28514.
- Perkins DO, Jeffries C, Sullivan P. 2005. Expanding the 'central dogma': the regulatory role of nonprotein coding genes and implications for the genetic liability to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 10:69-78.
- Petersen PH, Zou K, Hwang JK, Jan YN, Zhong W. 2002. Progenitor cell maintenance requires numb and numblike during mouse neurogenesis. *Nature* 419:929-934.
- Petersen PH, Zou K, Krauss S, Zhong W. 2004. Continuing role for mouse Numb and Numbl in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis. *Nat Neurosci* 7:803-811.
- Pichon B, Vankerckhove S, Bourrouillou G, Duprez L, Abramowicz MJ. 2004. A translocation breakpoint disrupts the ASPM gene in a patient with primary microcephaly. *Eur J Hum Genet* 12:419-421.
- Piomelli D. 1994. Eicosanoids in synaptic transmission. *Crit Rev Neurobiol* 8:65-83.
- Powchik P, Davidson M, Haroutunian V, Gabriel SM, Purohit DP, Perl DP, Harvey PD, Davis KL. 1998. Postmortem studies in schizophrenia. *Schizophr Bull* 24:325-341.
- Prasad KM, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Talkowski ME, Lewis DA, Keshavan MS. 2005. Genetic polymorphisms of the RGS4 and dorsolateral prefrontal cortex morphometry among first episode schizophrenia patients. *Mol Psychiatry* 10:213-219.
- Prasad S, Semwal P, Deshpande S, Bhatia T, Nimgaonkar VL, Thelma BK. 2002. Molecular genetics of schizophrenia: past, present and future. *J Biosci* 27:35-52.
- Primakoff P, Myles DG. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16:83-87.
- Przemeck GK, Heinzmann U, Beckers J, Hrabe de Angelis M. 2003. Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development* 130:3-13.
- Raper JA. 2000. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 10:88-94.
- Raz S, Raz N. 1990. Structural brain abnormalities in the major psychoses: a quantitative review of the evidence from computerized imaging. *Psychol Bull* 108:93-108.
- Reddy PS, Housman DE. 1997. The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol* 9:364-372.
- Reveley AM, Reveley MA, Clifford CA, Murray RM. 1982. Cerebral ventricular size in twins discordant for schizophrenia. *Lancet* 1:540-541.
- Risch N, Merikangas K. 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517.
- Ritchie MD, Hahn LW, Moore JH. 2003. Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. *Genet Epidemiol* 24:150-157.
- Roberts RC, Conley R, Kung L, Peretti FJ, Chute DJ. 1996. Reduced striatal spine size in schizophrenia: a postmortem ultrastructural study. *Neuroreport* 7:1214-1218.
- Ronai Z, Barta C, Guttman A, Lakatos K, Gervai J, Staub M, Sasvari-Szekely M. 2001. Genotyping the -521C/T functional polymorphism in the promoter region of dopamine D4 receptor (DRD4) gene. *Electrophoresis* 22:1102-1105.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD. 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39:13-25.

- Rujescu D, Meisenzahl EM, Giegling I, Kirner A, Leinsinger G, Hegerl U, Hahn K, Moller HJ. 2002. Methionine homozygosity at codon 129 in the prion protein is associated with white matter reduction and enlargement of CSF compartments in healthy volunteers and schizophrenic patients. *Neuroimage* 15:200-206.
- Russo-Neustadt A. 2003. Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 8:109-118.
- Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL. 2003. Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* 23:6671-6680.
- Sakamoto M, Hirata H, Ohtsuka T, Bessho Y, Kageyama R. 2003. The basic helix-loop-helix genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. *J Biol Chem* 278:44808-44815.
- Sala CF, Formenti E, Terstappen GC, Caricasole A. 2000. Identification, gene structure, and expression of human frizzled-3 (FZD3). *Biochem Biophys Res Commun* 273:27-34.
- Sallet PC, Elkis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, Campi de Castro C, Busatto GF, Gattaz WF. 2003a. Reduced cortical folding in schizophrenia: an MRI morphometric study. *Am J Psychiatry* 160:1606-1613.
- Sallet PC, Elkis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, de Castro CC, Busatto GF, Gattaz WF. 2003b. Rightward cerebral asymmetry in subtypes of schizophrenia according to Leonhard's classification and to DSM-IV: a structural MRI study. *Psychiatry Res* 123:65-79.
- Sanchez I, Hassinger L, Sihag RK, Cleveland DW, Mohan P, Nixon RA. 2000. Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo. Selective role of site-specific phosphorylation. *J Cell Biol* 151:1013-1024.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:914-921.
- Sasaki T, Taoka M, Ishiguro K, Uchida A, Saito T, Isobe T, Hisanaga S. 2002. In vivo and in vitro phosphorylation at Ser-493 in the glutamate (E)-segment of neurofilament-H subunit by glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem* 277:36032-36039.
- Sasieni PD. 1997. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53:1253-1261.
- Sawa A, Snyder SH. 2002. Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 296:692-695.
- Scarr E, Beneyto M, Meador-Woodruff JH, Deans B. 2005. Cortical glutamatergic markers in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 30:1521-1531.
- Schoumans J, Staaf J, Jonsson G, Rantala J, Zimmer KS, Borg A, Nordenskjold M, Anderlid BM. 2005. Detection and delineation of an unusual 17p11.2 deletion by array-CGH and refinement of the Smith-Magenis syndrome minimum deletion to approximately 650 kb. *Eur J Med Genet* 48:290-300.
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. 1998. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393:382-386.
- Schuchman EH, Levran O, Pereira LV, Desnick RJ. 1992. Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics* 12:197-205.
- Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. 2004. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 9:203-207.
- Schwab SG, Eckstein GN, Hallmayer J, Lerer B, Albus M, Borrmann M, Lichtermann D, Ertl MA, Maier W, Wildenauer DB. 1997. Evidence suggestive of a locus on chromosome 5q31 contributing to susceptibility for schizophrenia in German and Israeli families by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Mol Psychiatry* 2:156-160.
- Schwab SG, Hoefgen B, Hanses C, Hassenbach MB, Albus M, Lerer B, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB. 2005. Further evidence for association of variants in the AKT1 gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families. *Biol Psychiatry* 58:446-450.
- Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB. 2003. Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* 72:185-190.

- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525-528.
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. 1976. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261:717-719.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS. 1999. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:17-25.
- Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. 1995. Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* 52:805-818; discussion 819-820.
- SemaphorinNomenclatureCommittee. 1999. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell* 97:551-552.
- Senzaki K, Ogawa M, Yagi T. 1999. Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* 99:635-647.
- Sharma T, Lancaster E, Lee D, Lewis S, Sigmundsson T, Takei N, Gurling H, Barta P, Pearlson G, Murray R. 1998. Brain changes in schizophrenia. Volumetric MRI study of families multiply affected with schizophrenia--the Maudsley Family Study 5. *Br J Psychiatry* 173:132-138.
- Shasstry BS. 1999. Recent developments in the genetics of schizophrenia. *Neurogenetics* 2:149-154.
- Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, Wilner A, Henchy R, Crino P, Kamuro K, DiMario F, Berg M, Kuzniecky R, Cole AJ, Bromfield E, Biber M, Schomer D, Wheless J, Silver K, Mochida GH, Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Dobyns WB, Wood NW, Walsh CA. 2001. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 10:1775-1783.
- Sheen VL, Feng Y, Graham D, Takafuta T, Shapiro SS, Walsh CA. 2002. Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Hum Mol Genet* 11:2845-2854.
- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* 49:1-52.
- Shi DL, Goisset C, Boucaut JC. 1998. Expression of Xfz3, a Xenopus frizzled family member, is restricted to the early nervous system. *Mech Dev* 70:35-47.
- Shibata H, Aramaki T, Sakai M, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y. 2006. Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (GRIK3, GRIK4, GRIK5) with schizophrenia. *Psychiatry Res* 141:39-51.
- Shimizu K, Chiba S, Hosoya N, Kumano K, Saito T, Kurokawa M, Kanda Y, Hamada Y, Hirai H. 2000. Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2. *Mol Cell Biol* 20:6913-6922.
- Silverman JM, Smith CJ, Guo SL, Mohs RC, Siever LJ, Davis KL. 1998. Lateral ventricular enlargement in schizophrenic probands and their siblings with schizophrenia-related disorders. *Biol Psychiatry* 43:97-106.
- Sklar P, Pato MT, Kirby A, Petryshen TL, Medeiros H, Carvalho C, Macedo A, Dourado A, Coelho I, Valente J, Soares MJ, Ferreira CP, Lei M, Verner A, Hudson TJ, Morley CP, Kennedy JL, Azevedo MH, Lander E, Daly MJ, Pato CN. 2004. Genome-wide scan in Portuguese Island families identifies 5q31-5q35 as a susceptibility locus for schizophrenia and psychosis. *Mol Psychiatry* 9:213-218.
- Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 21:1469-1477.
- Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME. 2001. Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* 31:557-568.
- Sonninen V, Savontaus ML. 1987. Hereditary multi-infarct dementia. *Eur Neurol* 27:209-215.
- Sourander P, Walinder J. 1977. Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 39:247-254.
- Stefansson H, Sarginson J, Kong A, Yates P, Steinthorsdottir V, Gudfinnsson E, Gunnarsdottir S, Walker N, Petursson H, Crombie C, Ingason A, Gulcher JR, Stefansson K, St Clair D.

2003. Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am J Hum Genet* 72:83-87.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K. 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:877-892.
- Steiner JP, Gardner K, Baines A, Bennett V. 1987. Synapsin I: a regulated synaptic vesicle organizing protein. *Brain Res Bull* 18:777-785.
- Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:138-145.
- Straub RE, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. 2002. Genome-wide scans of three independent sets of 90 Irish multiplex schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes. *Mol Psychiatry* 7:542-559.
- Strutt D. 2003. Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. *Development* 130:4501-4513.
- Suddath RL, Christison GW, Torrey EF, Casanova MF, Weinberger DR. 1990. Anatomical abnormalities in the brains of monozygotic twins discordant for schizophrenia. *N Engl J Med* 322:789-794.
- Sullivan PF. 2005. The genetics of schizophrenia. *PLoS Med* 2:e212.
- Sun D, McDonnell M, Chen XS, Lakkis MM, Li H, Isaacs SN, Elsea SH, Patel PI, Funk CD. 1998. Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *J Biol Chem* 273:33540-33547.
- Sun YP, Deng KJ, Wang F, Zhang J, Huang X, Qiao S, Zhao S. 2004. Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. *Gene* 325:171-178.
- Sunyaev S, Lathe W, 3rd, Bork P. 2001a. Integration of genome data and protein structures: prediction of protein folds, protein interactions and "molecular phenotypes" of single nucleotide polymorphisms. *Curr Opin Struct Biol* 11:125-130.
- Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe W, 3rd, Kondrashov AS, Bork P. 2001b. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* 10:591-597.
- Szeszko PR, Lipsky R, Mentschel C, Robinson D, Gunduz-Bruce H, Sevy S, Ashtari M, Napolitano B, Bilder RM, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK. 2005. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry* 10:631-636.
- Szeszko PR, Vogel J, Ashtari M, Malhotra AK, Bates J, Kane JM, Bilder RM, Frevort T, Lim K. 2003. Sex differences in frontal lobe white matter microstructure: a DTI study. *Neuroreport* 14:2469-2473.
- Takahashi S, Cui YH, Kojima T, Han YH, Yu SY, Tanabe E, Yara K, Matsuura M, Matsushima E, Nakayama J, Arinami T, Shen YC, Faraone SV, Tsuang MT. 2003. Family-based association study of the NOTCH4 gene in schizophrenia using Japanese and Chinese samples. *Biol Psychiatry* 54:129-135.
- Takei Y, Kondo S, Harada A, Inomata S, Noda T, Hirokawa N. 1997. Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J Cell Biol* 137:1615-1626.
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM. 1999. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99:71-80.
- Tarrant CJ, Jones PB. 1999. Precursors to schizophrenia: do biological markers have specificity? *Can J Psychiatry* 44:335-349.
- Thiel G. 1993. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol* 3:87-95.

- Thiselton DL, Webb BT, Neale BM, Ribble RC, O'Neill FA, Walsh D, Riley BP, Kendler KS. 2004. No evidence for linkage or association of neuregulin-1 (NRG1) with disease in the Irish study of high-density schizophrenia families (ISHDSF). *Mol Psychiatry* 9:777-783; image 729.
- Tochigi M, Zhang X, Umekage T, Ohashi J, Kato C, Marui T, Otowa T, Hibino H, Otani T, Kohda K, Liu S, Kato N, Tokunaga K, Sasaki T. 2004. Association of six polymorphisms of the NOTCH4 gene with schizophrenia in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 128:37-40.
- Toulouse A, Rochefort D, Roussel J, Joobert R, Rouleau GA. 2003. Molecular cloning and characterization of human RAI1, a gene associated with schizophrenia. *Genomics* 82:162-171.
- Toyooka K, Asama K, Watanabe Y, Muratake T, Takahashi M, Someya T, Nawa H. 2002. Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 110:249-257.
- Tran KD, Smutzer GS, Doty RL, Arnold SE. 1998. Reduced Purkinje cell size in the cerebellar vermis of elderly patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 155:1288-1290.
- Tsuang M. 2000. Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry* 47:210-220.
- Uhl GR, Grow RW. 2004. The burden of complex genetics in brain disorders. *Arch Gen Psychiatry* 61:223-229.
- Usdin K, Grabczyk E. 2000. DNA repeat expansions and human disease. *Cell Mol Life Sci* 57:914-931.
- Van Den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, Becker T, Freudenberg J, Jonsson EG, Mattila-Evenden M, Sedvall GC, Czerski PM, Kapelski P, Hauser J, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. 2003. The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease. *Am J Hum Genet* 73:1438-1443.
- van der Flier A, Sonnenberg A. 2001. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 1538:99-117.
- Van Horn JD, McManus IC. 1992. Ventricular enlargement in schizophrenia. A meta-analysis of studies of the ventricle:brain ratio (VBR). *Br J Psychiatry* 160:687-697.
- Vanhalst K, Kools P, Vanden Eynde E, van Roy F. 2001. The human and murine protocadherin-beta one-exon gene families show high evolutionary conservation, despite the difference in gene number. *FEBS Lett* 495:120-125.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. 2003. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5:367-377.
- Velakoulis D, Pantelis C, McGorry PD, Dudgeon P, Brewer W, Cook M, Desmond P, Bridle N, Tierney P, Murrie V, Singh B, Copolov D. 1999. Hippocampal volume in first-episode psychoses and chronic schizophrenia: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 56:133-141.
- Vita A, Dieci M, Silenzi C, Tenconi F, Giobbio GM, Invernizzi G. 2000. Cerebral ventricular enlargement as a generalized feature of schizophrenia: a distribution analysis on 502 subjects. *Schizophr Res* 44:25-34.
- Vlangos CN, Wilson M, Blancato J, Smith AC, Elsea SH. 2005. Diagnostic FISH probes for del(17)(p11.2p11.2) associated with Smith-Magenis syndrome should contain the RAI1 gene. *Am J Med Genet A* 132:278-282.
- Vojtek AB, Taylor J, DeRuiter SL, Yu JY, Figueroa C, Kwok RP, Turner DL. 2003. Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 23:4417-4427.
- Walz A, Rodriguez I, Mombaerts P. 2002. Aberrant sensory innervation of the olfactory bulb in neuropilin-2 mutant mice. *J Neurosci* 22:4025-4035.
- Wang X, He G, Gu N, Yang J, Tang J, Chen Q, Liu X, Shen Y, Qian X, Lin W, Duan Y, Feng G, He L. 2004. Association of G72/G30 with schizophrenia in the Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1281-1286.
- Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. 1996. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem* 271:4468-4476.
- Wang Y, Thekdi N, Smallwood PM, Macke JP, Nathans J. 2002. Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. *J Neurosci* 22:8563-8573.

- Wang Y, Zhang J, Mori S, Nathans J. 2006. Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 knock-out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J Neurosci* 26:355-364.
- Ward KE, Friedman L, Wise A, Schulz SC. 1996. Meta-analysis of brain and cranial size in schizophrenia. *Schizophr Res* 22:197-213.
- Wassink TH, Nelson JJ, Crowe RR, Andreasen NC. 1999. Heritability of BDNF alleles and their effect on brain morphology in schizophrenia. *Am J Med Genet* 88:724-728.
- Wei J, Hemmings GP. 2004. Lack of a genetic association between the frizzled-3 gene and schizophrenia in a British population. *Neurosci Lett* 366:336-338.
- Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. 2003. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:592-610.
- Weinberg W. 1908. *On the demonstration of heredity in man*. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- Wesley CS. 1999. Notch and wingless regulate expression of cuticle patterning genes. *Mol Cell Biol* 19:5743-5758.
- White T, Andreasen NC, Nopoulos P, Magnotta V. 2003. Gyrification abnormalities in childhood- and adolescent-onset schizophrenia. *Biol Psychiatry* 54:418-426.
- Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. 2005. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 76:887-893.
- Wille A, Hoh J, Ott J. 2003. Sum statistics for the joint detection of multiple disease loci in case-control association studies with SNP markers. *Genet Epidemiol* 25:350-359.
- Williams HJ, Williams N, Spurlock G, Norton N, Ivanov D, McCreadie RG, Preece A, Sharkey V, Jones S, Zammit S, Nikolov I, Kehaiov I, Thapar A, Murphy KC, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC. 2003a. Association between PRODH and schizophrenia is not confirmed. *Mol Psychiatry* 8:644-645.
- Williams NM, Preece A, Morris DW, Spurlock G, Bray NJ, Stephens M, Norton N, Williams H, Clement M, Dwyer S, Curran C, Wilkinson J, Moskvina V, Waddington JL, Gill M, Corvin AP, Zammit S, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC. 2004a. Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dystrobrevin binding protein gene (DTNBP1). *Arch Gen Psychiatry* 61:336-344.
- Williams NM, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, McCreadie RG, Buckland P, Sharkey V, Chowdari KV, Zammit S, Nimgaonkar V, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC. 2004b. Support for RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 55:192-195.
- Williams NM, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Zammit S, O'Donovan MC, Owen MJ. 2003b. Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:485-487.
- Williams T, Tjian R. 1991. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev* 5:670-682.
- Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Spriggs MK, Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1998. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95:903-916.
- Winefield HR, Harvey EJ. 1993. Determinants of psychological distress in relatives of people with chronic schizophrenia. *Schizophr Bull* 19:619-625.
- Winston JT, Koepp DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW. 1999. A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol* 9:1180-1182.
- Wodarz A, Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59-88.
- Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG, White JM. 1995. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* 169:378-383.
- Wood SJ, Velakoulis D, Smith DJ, Bond D, Stuart GW, McGorry PD, Brewer WJ, Bridle N, Eritaia J, Desmond P, Singh B, Copolov D, Pantelis C. 2001. A longitudinal study of hippocampal volume in first episode psychosis and chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 52:37-46.
- Woods BT. 1998. Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism. *Am J Psychiatry* 155:1661-1670.

- Wu J, Saint-Jeannet JP, Klein PS. 2003. Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. *Trends Neurosci* 26: 40-45.
- Wu Q, Maniatis T. 1999. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* 97:779-790.
- Wu Q, Zhang T, Cheng JF, Kim Y, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Noonan JP, Zhang MQ, Myers RM, Maniatis T. 2001. Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome Res* 11:389-404.
- Xavier-Neto J, Pereira AC, Motoyama AH, Krieger JE. 1998. A luciferase-engineered cell line for study of cAMP regulation in endothelial cells. *Am J Physiol* 275:C75-81.
- Xu Y, Krishnan A, Wan XS, Majima H, Yeh CC, Ludewig G, Kasarskis EJ, St Clair DK. 1999. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene* 18:93-102.
- Yagi T. 1999. Molecular mechanisms of Fyn-tyrosine kinase for regulating mammalian behaviors and ethanol sensitivity. *Biochem Pharmacol* 57:845-850.
- Yamada M, Tsuji S, Takahashi H. 2002. Genotype-phenotype correlation in CAG-repeat diseases. *Neuropathology* 22:317-322.
- Yamagata Y. 2003. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and differential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation in vivo. *J Pharmacol Sci* 93:22-29.
- Yang J, Si T, Ling Y, Ruan Y, Han Y, Wang X, Zhang H, Kong Q, Li X, Liu C, Zhang D, Zhou M, Yu Y, Liu S, Shu L, Ma D, Wei J, Zhang D. 2003a. Association study of the human FZD3 locus with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 54:1298-1301.
- Yang JZ, Si TM, Ruan Y, Ling YS, Han YH, Wang XL, Zhou M, Zhang HY, Kong QM, Liu C, Zhang DR, Yu YQ, Liu SZ, Ju GZ, Shu L, Ma DL, Zhang D. 2003b. Association study of neuregulin 1 gene with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:706-709.
- Yang Q, Cui J, Chazaro I, Cupples LA, Demissie S. 2005a. Power and type I error rate of false discovery rate approaches in genome-wide association studies. *BMC Genet* 6 Suppl 1:S134.
- Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. 2005b. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 280:9330-9335.
- Yoon K, Gaiano N. 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8:709-715.
- Young CE, Arima K, Xie J, Hu L, Beach TG, Falkai P, Honer WG. 1998. SNAP-25 deficit and hippocampal connectivity in schizophrenia. *Cereb Cortex* 8:261-268.
- Yun K, Fischman S, Johnson J, Hrabe de Angelis M, Weinmaster G, Rubenstein JL. 2002. Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129:5029-5040.
- Zaidel DW, Esiri MM, Harrison PJ. 1997. Size, shape, and orientation of neurons in the left and right hippocampus: investigation of normal asymmetries and alterations in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 154:812-818.
- Zakzanis KK, Hansen KT. 1998. Dopamine D2 densities and the schizophrenic brain. *Schizophr Res* 32:201-206.
- Zhang B, Yuan Y, Jia Y, Yu X, Xu Q, Shen Y, Shen Y. 2005. An association study between polymorphisms in five genes in glutamate and GABA pathway and paranoid schizophrenia. *Eur Psychiatry* 20:45-49.
- Zhang J. 2003. Evolution of the human ASPM gene, a major determinant of brain size. *Genetics* 165:2063-2070.
- Zhang S, Zhao H. 2001. Quantitative similarity-based association tests using population samples. *Am J Hum Genet* 69:601-614.
- Zhang XN, Jiang SD, He XH, Zhang LN. 2004a. 102T/C SNP in the 5-hydroxytryptamine receptor 2A (HTR2A) gene and schizophrenia in two southern Han Chinese populations: lack of association. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 126:16-18.
- Zhang Y, Yu X, Yuan Y, Ling Y, Ruan Y, Si T, Lu T, Wu S, Gong X, Zhu Z, Yang J, Wang F, Zhang D. 2004b. Positive association of the human frizzled 3 (FZD3) gene haplotype with schizophrenia in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129:16-19.
- Zilles K, Armstrong E, Schleicher A, Kretschmann HJ. 1988. The human pattern of gyrification in the cerebral cortex. *Anat Embryol (Berl)* 179:173-179.

- Zipursky RB, Lambe EK, Kapur S, Mikulis DJ. 1998. Cerebral gray matter volume deficits in first episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 55:540-546.
- Zondervan KT, Cardon LR. 2004. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 5:89-100.
- Zou G, Zuo Y. 2006. On the sample size requirement in genetic association tests when the proportion of false positives is controlled. *Genetics* 172:687-691.

9. CURRICULUM VITAE

NOME: Sheila Gregório Purim

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: 2 de Julho de 1979- Minneapolis, Minnesota, EUA

EDUCAÇÃO

1) Colégio Pio XII / Colégio Guilherme Dummont Villares- Colegial Completo – Conclusão em 1996 – sem reprovações

2) UNESP – Rio Claro/SP - Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas – Conclusão em 2001

OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica PIBIC-CNPq: 2000-2001

Bolsista de Doutorado CNPq (Processo 141485/2002-7): 2002-2006

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Em Eventos Científicos Nacionais

1) XVIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL – FESBE. (Pinhais, Paraná; 27 a 30 de Agosto de 2003)

Gregório SP, Fridman C, Ojopi EPB, Nunes PV, Wacker P, Bahia V, Bertolucci P, Forlenza O, Nitrini R, Gattaz WF, Dias-Neto E. Investigating the Presence of the BDNF VAL66MET Polymorphism in Patients with Alzheimer Disease.

Fridman C, Ojopi EPB, **Gregório SP**, Ikenaga E, Vallada H, Gattaz WF, Dias-Neto E. Association of a New Polymorphism in 12-LOX Gene with Bipolar Disorder.

2) 49^o CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA (Águas de Lindóia, SP; 16 a 19 de Setembro de 2003)

Gregório SP, Sallet PC, Yacubian J, Tavares H, Pena-Dias AP, Gattaz WF, Dias-Neto E. Morfometria Cerebral, Mapeamento Gênico e Polimorfismos de DNA: Abordagem Multidisciplinar para o Estudo da Esquizofrenia.

3) 51^o CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA (Águas de Lindóia, SP; 07 a 10 de Setembro de 2005)

Gregório SP, Sallet PC, Yacubian J, Tavares H, Pena-Dias AP, Gattaz WF, Dias-Neto E. Neurogênese e Esquizofrenia: Estudo Molecular de Associação.

- Em eventos científicos internacionais

1) 12TH BIENNIAL WINTER WORKSHOP ON SCHIZOPHRENIA (Davos, Suíça; 8 a 13 de fevereiro de 2004)

Gregório SP, Sallet PC, Yacubian J, Tavares H, Pena-Dias AP, Gattaz WF, Dias-Neto E. Brain Morphometry, Gene Mapping and DNA Polymorphisms: A Multidisciplinary Approach for the Study of Schizophrenia

2) LATIN AMERICA CINP REGIONAL MEETING E XIII JORNADA DE PSIQUIATRIA DA APERJ (Rio de Janeiro, RJ; 26 a 28 de Agosto de 2004)

Gregório SP, Sallet PC, Yacubian J, Tavares H, Pena-Dias AP, Gattaz WF, Dias-Neto E. Associação entre Estudos de Imagem por Ressonância Magnética e Genética para avaliar as Influências Genéticas sobre o Neurodesenvolvimento em Esquizofrenia.

3) THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR NEUROIMAGING IN PSYCHIATRY (ISNIP) AND THE EEG & CLINICAL NEUROSCIENCE SOCIETY (ECNS) *JOINT MEETING* (Irvine e Newport Beach, California, EUA; 29 de Setembro a 02 de Outubro de 2004)

Gregório SP, Sallet PC, Yacubian J, Tavares H, Pena-Dias AP, Gattaz WF, Dias-Neto E. Imaging The Genetic Influences on Brain Morphometry in Schizophrenia.

PUBLICAÇÕES

1) Tajara EH, Dias Neto E, Silva WA, **Gregorio SP**, Silva AMA, Dinarte AR, Fortes CS, Figueiredo DL, Vidotto A, Polachini GM, Silveira NJF, Rodrigues RV, Dias THG, Mancini UM, Canto AL, Ferraz A, Moreira-Filho CA, Lehn CN, Serafini LN, Okamoto OK, Cury PM, Carvalho MB, Wunsch-Filho V, Zago MA, Head and Neck Genome Project (2006): Markers of Aggressive Behavior in Head and Neck Tumors. **Oral Oncology**, **11**: in press

2) **Gregorio SP**, Mury FB, Ojopi EPB, Sallet PC, Moreno DH, Yacubian J, Tavares H, Santos FR, Gattaz WF, Dias Neto E (2005): *Nogo* CAA 3'UTR Insertion is not associated with Schizophrenia nor with Bipolar Disorder. **Schizophrenia Research.**, **75(1)**: 5-9.

3) Ojopi EPB, **Gregorio SP**, Guimarães PEM, Fridman C, Dias Neto E (2004): O Genoma Humano e as Perspectivas para a Esquizofrenia. **Rev. Psiqu. Clin.**, **31(1)**: 9-18.

4) Fridman C, **Gregorio SP**, Dias Neto E, Ojopi EPB (2004): Alterações Genéticas na Doença de Alzheimer. **Rev. Psiqu. Clin.**, **31(1)**: 19-25.

5) Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EAL, Guimarães PEM, Ojopi EPB, Paquola ACM, Piazza JP, Nishiyama Jr MY, Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, **Gregorio SP**, Ho PL, Leite RA, Malaquias LCC, Marques RCP, Miyasato PA, Nascimento ALTO, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sá RG, Stukart GC, Bento Soares M, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AMBN, Wilson AR, Menck CFM, Setubal JC, Leite LCC, Dias-Neto E (2003):

Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics.**, **35(2):148-157.**

6) Fridman C, Ojopi EPB, **Gregorio SP**, Ikenaga EHM, Doris H, Demetrio FN, Guimaraes PM, Vallada HP, Gattaz WF, Dias Neto E (2003): Association of a new polymorphism in ALOX12 gene with bipolar disorder. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience.** , **253: 40 – 43**

-Capítulos de Livro

1) **Gregorio SP**, Ojopi EPB, Mendes CT, Dias Neto E. Farmacogenômica de Doenças Psiquiátricas. **In: Manual de Psicofarmacologia Clínica**, Editora Guanabara Koogan, Brasil, 2006, 2ª ed. (no prelo).

2) Ojopi EPB, **Gregorio SP**, Guimaraes PEM, Fridman C, Dias Neto E. Human Genome and the Perspectives for Schizophrenia **In: 5th Symposium for the Search for the Causes of Schizophrenia**, Edta. Steikopff Verlag , Alemanha, 2003, Vol. 5: 278-296.

PRÊMIOS

1) Travel Award: 6th Annual Conference of the EEG and Clinical Neurological Society for Neuroimaging in Psychiatry (ISNIP), Irvine, California, EUA, Outubro de 2004.

2) Young Scientist Award. 12th Biennial Winter Workshop on Schizophrenia. Davos, Suíça, Fevereiro de 2004.

3) Voto de Aplauso do Senado Federal pelo seqüenciamento do transcriptoma do *Schistosoma mansoni*. Brasília, Brasil, 2003.

ANEXO I

ANEXO II

**Analysis of coding-polymorphisms in NOTCH-related genes reveals
NUMBL poly-glutamine repeat to be associated with schizophrenia in
Brazilian and Danish subjects.**

Sheila Passos Gregorio^{a,b}, Wagner Farid Gattaz^a, Hildeberto Tavares^a,
Christian Kieling^c, Sally Timm^d, August G. Wang^e, Henrik Berg Rasmussen^f,
Thomas Werge^f, Emmanuel Dias-Neto^a

a- Laboratory of Neurosciences (LIM-27), Department and Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo. Address: R. Dr. Ovidio Pires de Campos, 785 – 3rd floor - Cerqueira Cesar- CEP: 05403-010, São Paulo, Brazil.

b- Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 748 - Butantã - CEP: 05513-970, São Paulo - SP, Brazil

c- School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 – 90035-003 – Porto Alegre – RS, Brazil

d - University Department of Psychiatry, H:S Frederiksberg Hospital, DK-2000, Frederiksberg, Denmark.

e - University Department of Psychiatry, H:S Amager Hospital, DK-2300, København S, Denmark.

f - Research Institute of Biological Psychiatry, University Hospital of Copenhagen, H:S Sct. Hans Hospital

Corresponding Author:

Emmanuel Dias-Neto

e-mail: emmanuel@usp.br

Postal Address: Lab. of Neurosciences (LIM-27), Instituto de Psiquiatria
Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo
R. Dr. Ovidio de Campos, 785 – Cerqueira César -05403-010, São Paulo, SP, BRAZIL
Phone + 55 11 3069.7267, FAX + 55 11 3069.8011

1. Abstract

Abnormality in neurodevelopment is one of the most robust hypotheses on the etiology of schizophrenia and has found substantial support from brain imaging and genetic studies. Neurodevelopmental processes involve several signaling pathways, including the Notch, but little is known at present regarding their possible involvement in schizophrenia. In the present study we investigated the link of non-synonymous variants of five genes of the Notch pathway (*NOTCH2*, *NOTCH3*, *JAGGED2*, *ASCL1* and *NUMBL*) to schizophrenia in a group of 200 Brazilian patients and 200-paired controls. Also, we replicated our most promising finding, the association of the *NUMBL* variant, in an unrelated set of 693 Danish patients and controls. Finally, we merged the Brazilian and Danish cohorts, a total of 1.093 subjects, and found the allele 18 CAG of *NUMBL* ($p=0.003$, $\chi^2=8.67$, $OR=1.30$, 95%CI 1.09-1.55) as well as the 18/18 CAG genotype ($p=0.002$, $\chi^2=9.13$, $OR=1.45$, 95%CI 1.14-1.85) to be associated with schizophrenia. The consistency of this finding in two independent and unrelated populations reinforces the veracity of this association.

Keywords: Schizophrenia, DNA polymorphism, Notch, NumbL, SNP, microsatellite

2. Introduction

The contribution of genetic factors to the vulnerability to schizophrenia (SZ) is well- established through twin- and family studies (Kohn and Lerer, 2002; McGuffin et al., 2003). In contrast to the 1% lifetime incidence of schizophrenia in the general population, the incidence of the disease in the relatives of affected individuals increases with the percentage of shared genes (Gottesman, 1990). Several lines of evidence point to SZ as a neurodevelopmental disorder (McCarley et al., 1999; Harrison, 1999; Shenton et al., 2001) and multiple neurobiological pathways have been implicated in the putative pathophysiological processes. Neurogenesis-related genes are thus plausible candidates to be involved in the etiology of SZ.

The importance of the evolutionary conserved Notch signaling pathway (see figure 1 for illustration) to neurodevelopment is evidenced by many studies (reviewed in Shimizu et al., 2002). Neurophysiological processes that involve Notch include bilateral symmetry regulation, cell fate determination and neural stem cells proliferation and differentiation (Hrabe de Angelis et al., 1997; Apelqvist et al., 1999; Kiernan et al., 2001; Kim and Hebrok, 2001; De Bellard et al., 2002; Przemeck et al., 2003). In general, Notch activity leads to inhibition of cell differentiation signaling, which preserves responsive progenitors thus preserving the potential for cell diversity (Kopan and Turner, 1996). The expression of Notch pathway molecules in post-mitotic neurons seem to be important for the plasticity of the mature brain as well as for the formation of long-term memory (reviewed in Costa et al., 2005). Evidence indicates that Notch participates in the regulation of neurite growth and branching, growth and retraction of synapses and adult neurogenesis, processes that are the basis of the plastic rearrangements of the neuronal circuitry. Important members of the Notch pathway are located in genomic regions that have previously been linked to SZ including, for example, *NOTCH2* (1p13-p11), *NUMB* (14q24.3) and *NUMBL* (19q13.13-q13.2) (Bailer et al., 2000; Chiu et al., 2002; Lewis et al., 2003; MacGregor et al., 2004).

In this study we investigated, in SZ and matched controls, the polymorphic status of selected non-synonymous DNA alterations located in *NOTCH2* and *NOTCH3*, together with other members of the Notch-pathway (*JAGGED2*, *ASCL1*, *NUMB* and *NUMBL*). These genes have been convincingly linked to important neurodevelopmental processes. Hence, we hypothesized that potentially functional polymorphisms in these genes may confer liability to SZ. The impact of these polymorphisms on susceptibility to schizophrenia was investigated in a group of 200 Brazilian DNA samples derived from schizophrenic patients and 200 paired controls.

We also replicated the most promising finding in an unrelated set of 693 Danish DNA samples, including cases and controls.

3. Materials and Methods

3.1 Subjects

Brazilian DNA samples were obtained from 200 schizophrenic patients (122 males and 78 females; mean age: 33.9 ± 10.4), derived from the Institute of Psychiatry, Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. Diagnoses were made through structured interviews based on DSM-IV. The Brazilian controls included 200 individuals (122 males and 78 females; mean age: 36.6 ± 11), from the blood bank of the same hospital, without previous history of psychiatric disorders.

This study also included 350 psychotic in- and outpatients, who had previously been recruited to the Danish Psychiatric Biobank from psychiatric departments at the five hospitals in the Copenhagen area. Patients were diagnosed according to the ICD-10 criteria and included a vast majority with schizophrenia (F20, $n=314$), delusional disorder (F22, $n=9$), and schizoaffective disorder (F25, $n=27$). The reliability of the clinical diagnoses was confirmed on 100 of these patients using the semi-structured interview of the OPCRIT instrument (positive predictive value $>98\%$) (McGuffin et al., 1991). All patients had a considerable duration of psychotic illness (average= $13.1 [\pm 8.9]$ years of treatment since first admission to a psychiatric department).

The Danish non-psychotic control group was composed of 343 unrelated, anonymous blood donors, recruited from the same geographical area of Greater Copenhagen as the patients. Patients (138 females & 212 males) and controls (136 females & 207 males) were not different with respect to gender ratio ($p=0.90$), while the mean age of patients (42.2 ± 12.1 yr) was slightly lower than in the control sample (49.7 ± 12.8 yr).

All patients had given written informed consent prior to inclusion into the project. The study was approved by the Comitê de Ética em Pesquisas (Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo) and by the Danish Scientific-Ethical Committees and the Danish Data Protection Agency.

3.2 Selection of polymorphisms

Polymorphism search for each gene and *in silico* validation were performed using bioinformatics tools such as BLAST against genomic DNA, mRNA or EST sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), as well as searches in the SNP database (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) and the literature. All the polymorphisms selected for validation could be confirmed by at least 2 different

DNA sequences from public databases or had data dbSNP data suggesting their frequency to be at least 5%. All polymorphisms included have potential functional effects, as all lead to alterations of the protein sequences (Table 1) and none of them were previously studied before in SZ or in any other human disease.

3.3 DNA extraction and genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of patients and controls by using salting-out methods for protein precipitation and DNA isolation (Laitinen et al., 1994).

All genotyping procedures were performed at the Laboratory of Neurosciences, Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine of the University of São Paulo, Brazil. For evaluating *ASCL1* and *NUMBL* microsatellites, one of the amplification primers was labeled with the fluorescent dye 6-FAM (*ASCL1R* and *NUMBLF*, respectively), and amplification products were injected in an ABI3100 (Applied Biosystems) together with a size standard (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems). Peaks were analyzed using the GeneScan and Genotype softwares (Applied Biosystems) to estimate the number of repeating units. In order to confirm the number of repeats in *NUMBL*, amplification fragments derived from some homozygous individuals were sequenced using the Big Dye terminator kit (Applied Biosystems) and were used as a reference.

The putative *NUMB* (rs.1050477) and *JAG2* (rs.1057744) SNPs were genotyped by using single base sequencing reactions (SnapShot multiplex kit, Applied Biosystems). Products were injected in an ABI3100 together with a size standard (GeneScan 120 LIZ, Applied Biosystems), and analyzed using the GeneScan software.

NOTCH2 (rs.8002) and *NOTCH3* (rs.1044009) SNPs were evaluated using Real Time PCR, with fluorescent-labeled allele specific probes (fluorescent dyes VIC and FAM). Reactions were performed in an ABI7000 (Applied Biosystems). All primers and probes used in this study are described in Table 1.

3.4 Statistical and haplotypic analysis

The magnitude of association between alleles and disease was measured by the odds ratio (OR) and respective 95% confidence interval (CI) together with the chi-squares tests using the level of confidence of $\alpha=0.05$. Data were also analyzed using univariate logistic regression analysis (SPSS-10.1). Multivariate logistic regression was used to correct for effects of other variables and to identify possible interactions.

Haplotypic analysis of the genomic region containing the *NUMBL* polymorphic microsatellite was performed by using Haploview 3.2 (Barret et al., 2005) and data

from a Caucasian population (CEU) derived from the International HapMap Project (www.hapmap.org - public release #19). Haplotype blocks were defined using the default algorithm taken from Gabriel et al. (2002), with a block being created when 95% of informative comparisons are in "strong LD" (D' confidence interval between 0.98 and 0.7) and only markers with minimal allele frequency of 5% or higher are considered.

4. Results

Single-base sequencing analysis of the putative SNP of *NUMB* (rs.1050477) failed to confirm the existence of this polymorphism in a set of 118 chromosomes from Brazilian subjects, derived from healthy controls (n=78) and patients with SZ (n=40), leading us to halt its analysis. Indeed, 17.5% of the dbSNPs evaluated with the samples from the HapMap consortium showed to be monomorphic, and another 7.7% were rare (MAF =10% - Altshuler et al., 2005). The presence of the remaining five polymorphisms in the NOTCH pathway was confirmed and all were genotyped for 400 Brazilian subjects. Genotypic and allelic frequencies for these five polymorphisms in the Brazilian cohort are shown in Tables 2 and 3. None of the determined genotype distributions deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium in patients or controls (data not shown).

Genotypic frequencies of *JAG2*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *ASCL1* variants did not differ significantly in patients and controls (Table 2). Allelic frequencies from these genes were also similar between cases and controls and no significant variations could be observed (data not shown). However our analysis of the Brazilian cohort showed *NUMBL* 18Q allele (containing 18 glutamine-coding codons) to be in excess among patients with schizophrenia (70% versus 61,5%, $p=0.011$, $\chi^2=6.41$, OR=1.46, 95%CI 1.09-1.96). Also, the corresponding homozygous genotype was found in excess among patients (50% versus 37,5%, $p=0.012$, $\chi^2=6.35$, OR=1.67, 95%CI 1.12-2.48) when compared to controls (Table 3). The association of *NUMBL* was also found using logistic regression and the strength of this association did not change after correction for the other four genetic variables; nor were any significant interaction between the *NUMBL* and the other examined loci detected (data not shown).

The association of *NUMBL* to SZ was then challenged in an ethnically distinct and larger sample of 350 patients and 343 matched controls from Denmark. These analyses also showed this same allele and genotype to be in excess – albeit non-significantly – among Danish patients (18Q allele: 65.4% versus 60,6%, $p=0.065$,

$\chi^2=3.40$, OR=1.23, 95%CI 0.99-1.53; 18Q homozygous genotype: 42.9% versus 35.9%, $p=0.059$, $\chi^2=3.55$, OR=1.34, 95%CI 0.99-1.82) – Table 3.

This same finding was also confirmed using logistic regression analysis and was not altered by inclusion of ethnicity into the model (data not shown). The results are resistant to Bonferroni correction for multiple testing by a factor 25, largely exceeding the number of tests performed in this study.

5. Discussion

The involvement of the Notch pathway in neurogenesis is very well established but only few studies of polymorphisms in genes of this pathway in schizophrenia have been performed. To our knowledge, this is the first study that simultaneously evaluated five polymorphisms in genes of this pathway in SZ. All polymorphisms investigated here are being evaluated for the first time in human diseases and all are potentially functional, especially due to their effect in modifying the protein sequence (Table 1).

NOTCH2 and *NOTCH3* are key genes of the Notch pathway. mRNAs of both genes are expressed in areas of cellular proliferation in the post-natal rat brain, and more extensively so in the brain ventricles (Irvin et al., 2001), areas that undergo important alterations in SZ. Dozens of studies have associated mutations in *NOTCH3* with a cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) syndrome, and there is at least one report of co-occurrence of CADASIL and schizophrenia (Lagas and Junoven, 2001) suggesting a possible role of *NOTCH3* in psychosis. A recent study suggested that *NOTCH2* and *NOTCH3* seem to have a redundant function during the mouse embryogenesis (Kitamoto et al., 2005), a fact that further reinforces the importance of this pathway. *JAGGED2* binds to Notch receptors, releasing an intracellular domain of the receptor, which translocates to the nucleus to form a complex with the DNA binding protein CBF1. This complex activates *HES1* and *HES5* transcription and thereby antagonizes bHLH transcription factors such as *ASCL1* (the human ortholog of the mouse *Mash1*) that is expressed in the developing nervous system and exerts a critical function to neocortical maturation (Horton et al., 1999; Ito et al., 2003). The DNA polymorphisms we studied in these genes, as mentioned before, could not be associated with SZ.

NUMB and *NUMBL* play redundant, but critical roles during neurodevelopment. Their genes are located on chromosomes 14q24.3 and

19q13.13-q13.2, regions previously linked to SZ (Bailer et al., 2000; Chiu et al., 2002; MacGregor et al., 2004). Genetic analysis in flies demonstrated that NUMB can antagonize Notch signaling (Roegiers and Jan, 2004) and at least three groups suggested that mammalian NUMB and NUMBL can antagonize Notch (Sestan et al., 1999; Sade et al., 2004; Zhong et al., 1996). However, studies involving mutants for NUMB and/or NUMBL have produced controversial results. While two papers showed consistent NUMB/NUMBL antagonism over NOTCH, with mutants showing impaired neuronal differentiation and progenitor maintenance (Zilian et al., 2001; Li et al., 2003), three other studies resulted in precocious neuronal differentiation (Zhong et al., 2000; Petersen et al., 2002; Everett and Wood, 2004). Although these studies are discrepant, all they show that these proteins are extremely important for neurogenesis and that NUMB/NUMBL are linked to the NOTCH pathway.

In our study, a microsatellite in the coding region of *NUMBL* showed to be associated with SZ in two ethnically distinct populations. Analysis using SNPs derived from dbSNP (build 125) do not indicate the presence of non-synonymous SNPs on this gene and this polymorphic microsatellite appears to be the only common DNA polymorphism that leads to an alteration in the protein sequence of NUMBL. NUMBL has critical roles in the control of the number of neural progenitor cells during embryogenesis, although it is not clear the mechanism by which this occurs (promotion of neuronal differentiation or progenitor maintenance). Thus, malfunctioning of NUMBL has the potential to affect neurodevelopment. Until now, no association study has examined the putative impact of this *NUMBL* microsatellite polymorphism on susceptibility to any disease. Polyglutamine repeat expansions have been associated with several neurological diseases (Everett and Wood, 2004; Usdin and Grabczyk, 2000; Reddy and Housman, 1997) but no long expansions in this repeat could be observed with our experimental approach. After evaluating 2,186 alleles we found that the polyglutamine stretch of *NUMBL* varies from 14 to 20 glutamines and the allelic distribution does not follow a normal distribution pattern. Whereas 15Q and 16Q alleles could not be found, 2 alleles (18Q and 20Q) contributed to 99.6% isoforms. The remaining alleles (14Q, 17Q and 19Q) have a combined frequency of 0.4%. The 18Q allele and the 18Q

homozygous genotype seem to confer small but significant risk of developing schizophrenia. However, as schizophrenia is likely to be a polygenic disorder, it is expected that multiple genes of small effect, including *NUMBL*, may contribute to its etiology.

When patients and controls were evaluated, we observed a higher genetic heterogeneity in the Brazilian subjects when compared with the Danish samples. Five different *NUMBL* alleles were found among 400 Brazilians evaluated, whereas only three could be observed in 693 Danish samples. This is most likely due to the higher degree of ethnical admixture found in Brazil. However, no statistical differences could be observed when the allelic frequencies were compared between both groups (data not shown). Because the samples from Denmark included, besides schizophrenia, other disorders of the schizophrenic spectrum (36 patients classified as F22 or F25), we also compared the *NUMBL* genotype from these subgroups with Brazilian and Danish (F20) schizophrenics. However, no significant differences were found among the patient groups. In fact, our finding of allele18 or the 18/18 genotype showed to be more consistent when F22 and F25 patients were evaluated together with the SZ (data not shown). It is thus conceivable that the association with *NUMBL* is not specific for schizophrenia, but rather related to the vulnerability to schizophrenic spectrum disorders in general. The fact that the findings in the Brazilian samples could be replicated in the Danish set diagnosed with schizophrenia spectrum reinforces the veracity of this association, and suggests that our findings are unlikely to result from ethnical effects.

Our analysis shows a small but statistically significant association with one gene *NUMBL* and complementary finding with the 18 allele and with the 18-18 genotype. Haplotype analysis suggests that this microsatellite marker is located in a 33kb genomic block (between SNPs rs.7247247 and rs.12984927), which contains a large portion of the 3' end of *NUMBL*. While there are no other DNA alterations leading to aminoacid changes in this protein, we cannot rule out the possibility that non-coding or synonymous SNPs located in regulatory regions of this block could have functional effects that are involved with SZ.

A possible explanation for our findings is that this subtle alteration in *NUMBL* could have an effect over the differentiation of neuronal precursors. However, as expected for complex phenomena such as brain development and maturation, as well as for a complex disease such as SCZ, the simple presence of this alteration is

neither absolutely necessary nor sufficient to cause manifest illness. If this genetic alteration does indeed predispose to SCZ, its functional effect is likely to happen only under certain conditions, e.g. at a particular stage of brain development and maturation or in a specific brain region, and in an interplay with other subtle alterations in other genes. The demonstration of functional effects of genes of small effect, that act on complex pathways and underlie the majority of human disease, is an actual challenge that should be pursued but still waits for new technologies and for the broader comprehension of the gene network that is behind complex diseases.

6. Acknowledgements

This work was supported by Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). CK received a visiting grant (Aristides Pacheco Leão) from Academia Brasileira de Ciências (ABC). The authors acknowledge the collaboration of Genoa S.A. that allowed the use of some equipments necessary for this study.

7. References

- Altshuler, D., Brooks, L.D., Chakravarti, A., Collins, F.S., Daly, M.J., Donnelly, P. 2005. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T. et al. 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-881.
- Bailer, U., Leisch, F., Meszaros, K., Lenzinger, E., Willinger, U., Strobl, R. et al. 2000. Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia. *Neuropsychobiology* 42, 175-182.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21(2), 263-265
- Chiu, Y.F., McGrath, J.A., Thornquist, M.H., Wolyniec, P.S., Nestadt, G., Swartz, K.L. et al. 2002. Genetic heterogeneity in schizophrenia II: conditional analyses of affected schizophrenia sibling pairs provide evidence for an interaction between markers on chromosome 8p and 14q. *Mol. Psychiatry* 7, 658-664.
- Costa, R.M., Drew, C., Silva, A.J. 2005. Notch to remember. *Trends Neurosci.* 28, 429-435.
- De Bellard, M.E., Ching, W., Gossler, A., Bronner-Fraser, M. 2002. Disruption of segmental neural crest migration and ephrin expression in delta-1 null mice. *Dev. Biol.* 249, 121-130.
- Everett, C.M., Wood, N.W. 2004. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 127, 2385-2405.

- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., et al. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296(5576), 2225-2229.
- Gottesman, I.I., 1990. *Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness*. W.H. Freeman & Company, USA.
- Harrison, P.J. 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122, 593-624.
- Higuchi, M., Kiyama, H., Hayakawa, T., Hamada, Y., Tsujimoto, Y. 1995. Differential expression of Notch1 and Notch2 in developing and adult mouse brain. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 29, 263-272.
- Horton, S., Meredith, A., Richardson, J.A., Johnson, J.E. 1999. Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 355-369.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., Gossler, A. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717-721.
- Irvin, D.K., Zurcher, S.D., Nguyen, T., Weinmaster, G., Kornblum, H.I. 2001. Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J. Comp. Neurol.* 436, 167-181.
- Ito, H., Nakajima, A., Nomoto, H., Furukawa, S. 2003. Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1. *J. Neurosci. Res.* 71, 648-658.
- Jakobsen, K.D., Frederiksen, J.N., Hansen, T., Jansson, L.B., Parnas, J., Werge, T. 2005. Reliability of clinical ICD-10 schizophrenia diagnoses. *Nord. J. Psychiatry* 59, 209-212.
- Kiernan, A.E., Ahituv, N., Fuchs, H., Balling, R., Avraham, K.B., Steel, K.P. et al. 2001. The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3873-3878.
- Kim, S.K., Hebrok, M. 2001. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* 15, 111-127.
- Kitamoto, T., Takahashi, K., Takimoto, H., Tomizuka, K., Hayasaka, M., Tabira, T. et al. 2005. Functional redundancy of the Notch gene family during mouse embryogenesis: analysis of Notch gene expression in Notch3-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1154-1162.
- Kohn, Y., Lerer, B. 2002. Genetics of schizophrenia: a review of linkage findings. *Isr. J. Psych. Relat. Sci.* 39, 340-351.
- Kopan, R., Turner, D.L. 1996. The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 594-601.
- Lagas, P.A., Juvonen, V. 2001. Schizophrenia in a patient with cerebral autosomally dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL disease). *Nord. J. Psychiatry* 55, 41-42.
- Laitinen, J., Samarut, J., Holtta, E. 1994. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques* 17, 316-322.
- Lewis, C.M., Levinson, D.F., Wise, L.H., DeLisi, L.E., Straub, R.E., Hovatta, I., et al. 2003. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am. J. Human Genetics* 73(1), 34-48.
- Li, H.S., Wang, D., Shen, Q., Schonemann, M.D., Gorski, J.A., Jones, K.R., Temple, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N. 2003. Inactivation of Numb and Numlike in embryonic dorsal forebrain impairs neurogenesis and disrupts cortical morphogenesis. *Neuron* 40, 1105-1118.
- Macgregor, S., Visscher, P.M., Knott, S.A., Thomson, P., Porteous, D.J., Millar, J.K. et al. 2004. A genome scan and follow-up study identify a bipolar disorder susceptibility locus on chromosome 1q42. *Mol. Psychiatry* 9, 1083-1090.
- McCarley, R.W., Wible, C.G., Frumin, M., Hirayasu, Y., Levitt, J.J., Fischer, I.A. et al. 1999. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 45, 1099-1119.

- McGuffin, P., Farmer, A., Harvey, I. 1991. A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 764-770.
- McGuffin, P., Tandon, K., Corsico, A. 2003. Linkage and association studies of schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.* 5, 121-127.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., Guillemot, F. 2001. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401-413.
- Petersen, P.H., Zou, K., Hwang, J.K., Jan, Y.N., Zhong, W. 2002 Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis. *Nature* 419, 929-934.
- Petersen, P.H., Zou, K., Krauss, S., Zhong, W. 2004. Continuing role for mouse Numb and Numbl in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 7, 803-811.
- Przemeck, G.K., Heinzmann, U., Beckers, J., Hrabe de Angelis, M. 2003. Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development* 130, 3-13.
- Reddy, P.S., Housman, D.E. 1997. The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 364-372.
- Roegiers, F., Jan, Y.N. 2004. Asymmetric cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16(2), 195-205.
- Sade, H., Krishna, S., Sarin, A. 2004. The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J. Biol. Chem.* 279, 2937-2944.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., Rakic, P. 1999. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286, 741-746.
- Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M., McCarley, R.W. 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 49, 1-52.
- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Hamada, Y., Hirai, H. 2002. Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 775-779.
- Solecki, D.J., Liu, X.L., Tomoda, T., Fang, Y., Hatten, M.E. 2001. Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* 31, 557-568.
- Usdin, K., Grabczyk, E. 2000. DNA repeat expansions and human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 914-931.
- Wang, Y., Chan, S.L., Miele, L., Yao, P.J., Mackes, J., Ingram, D.K. et al. 2004. Involvement of Notch signaling in hippocampal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 9458-9462.
- Yoon, K., Gaiano, N. 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat. Neurosci.* 8, 709-715.
- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G., Rubenstein, J.L. 2002. Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129, 5029-5040.
- Zhong, W., Feder, J.N., Jiang, M.M., Jan, L.Y., Jan, Y.N. 1996. Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* 17, 43-53.
- Zhong, W., Jiang, M.M., Schonemann, M.D., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Jan, L.Y., Jan, Y.N. 2000. Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6844-6849.
- Zilian, O., Saner, C., Hagedorn, L., Lee, H.Y., Sauberli, E., Suter, U., Sommer, L., Aguet, M. 2001. Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates. *Curr. Biol.* 11, 494-501.

LEGEND OF FIGURE 1

Figure 1: Proteins of Notch pathway, with an emphasis in those coded by the genes studied here. Notch proteins are cleaved by γ -secretase, after interacting with Jagged2, and release its intracellular domain (NICD). NICD enters the cell nucleus, where it forms a complex with CBF1 and other proteins, and promotes the transcription of targets such as *Hes1* and *Hes5*. These proteins antagonize proneural genes, such as *ASCL1*, consequently inhibiting neuronal differentiation. NUMB and NUMBL proteins have generally been considered negative regulators of NOTCH, and promoters of neuronal differentiation. However, animal models with mutations in these genes suggested their essential role in the maintenance of neural progenitor cells. This figure has been modified and adapted from Yoon and Gaiano (2005).

Table 1: List of candidate genes, polymorphisms, primers and probes (prb) used.

Gene symbol	Gene name	Genomic mapping	Polymorphism	Primers (F and R) and probes (prb)	dbSNP code
<i>ASCL1</i>	Achaete-scute complex-like 1	12q22-q23	CAG (polyQ) microsatellite	ASCLF 5'GCATGGAAAGCTCTGCCAAGATGGAG3' ASCLR 5'CTTGACTTGCTTGGGCGCTGACTTGT3	-
<i>JAG2</i>	Jagged 2	14q32	G/A SNP (GLU502LYS)	JAG2F 5'AGGGCATCAACTGCCATATC3' JAG2R 5'CTGCCCTACAGCTCCCAGAG3' JAG2SNAP 5'GCGAGCTGGAACGAGAC3' NOTCH2F 5'CCAGGACACTGCCAGCAT3'	rs.105774
<i>NOTCH2</i>	Notch homolog 2 (<i>D. melanogaster</i>)	1p13-p11	T/C SNP (ILE197THR)	NOTCH2R 5'GCACTGGCACTGGTAGGAA3' NOTCH2-prbA 5'AGGCAGGTGCCACC3' NOTCH2-prbB 5'AGGCAGATGCCACC3' NOTCH3F 5'CTGGCAGTCCCAGGACATG3'	rs8002
<i>NOTCH3</i>	Notch homolog 3 (<i>D. melanogaster</i>)	19p13.2-p13.1	T/C SNP (VAL2223ALA)	NOTCH3R 5'AGGAAGCGGGCCTTTGG3' NOTCH3-prbA 5'CCCAGCCACCGGGTA3' NOTCH3-prbB 5'CCAGCCCGCGGGTA3' NUMBF 5'AGGACCTAGAGGGCTTTCG3'	rs.1044009
<i>NUMB</i>	Numb homolog (<i>D. melanogaster</i>)	14q24.3	C/A SNP (THR232ASN)	NUMBR 5'AGGAAAACCTCGGAAAGAGC3' NUMBSNAP 5'AAAAAAGCATCAGAAGTAGGAGAG3'	rs.1050477
<i>NUMBL</i>	Numb homolog -like (<i>D. melanogaster</i>)	19q13.13-q13.2	CAG (polyQ) microsatellite	NUMBLF 5'GGACACCTTCAGAGGCTGAG3' NUMBLR 5'GCAGGAACACGGCCACTTG3'	-

Table 2: Frequency of JAG2, NOTCH2, NOTCH3, ASCL1 genotypes in Brazilian controls and schizophrenics.

Genes	Controls	Frequency (%)	Schizophrenics	Frequency (%)	Chi-square results
N	200		200		
JAG2					
GG	45	22.5	34	17.0	Genotypes: p=0.294, $\chi^2=2.44$ Alleles: p=0.136, $\chi^2=2.22$
GA	105	52.5	106	53.0	
AA	50	25.0	60	30.0	
NOTCH2					
TT	136	68.0	141	70.5	Genotypes: p=0.778, $\chi^2=0.50$ Alleles: p=0.705, $\chi^2=0.14$
TC	59	29.5	53	26.5	
CC	5	2.5	6	3.0	
NOTCH3					
TT	87	43.5	79	39.5	Genotypes: p=0.535, $\chi^2=1.25$ Alleles: p=0.270, $\chi^2=1.22$
TC	88	44.0	89	44.5	
CC	25	12.5	32	16.0	
ASCL1					
5,13	0	0.0	1	0.5	Genotypes: p=0.852, $\chi^2=0.32$ Alleles: p=0.404, $\chi^2=1.81$
6,13	1	0.5	0	0.0	
7,12	1	0.5	1	0.5	
8,12	1	0.5	0	0.0	
9,12	3	1.5	1	0.5	
9,13	1	0.5	1	0.5	
10,13	1	0.5	1	0.5	
11,12	1	0.5	4	2.0	
11,13	0	0.0	1	0.5	
12,12	86	43.0	81	40.5	
12,13	67	33.5	68	34.0	
12,14	6	3.0	6	3.0	
12,15	4	2.0	6	3.0	
12,16	0	0.0	2	1.0	
12,19	1	0.5	0	0.0	
13,13	10	5.0	18	9.0	
13,14	7	3.5	2	1.0	
13,15	5	2.5	4	2.0	
13,16	0	0.0	1	0.5	
13,17	0	0.0	1	0.5	
14,14	4	2.0	0	0.0	
14,15	0	0.0	1	0.5	
15,15	1	0.5	0	0.0	

For the ASCL1 and NUMBL polymorphisms genotypes are displayed for number of CAG (Q) repeats.

Table 3: Allelic and genotype frequencies for the NUMBL CAG (Q)n microsatellite polymorphism in controls and cases from Brazil (BR), Denmark (DK) and both populations combined.

	BR controls (%)	BR cases (%)	DK controls (%)	DK cases (%)
Alleles				
14	3 (0.7)	1 (0.3)	1 (0.1)	1 (0.1)
17	1 (0.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
18	246 (61.4)	280 (70)	416 (60.6)	458 (65.5)
19	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0)	0 (0)
20	149 (37.3)	118 (29.4)	269 (39.3)	241 (34.4)
Total	400 (100)	400 (100)	686 (100)	700 (100)
All alleles:				
Chi-square	p=0.099, x2=7.80		p=0.181, x2=3.41	
results	Allele 18 vs others:		Allele 18 vs others:	
	p=0.011, x2=6.41		p=0.065, x2=3.40	
Genotypes				
14 , 18	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
14 , 20	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.3)	1 (0.3)
17 , 18	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
18 , 18	75 (37.5)	100 (50)	123 (35.8)	150 (42.9)
18 , 20	94 (47)	80 (40)	170 (49.6)	158 (45.1)
19 , 20	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)
20 , 20	26 (13)	18 (9)	49 (14.3)	41 (11.7)
Total	200 (100)	200 (100)	343 (100)	350 (100)
All genotypes:				
Chi-square	p=0.165, x2=9.15		p=0.289, x2=3.75	
results	Genotype 18,18 vs		Genotype 18,18 vs	
	others: p=0.012, x2=6.35		others: p=0.059, x2=3.55	
Alleles and Genotypes are displayed as number of CAG repeats				

ANEXO III

**Alterations in genes involved in neurodevelopment may
be associated with brain morphometric changes of schizophrenia:
preliminary evidence**

Authors: Sheila Passos Gregório^{a,b}, Paulo Clemente Sallet^a, Wagner Farid Gattaz^a,
Emmanuel Dias-Neto^{a*}

a: Laboratory of Neurosciences (LIM-27), Department and Institute of Psychiatry, Faculty of
Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

b: Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo,
Brazil

Corresponding Author:

Emmanuel Dias-Neto, e-mail: emmanuel@usp.br

Postal Address: Lab. of Neurosciences (LIM-27), Instituto de Psiquiatria

Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo

R. Dr. Ovidio Pires de Campos, 785 –3º andar- Consolação -05403-010, São Paulo, SP,

BRAZIL, Phone 00 55 11 3069.7267, FAX 00 55 11 3069.8011

Abstract

Abnormality in neurodevelopment is one of the most robust etiologic hypotheses in Schizophrenia (SZ). There is also strong evidence that genetic factors may influence abnormal neurodevelopment in the disease. The present study evaluated in SZ patients the possible association between structural brain measures, obtained by Magnetic Resonance Imaging (MRI), and 32 DNA polymorphisms, located in 30 genes related to neurogenesis and brain development.

DNA was extracted from peripheral blood cells of 25 schizophrenic patients from which brain structural data were obtained by MRI. Genotyping was performed using diverse procedures and putative associations were evaluated by using SPSS and Bonferroni correction. For RELN, a protease that guides neurons in the developing brain and underlies neurotransmission and synaptic plasticity in adults, an association was found for a nonsynonymous polymorphism (Val997Leu) and left ventricular enlargement ($p < 0.044$). A putative association was also found between PCDH12, a cell adhesion molecule involved in axonal guidance and synaptic specificity, and cortical folding (asymmetry coefficient of gyrification index) ($p = 0.008$). Although our results are preliminary, due to the small number of individuals analyzed, the findings are promising, revealing new candidate genes that should be more deeply studied for their involvement with brain development and schizophrenia.

Key Words: Polymorphisms, MRI, SNPs, brain morphometry, reelin, PCDH12.

1. Introduction

There is consistent evidence that schizophrenia (SZ) is a neurodevelopmental disorder. A number of twin and family studies point to a genetic basis for SZ, involving several genes and in many chromosomal regions (Kohn & Lerer, 2002; McGuffin et al., 2003), in conformity with complex-polygenic diseases. It has been suggested that nearly 30% of the human genes are expressed in the brain, being many of them regulated during stages of brain development (Kozlovsky et al., 2002). Many of these genes are located in chromosomal loci associated with SZ and are potential candidate genes due to their polymorphic status in the population and/or to events that alter their expression during embryonic stages, which might result in the putative neurodevelopmental abnormalities seen in the disease. On the other hand, macroscopic abnormalities such as ventricular enlargement, volume reductions of prefrontal cortex and hippocampus and generalized brain reduction, among many other features, are well-documented and consistent findings (McCarley et al., 1999; Shenton et al., 2001). In addition, significant alterations in neuron size and morphology, as well as synaptic connectivity, have also been reported in SZ (Harrison, 1999). It is interesting to note that some brain abnormalities, such as ventricular enlargement, follow a single normal distribution (Daniel et al., 1991; Sallet et al., 2003b), indicating that structural pathology is not restricted to a subgroup but is present to a degree in all cases.

The association of gene polymorphisms and brain structural or physiological abnormalities in SZ has been a field of intense activity in the last years (Egan et al., 2001; Rujescu et al., 2002; Szeszko et al., 2003; Callicott et al., 2005; Ho et al., 2005; Papiol et al., 2005; Prasad et al., 2005; Szeszko et al., 2005) but a vast population of genes still needs to be evaluated for a better understanding of how the genetic alterations can influence brain morphogenesis. In the present study we analyzed 32 polymorphisms located in 30 genes related to processes such as neurogenesis, synaptogenesis, brain symmetry, neuronal differentiation and migration. Many of these genes are mapped to chromosomal regions previously associated with SZ (Table 1). Associations of these genes and brain-structure differences were investigated in a set of 25 schizophrenic patients. This is the first study of 27 of these 32 polymorphisms and the first time that 24 of these 30 genes were evaluated in SZ.

2. Methods

2.1 Patients

Twenty-five schizophrenic patients were recruited at the Institute of Psychiatry, Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. Diagnoses were made through structured interviews (SCIDP) based on DSM-IV criteria (First et al., 1996). Written informed consent was obtained from all participants after explanation of study protocols and purposes. The study was previously approved by the ethics committee of the institution. Detailed demographic data of the patients are described in table 2. Current symptom severity was measured using the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) (Kay et al., 1987) and the Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) (Overall & Gorham, 1962). Handedness was assessed with the Handedness Inventory (Briggs & Nebes, 1975). One experienced psychiatrist, blind to the MRI results, obtained all clinical ratings.

2.2 MRI acquisition and measurements

Structural MRI scans of the entire brain were obtained using a 1.5 T Philips Gyroscan S15-ACS scanner, with T1-FFE weighed continuous coronal slices 1.2 mm thick, FOV=240, matrix=256x256. Coronal images were oriented in planes perpendicular to the anterior-posterior commissural axis. Images were transferred to a SUN Workstation and measurements were manually performed using the software Gyroview—HR 2.1 that also permitted reconstruction in axial and sagittal planes. Regions of interest were chosen based on structures frequently described in the literature as altered in SZ, totalizing 10 measures. Special focus was given to alterations of ventricular, hippocampus and planum temporale volumes, and to an index of cortical folding (gyrification index). Details regarding anatomic landmarks and reliability analysis can be seen elsewhere (Sallet et al., 2003a; Sallet et al., 2003b). An asymmetry coefficient between hemispheres for the gyrification index was calculated using the algorithm: $AC = [(Right - Left) / 0.5 \times (Right + Left)] \times 1000$. Positive values indicate rightward asymmetry; negative values indicate leftward asymmetry.

The ventricular-brain ratio (VBR) was obtained for each hemisphere using the algorithm: $VBR = \text{ventricular volume} / \text{brain volume} \times 100$. Measurements performed in the coronal plane: hippocampus and planum temporale were taken at every 1.2-mm continuous slice; and ventricles and brain volumes at a distance of 3.6 mm. Volumes were calculated multiplying the sum of areas by the thickness of slices. Absolute values were corrected using the algorithm: $\text{corrected values} = \text{absolute value} \times \text{brain volume} / 1000$.

To ensure consistent delineation, all measurements were taken by the same operator (P.C.S) while two other investigators carried out a number of measurements

necessary to assess interrater reliability, which was evaluated by means of intraclass correlation coefficient (ICC): Right & Left Hippocampus (ICC= 0.85), R & L Planum Temporale (ICC= 0.87), R & L VBR (ICC= 0.98), R & L Gyrification Index (ICC= 0.85). Reported ICC values were evaluated as described by (Bartko & Carpenter, 1976).

2.3 Candidate gene/polymorphisms selection

For candidate gene selection, an initial list of genes involved in neurodevelopmental processes in human or model organisms was prepared by searching public databases, such as “Gene Ontology” (<http://www.geneontology.org/>) and “Entrez Gene” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>), as well as a literature review. Genes were mapped to human chromosomes using BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) and coordinates were crossed with genomic loci previously described in the literature as associated with SZ, generating a refined candidate-gene list. The genes selected are involved in key processes such as synaptogenesis, synaptic plasticity and synaptic modulation, regulation of cell differentiation and determination of cellular fate, bilateral symmetry, neuronal migration, genesis of brain ventricles, axonal guidance, regeneration and repair of the CNS and neurotransmission. Polymorphism search for each gene and *in silico* validation were performed using bioinformatic tools such as BLAST against genomic DNA, mRNA or expressed sequence tags (ESTs) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), as well as searches in the literature and in single nucleotide polymorphism (SNP) databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Genes and polymorphisms selected for this study are detailed on Table 1. From the 32 polymorphisms selected for this study, only the SNP for the *WNT7* and the CAA insertion in the 3'UTR of *NOGO* are less likely to have functional consequences. The remaining polymorphisms have stronger potential for functional consequences, as most are non-synonymous SNPs or SNPs located in putative promoter regions.

2.4 DNA extraction and genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of schizophrenic patients, according to salting-out methods for protein precipitation and DNA isolation (Laitinen et al., 1994). Due to the diversity of the DNA polymorphisms investigated here, different approaches were used for genotyping: 1) Standard polymerase chain reaction (PCR) followed by single-base sequencing reactions (SnapShot Multiplex Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA), electrophoresis in an ABI3100 automatic sequencer (Applied Biosystems) and analysis with GeneScan (Applied Biosystems); 2) PCR followed by standard sequencing reactions (Big Dye Terminator Kit, Applied Biosystems), electrophoresis in the ABI3100 and analysis with the softwares SeqAnalysis (Applied Biosystems) and SIP (Scylla Bioinformatics, Campinas, SP, Brazil); 3) Real-time PCR using a regular pair of primers and fluorescent allele specific

probes (Applied Biosystems) evaluated in an ABI7300 Real Time machine (Applied Biosystems) or 4) PCR followed by digestion of the resulting fragment with restriction enzymes (PCR-RFLP), followed by analysis in 1% ethidium bromide stained agarose gels or 8% silver-stained polyacrilamide gels (Sanguinetti et al., 1994). In order to check the reliability of the genotyping methods used here either sampling replicates were done, or more than one method was used to genotype the same polymorphism for some samples. For genotyping the PCDH κ cluster deletion and NOGO CAA 3'UTR insertion, PCR products were evaluated by PCR followed by gel analysis as described by (Gregorio et al., 2005). A complete list of primers and probes used here, as well as the genes genotyped by each protocol are provided in the supplementary tables accompanying this paper.

2.5 Data analysis

Analysis of association between distinct genotypes and brain morphometry differences were assessed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS - 13.0, 2004). First, t-test or ANOVA evaluations were performed for each gene at a time, against the ten morphometric measures evaluated, and genes that presented associations showing $P < 0.01$ (cut-off value adopted to reduce type I errors) were investigated by mean of multivariate General Linear Model analysis. This multivariate GLM was controlled for demographic variables (age, gender, education and handedness), with one single polymorphism being used as fixed factor and the 10 morphometric measurements being used as dependent variables. Finally, this multivariate GLM was performed with posthoc Bonferroni correction. After the correction, associations with $p < 0.05$ were considered as significant.

3. Results

All SNPs selected for this analysis could be confirmed in this small group of individuals, suggesting their relative abundance. The consistency of the genotyping methods used here was investigated by replicates and cross-tests, and showed to be of 100%. After crossing the polymorphic status of 32 polymorphisms and their frequency according to the brain morphometry data, statistically significant associations were observed for two genes. The *RELN* polymorphism (C/G-Val997Leu) was associated to three different ventricle measures (Table 3). In our population we found 19 individuals with the homozygous CC genotype and 6 heterozygous CG. When compared to CG individuals, CC subjects showed higher measures for right VBR (2.18 ± 0.72 versus 1.33 ± 0.23 , t-test result: $p < 0.001$) and total VBR (2.31 ± 0.86 versus 1.43 ± 0.26 , t-test result: $p = 0.001$), and for left VBR a tendency for significant association was observed (2.45 ± 1.07 versus 1.53 ± 0.32 , t-test result: $p = 0.058$).

However, after GLM analysis, only the left VBR showed to be associated with RELN genotype ($p=0.044$). Unfortunately, GG individuals for this SNP were not found among the 25 individuals tested. The SNP mapped in the *PCDH12* gene (G/A- Ser640Asn) was associated with the asymmetry coefficient of the gyrification index (ACGI) (Table 4). A rightward ACGI, ($p=0.008$) was found in heterozygous GA individuals. For this gene, in the population studied, we found 20 individuals with the homozygous GG genotype ($ACGI = 0.0048 \pm 0.032$) and 5 GA subjects ($ACGI = 0.052 \pm 0.033$). Association remained the same after GLM analysis ($p=0.008$). In our population, alterations in planum temporale and hippocampus measurements could not be associated with any of the polymorphisms studied here.

4. Discussion

The morphogenesis of the central nervous system is a complex phenomenon that involves sequential molecular events and a plethora of genes regulated in a highly coordinated process. The rational basis of this work was to evaluate the morphological brain alterations found in SZ, in the light of the polymorphic status of neurogenesis-related genes preferentially mapped to genomic loci hypothetically associated with the disease. This is one of the largest sets of SNPs evaluated for the same group of SZ patients, and to our knowledge, this is the first study that compares such a number of polymorphisms with brain morphometry data. Here we provide evidence for promising candidate genes that may modulate brain development and warrant larger studies.

After evaluating 32 genetic polymorphisms, our analysis indicates 2 SNPs possibly associated with some of the most consistent morphological alterations observed in SZ patients. Using the statistical criteria adopted here, the *RELN* polymorphism (C/G-Val997Leu) could be associated with ventricular abnormalities. Previous studies showed that RELN mRNA and protein levels are reduced by approximately 50% in various cortical structures of postmortem brain from patients diagnosed with schizophrenia or bipolar illness with psychosis (Fatemi et al., 2001a; Eastwood & Harrison, 2003) as well as in the serum of schizophrenic patients (Fatemi, 2001), which is in line with the recent findings of an increased methylation of the promoter region of the gene in SZ (Grayson et al., 2005). However, the studies related to *RELN* gene polymorphism and SZ are not abundant (Akahane et al., 2002; Goldberger et al., 2005) and do not cover the entire variation panel of the gene nor its haplotype blocks. In a population and familial association study of a RELN polymorphism (a CGG repeat in the 5'UTR of the gene) and SZ, Goldberger et al. (2005) found that patients who responded to antipsychotics had a higher frequency of both the (CGG)(10) allele and (CGG)(10)-containing genotypes ($P = 0.02$; $P = 0.006$, respectively), illustrating the value of studying patient groups stratified by drug response or by endophenotypes. The

RELN SNP studied here, has not been investigated by other groups yet. It leads to a conservative Val/Leu substitution in the aminoacid 997 that, according to the present findings, may have an involvement with ventricular enlargement observed in SZ.

A second finding was the putative association of a non-synonymous *PCDH12* polymorphism (that leads to a Ser/Asn substitution at aminoacid 640, located in the cadherin 6 domain) and the asymmetry coefficient of the gyrification index (ACGI), a measurement that reflects the degree of cortical differentiation (Zilles et al., 1988). In 2002, Crow discussed the possible involvement of a pair of protocadherins, mapped to human sexual chromosomes, with the brain anatomical asymmetry (Crow, 2002). However, this group showed later that no sequence variation in the coding regions or in intronic sequences of these genes could be associated with psychosis within affected families (Giouze et al., 2004). Thus, we believe it is possible that other members of this same gene family, mapped to regions relevant to SZ, could be associated with brain asymmetry seen in SZ. The *PCDH12* gene belongs to the protocadherin gene cluster, a large family composed of 53 members, clustered at chromosome 5q31 (Wu & Maniatis, 1999), a locus previously implicated with SZ (Schwab et al., 1997; Sklar et al., 2004). Protocadherin (PCDH) genes are highly expressed in the CNS and their function on the synaptic remodeling has been demonstrated. In fact, it is believed that PCDHs are responsible for determining the genetic basis of the synaptic specificity during brain development and memory formation (Hiltschmann et al., 2001) and distinct neurons seem to express distinct members of the PCDH gene cluster (Esumi et al., 2005). The involvement of PCDH genes in neurodevelopment is solid, and *PCDH12* may be important for the development of specific brain areas.

Our study also does not provide data for a control group, so it is not clear if the results

shown here are related to brain structural variations seen in schizophrenia or if they could also be involved with brain morphological variations seen in control brains in general. On the other hand, ventricular enlargement is one of the most robust findings among the structural abnormalities observed in the brain of schizophrenic patients, and rightward coefficient of gyrification index was a finding obtained in a study with the same patients (reported in Sallet et al., 2003a) evaluated here. Further studies including normal individuals should be performed to overcome this limitation and to evaluate if these gene polymorphisms are also involved in the physiological variation of brain structures observed in control populations.

The study of molecular-neuroanatomy of schizophrenia is a new and promising field.

Recent reports have been published trying to identify genetic markers associated with the brain alterations seen in SZ (Prasad et al., 2005; Papiol et al., 2005; Callicott et al., 2005; Szesko et al., 2005; Ho et al., 2005), however, the reduced availability of patients with existing MRI data still limits the conclusions of most of them. In the present study we investigated the relationship between genes related to brain development and NMR parameters within a sample of SZ patients. From the 30 genes and 32 polymorphisms investigated here, two showed significant associations with NMR parameters, which are of interest for SZ. Both SNPs result in aminoacid changes in the coded proteins, making them attractive candidates for functional effects over the coded proteins; however, no direct evidences that these SNPs are really functional are available.

We believe that the strategy adopted here may be useful for further studies investigating the genetic bases of brain structural abnormalities in schizophrenia. Obviously, the present findings must be seen with caution in face of our small sample size and further studies in larger samples, are needed to confirm these initial findings.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS). The authors thank Dr. Helio Elkis and Dr. Mario Louzã for their help in providing the infrastructure used for recruiting the patients studied here.

Table 1: List of candidate genes and polymorphisms selected for analysis.

ENTREZ		DESCRIPTION	FUNCTION	GENOMIC MAPPING	POLYMORPHISM	dbSNP
NAME	GENE CODE					CODE (only for SNPs)
ADAM15	8751	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 15 (metargidin)	cell adhesion; neurogenesis	1q21.3	SNP C/A (THR191LYS)	rs6427128
ADAM22	53616	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 22	cell adhesion; neurogenesis	7q21	SNP C/G (ARG81PRO)	rs2279542
ADAM28	10863	A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 28	cell adhesion; neurogenesis	8p21.2	SNP A/G (ILE684MET)	rs7829965
ADAMTS4	9507	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, 4	cell adhesion; neurogenesis	1q21-q23	SNP G/A (ARG626GLN)	rs4233367
AKT1	207	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	neurogenesis	14q32.32	SNP1: C/T (intron 5) SNP2: C/T (intergenic)	SNP1: rs3730358 SNP2: rs2498784
ASPM	259266	ASP (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (<i>D. melanogaster</i>)	cell cortex development	1q31	SNP A/C (ILE2657LEU)	rs3762271
BDNF	627	Brain-Derived Neurotrophic Factor	neurodevelopment, maintenance, synaptic remodeling, neuroprotection	11p13	SNP G/A (VAL66MET)	rs6265
FLNB	2317	Filamin B, beta	neural cytoarchitecture	3p14.3	SNP A/G (ASN1157ASP)	rs1131356
FZD3	7976	Frizzled homolog 3 (<i>D. melanogaster</i>)	WNT proteins receptor, involved in tissue development, specially in the CNS	8p21	SNP C/T (promoter region)	rs7836920
JAG2	3714	Jagged 2	Notch protein ligand	14q32	SNP G/A (GLU502LYS)	rs1057744
MAP1B	4131	Microtubule-associated protein 1B	axonal development	5q13	SNP G/A (VAL468ILE)	rs1866374
NEFH	4744	Neurofilament, heavy polypeptide 200kDA	neurofilaments	22q12.2	SNP C/A (ALA805GLU)	rs165602
NOGO/ RTN4	57142	Reticulon 4	modulator of neurite growth	2p14-p13	CAA 3'UTR insertion	N.A.
NOTCH2	4853	Notch homolog 2 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	cell differentiation during development of tissues; neuritogenesis; body symmetry regulator	1p13-p11	SNP T/C (ILE197THR)	rs8002
NOTCH3	4854	Notch homolog 3 (<i>D. melanogaster</i>)	cell differentiation during development of tissues	19p13.2-p13.1	SNP T/C (VAL2223ALA)	rs1044009

<i>NRG1</i>	3084	Neuregulin 1	modulation of synaptic plasticity; activation of neurotransmitter expression	8p21-p12	SNP A/G (GLN38ARG)	rs3924333
<i>NRP1</i>	8829	Neuropilin 1	semaphorin ligand	10p12	A/G (ILE733VAL)	rs2228638
<i>NUDT6 /FGF2</i>	11162	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type	neuroectodermal development	4q26	G/A (Arg209Gln)	rs1048201
<i>PCDH3a</i>	56145	Protocadherin alpha 3	definition of synaptic specificity of the neuronal network	5q31	SNP T332G (promoter region)	rs3756340
<i>PCDH12</i>	51294	Protocadherin 12	definition of synaptic specificity of the neuronal network	5q31	SNP G/A (SER640ASN)	rs164515
<i>PCDHB11</i>	56125	Protocadherin Beta 11	definition of synaptic specificity of the neuronal network	5q31	SNP G/A (ARG7HIS)	rs917535
<i>PCDH a CLUSTER</i>	X	Protocadherin a cluster (PCDHa8 a PCDHa10)	definition of synaptic specificity of the neuronal network	5q31	16.7Kb deletion	N.A.
<i>PPT1</i>	5538	Palmitoyl-protein thioesterase 1	synaptic modulation	1p32	SNP C/T (THR134ILE)	rs1800205
<i>RELN</i>	5649	Reelin	neural migration and signalization	7Q22	SNP C/G (VAL997LEU)	rs362691
<i>SEMA3D</i>	223117	Semaphorin 3D	axonal growth and synaptic connectivity maintenance	7q21.12	SNP C/A (GLN340LYS)	rs7800072
<i>SEMA6C</i>	10500	Semaphorin 6C	axonal growth and synaptic connectivity maintenance	1q21.2	SNP C/A (PRO455THR)	rs4971007
<i>SIM1</i>	6492	Single-minded homolog 1 (<i>D. melanogaster</i>)	synaptic modulation	6q16.3-q21	SNP1: T/C (VAL371ALA) SNP2: A/C (THR352PRO)	SNP1: rs3734355 SNP2: 3734354
<i>SMPD1</i>	6609	Sphingomyelin Phosphodiesterase 1	sphingomyelin processing	11p15.4-p15.1	SNP G/A (GLY/ARG)	N.A.
<i>WIF1</i>	11197	WNT Inhibitory Factor 1	WNT protein inhibitor.	12q13.13	SNP G/A (ALA27VAL)	N.A.
<i>WNT7A</i>	7476	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	tissue development and maintenance; cell fate; synaptogenesis	3p25	SNP G/C (2nd Intron)	N.A.

N.A. – Not available

Table 2: Demographic and clinical characteristics of SZ patients who underwent MRI scans for measurements of brain structures.

Characteristic	Schizophrenic Patients (n=25)	
	N	%
Gender		
Male	15	60
Female	10	40
Handedness		
Right	24	96
Left	1	4
	Mean	SD
Age (years)	34,6	7,6
Education (years)	8,5	3,7
Duration of Illness (years)	15,7	9,3
Age of onset of psychosis (years)	18,3	5,5
Positive and Negative Syndrome Scale score	55,7	19,9
BPRS score	14,7	10,2
Negative Symptom Rating Scale score	13,9	9,5

SD: standard deviation

Table 3: Associations observed between the *RELN* polymorphism and brain ventricular measures.

Gene	Measures of Ventricles		
	Left VBR	Right VBR	Total VBR
<i>RELN</i>			
CC (n=19)	2,45±1,07	2,18±0,72	2,31±0,86
CG (n=6)	1,53±0,32	1,33±0,23	1,43±0,26
<i>P value obtained for T-test</i>	0.052	0.001	0.001
<i>P value obtained for GLM</i>	0.044	0.129	0.076

VBR: ventricular-brain ratio.

Table 4: Associations observed for the *PCDH12* SNP and Gyrification index measures.

Gene	GI measures		
	RGI	LGI	ACGI
<i>PCDH12</i>			
GG (n=20)	2.447 ± 0.175	2.434 ± 0.162	0,0048±0,032
GA (n=5)	2.594 ± 0.129	2.465± 0.155	0,052±0,033
<i>P value obtained for T-test</i>	0.702	0.092	0.008*
<i>P value obtained for GLM</i>	0.132	0.967	0,008*

GI: Gyrification index; LGI: left GI; RGI: right GI; ACGI: asymmetry coefficient of the GI. Significant associations