

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Estudio genético de asociación de polimorfismos de riesgo en dos patologías psiquiátricas: esquizofrenia y trastorno bipolar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Ramón Dávila Píriz

Directores

Israel Ampuero Sánchez
Francisco Arias Horcajadas
José Antonio Ramos Atance

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III



**ESTUDIO GENÉTICO DE ASOCIACIÓN DE
POLIMORFISMOS DE RIESGO EN DOS
PATOLOGÍAS PSIQUIÁTRICAS:
ESQUIZOFRENIA Y TRASTORNO BIPOLAR.**

TESIS DOCTORAL

José Ramón Dávila Píriz

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Israel Ampuero Sánchez

Dr. Francisco Arias Horcajadas

Dr. José Antonio Ramos Atance

MADRID, 2014

“Nada en Biología tiene sentido si no es a la luz de la Evolución”.

Theodosius G. Dobzhansky, 1973.

*A mis padres,
a mi hermano,
a Clara,
a toda mi familia.*

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera mostrar mi más sentido agradecimiento a todos aquellos que contribuyeron, de una u otra manera, a que este proyecto fuera posible. En primer lugar, y muy especialmente, a mis directores de tesis, los doctores José Antonio Ramos, Francisco Arias e Israel Ampuero, por la confianza depositada y por compartir conmigo su tiempo, experiencia y conocimiento.

A José Luis Santos y Eva María Sánchez, que impulsaron enormemente las expectativas con la muestra de pacientes aportada y con la ilusión demostrada. A Justo García de Yébenes por permitirme, generosamente, desarrollar esta investigación en su laboratorio y también a M^{ra} Ángeles Mena por ser ejemplo de esfuerzo y compromiso científico. A Carmen Rodríguez por el tiempo dedicado y la verdadera ayuda prestada en la parte más árida del trabajo. A Raquel Ros por sus aportaciones, siempre oportunas, a mi aprendizaje. A las personas que contribuyeron al diagnóstico y reclutamiento de la muestra: Enriqueta Ochoa, Estrella Salvador, Dolores Baño, Margarita Agujetas, Diego Urgeles, Carmen Tosio, Rocío Molina y Angela Domenech.

A Israel Ampuero, impulsor y artífice de este viaje, al que deseo mostrar no sólo mi eterna gratitud sino mi respeto y admiración, como director, como científico y como persona. Este ha sido un largo camino del que pocos conocen ni conocerán su dificultad, pero he tenido la fortuna de encontrar un referente de amistad, compañerismo e integridad sin el cual ningún esfuerzo hubiera hecho posible que este objetivo llegara a alcanzarse.

De nuevo, mi más sincera gratitud a todos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
2. ESQUIZOFRENIA Y TRASTORNO BIPOLAR	7
2.1 ESQUIZOFRENIA.....	7
2.1.1. DEFINICIÓN Y SÍNTOMAS.....	7
2.1.2. ALTERACIONES NEUROANATÓMICAS Y NEUROFUNCIONALES.....	8
2.1.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	10
2.1.4. TRATAMIENTO.....	12
2.2. TRASTORNO BIPOLAR.....	13
2.2.1. DEFINICIÓN Y SÍNTOMAS.....	13
2.2.2. ALTERACIONES NEUROANATÓMICAS Y NEUROFUNCIONALES.....	14
2.2.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	15
2.2.4. TRATAMIENTO.....	16
2.3. TRASTORNO POR USO DE SUSTANCIAS LA ESQUIZOFRENIA Y EL TRASTORNO BIPOLAR: PATOLOGÍA DUAL.....	17
2.3.1. DEFINICIÓN DE PATOLOGÍA DUAL.....	17
2.3.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	18
2.3.3. HIPÓTESIS RELATIVAS A LA PATOLOGÍA DUAL.....	18
2.3.4. TRATAMIENTO.....	19
3. LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN EN LOS TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS	20
3.1. SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	20
3.1.1. VIÁS DOPAMINÉRGICAS.....	22
3.1.2. SÍNTESIS DE DOPAMINA.....	23
3.1.2.1. TIROSINA HIDROSILASA (TH).....	23
3.1.2.2. DOPA-DESCARBOXILASA (DDC).....	24

3.1.3. INACTIVACIÓN DE LA DOPAMINA.....	24
3.1.3.1. CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT).....	24
3.1.3.2. MONOAMINOXIADAS (MAOs).....	26
3.1.4. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.....	27
3.1.4.1. RECEPTORES D1-LIKE.....	28
3.1.4.2. RECEPTORES D2-LIKE.....	28
3.1.5. TRASPORTADOR DE DOPAMINA.....	30
3.1.6. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN LAS ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS.....	30
3.1.6.1. ESQUIZOFRENIA.....	30
3.1.6.2. TRASTORNO BIPOLAR.....	33
3.1.6.3. PATOLOGÍA DUAL.....	34
3.2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.....	36
3.2.1. SÍNTESIS ENDOCANNABINOIDE.....	37
3.2.1.1. SÍNTESIS DE ANANDAMIDA (AEA).....	37
3.2.1.2. SÍNTESIS DE 2-ARAQUIDONIL GLICEROL (2-AG).....	37
3.2.2. INACTIVACIÓN ENDOCANNABINOIDE.....	38
3.2.2.1. AMIDO HIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS (FAAH).....	38
3.2.2.2. MONOACILGLICEROL LIPASA (MGLL / MAGL).....	39
3.2.3. RECEPTORES CANNABINOIDES.....	39
3.2.3.1. RECEPTOR DE CANNABINOIDES TIPO I (CB1).....	39
3.2.3.2. RECEPTOR DE CANNABINOIDES TIPO II (CB2).....	40
3.2.3.3. OTROS RECEPTORES DE CANNABINOIDES.....	41
3.2.4. TRASPORTADOR DE ENDOCANNABINOIDES.....	42
3.2.5. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LOS TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS.....	42
3.2.5.1. ESQUIZOFRENIA.....	43
3.2.5.2. TRASTORNO BIPOLAR.....	45
3.2.5.3. PATOLOGÍA DUAL.....	46
3.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	47

3.3.1. SÍNTESIS E INACTIVACIÓN DEL GLUTAMATO.....	47
3.3.2. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	48
3.3.2.1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS.....	48
3.3.2.2. RECEPTORES METABOTRÓPICOS.....	49
3.3.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN LAS ENFERMEDADES PSQUIÁTRICAS.....	51
3.3.3.1. ESQUIZOFRENIA.....	51
3.3.3.2. TRASTORNO BIPOLAR.....	52
3.3.3.3. PATOLOGÍA DUAL.....	53
4. ESTUDIOS GENÉTICOS EN ESQUIZOFRENIA Y TRASTORNO BIPOLAR.....	54
4.1. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN.....	61
4.2. GENOME WIDE ASSOCIATION STUDY (GWAS).....	63
4.3. ESTUDIOS DE LIGAMIENTO.....	64
4.4. ESTUDIOS DE TRÍOS: CASO-PROGENITORES (TCP).....	66
4.5. GENÉTICA DE POBLACIONES.....	67
4.5.1. EL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.....	67
4.5.2. DESVIACIONES DEL EQUILIBRIO.....	68
4.5.3. CONFLICTO SEXUAL INTRALOCUS.....	69
5. GENES Y POLIMORFISMOS INCLUIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO.....	70
5.1. COMT / rs4680.....	70
5.2. MAO-A / rs6323.....	72
5.3. MAO-B / rs1799836.....	73
5.4. FAAH / rs324420.....	74
5.5. CNR1 / (AAT)n - rs137998297.....	76
5.6. CNR2 / rs35761398.....	78
5.7. GRM3 / rs1468412.....	79
OBJETIVOS.....	81
1. ANTECEDENTES.....	83
2. OBJETIVOS GENERALES.....	83
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	84

MATERIAL Y MÉTODOS	85
1. PARTICIPANTES DEL ESTUDIO	87
1.1. POBLACIÓN CONTROL.....	87
1.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA.....	87
1.3. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR.....	88
1.4. POBLACIÓN DE CONSUMIDORES CON TRASTORNO POR USO DE SUSTANCIAS SIN TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS MAYORES.....	88
2. EXTRACCIÓN DE ADN	88
3. DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS	90
3.1. POLIMORFISMO rs4680 EN EL GEN COMT.....	90
3.2. POLIMORFISMO rs6323 EN EL GEN MAO-A.....	92
3.3. POLIMORFISMO rs1799836 EN EL GEN MAO-B.....	94
3.4. POLIMORFISMO (AAT) _n EN EL GEN CNR1.....	96
3.5. POLIMORFISMO rs35761398 EN EL GEN CNR2.....	101
3.6. POLIMORFISMO rs324420 EN EL GEN FAAH.....	106
3.7. POLIMORFISMO rs1468412 EN EL GEN GRM3.....	107
4. SECUENCIACIÓN	109
4.1. LAVADO DEL PRODUCTO DE PCR.....	109
4.2. REALIZACIÓN DE PCR CON dNTPs TERMINADORES.....	109
4.3. LAVADO DE LOS RESTOS DE LOS TERMINADORES Y CARGA.....	110
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	111
5.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	111
5.2. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.....	112
RESULTADOS	113
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DEL ESTUDIO	115
2. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN LA POBLACIÓN CONTROL	116
2.1. DIFERENCIAS EN LAS FRECUENCIAS DEL POLIMORFISMO rs4680 ENTRE LA POBLACIÓN CONTROL MASCULINA Y FEMENINA.....	119

3. RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN PACIENTES.....	121
3.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.....	121
3.2. POBLACIÓN CON PSICOSIS DUAL.....	124
3.3. POBLACIÓN CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.....	126
3.4. COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS DEL POLIMORFISMO rs4680 ENTRE LAS POBLACIONES DEL ESTUDIO.....	127
3.5. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	128
4. RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN PACIENTES.....	132
4.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.....	132
4.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON PSICOSIS DUAL.....	134
4.3. POBLACIÓN DE CONSUMIDORES CON TRASTORNO POR USO DE SUSTANCIAS.....	137
4.4. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.....	139
4.5. COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL POLIMORFISMO DE TIPO MICROSATÉLISTE (AAT) _n EN EL GEN CRN1.....	141
4.6. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN POBLACIÓN CON PSICOSIS DUAL.....	143
4.7. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES COMT Y CNR2 EN POBLACIÓN CON PSICOSIS DUAL.....	145
5. RESULTADOS DEL POLIMORFISMO rs1468412 DEL GEN GRM3.....	148
5.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.....	148
5.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON PSICOSIS DUAL.....	149
5.3. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.....	150
5.4. CORRELACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS rs4680 Y rs1468412.....	152
6. ANALISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y LA EDAD DE INICIO (EDAD DEL DIAGNÓSTICO).....	155
6.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.....	156

6.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON PSICOSIS DUAL.....	159
6.3. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.....	161
DISCUSIÓN	163
1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN GENES DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.	165
2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN EL GEN GRM3.....	177
3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS EN GENES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.....	182
4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE ASOCIACION DEL GENOTIPO Y LA EDAD DE INICIO.....	188
5. CONSIDERACIONES FINALES.....	190
CONCLUSIONES	193
ABSTRACT	197
BIBLIOGRAFÍA	203
ANEXOS	241

ABREVIATURAS

2-AG:	2 - Araquidonil glicerol.
3-MT:	3 - Metoxitiramina.
5-HT:	5 - Hidroxitriptamina (serotonina).
A:	Adenina.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AEA:	Araquidonil etanolamida.
AMPA:	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico.
AMPc:	Adenosín 3',5'-Monofosfato cíclico.
ANOVA:	Análisis de la varianza.
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero.
BH₄:	Tetrahidrobiopterina.
C:	Citosina.
CB1:	Receptor de cannabinoides tipo 1.
CB2:	Receptor de cannabinoides tipo 2.
CIE-10:	Clasificación internacional de las enfermedades, 10ª Edición.
CNR1:	Gen del receptor de cannabinoides tipo 1.
CNR2:	Gen del receptor de cannabinoides de tipo 2.
COMT:	Catecol-O-metiltransferasa.
D(1 a 5):	Receptores de dopamina 1 a 5.
DA:	3,4-Dihidroxifeniletilamina (Dopamina).
DAT:	Recaptador/Transportador de dopamina.
DDC:	L-Aminoácido aromático descarboxilasa.
dNTPs:	Desoxinucleótidos trifosfato.
DSM-IV:	Diagnostic and statistical manual of mental disorders (IV).
EAAT(1 a 5)	Transportador de amino ácidos excitatorios 1 a 5.
ECA:	Epidemiological Catchment Area Study.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
FAAH:	Amidohidrolasa de ácidos grasos.
FABP5:	Proteína de unión a ácidos grasos 5.
FABP7:	Proteína de unión a ácidos grasos 6.
G:	Guanina.
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico.
GBD:	Global Burden of disease.
GMP_c:	Guanosín monofosfato cíclico.

GRM3:	Gen del receptor metabotrópico de glutamato 3.
GWAS:	Genome wide association study.
HVA:	Ácido homovalínico.
HW:	Hardy-Weinberg.
IASC:	Intralocus sexual conflict.
IRS:	Inhibición del reflejo del sobresalto.
LCR:	Líquido cefalorraquídeo.
L-DOPA:	L-Dihidroxifenilalanina.
LSD:	Dietilamida de ácido lisérgico.
MAO:	Monoamino oxidasa.
MGLL:	Monoacilglicerol lipasa.
mGluR(1 a 7):	Receptores metabotrópicos del glutamato 1 a 7.
MNV:	Multiple nucleotide variation.
NCBI:	National Center for Biotechnology Information.
NMDA:	N-metil-D-aspartato.
OR:	Odds ratio.
PCP:	Fenilciclohexilpiperidina (Fenciclidina).
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PELM:	Potencia evocado de latencia media.
PPI:	Inhibición por prepulso.
RMN:	Resonancia magnética nuclear.
SEC:	Sistema cannabinoide endógeno (endocannabinoide).
SGV:	Short genetic variation.
SNC:	Sistema nervioso central.
SNP:	Single nucleotide polymorphism.
SNP:	Sistema nervioso periférico.
SNV:	Single nucleotide variation.
SSCP:	Single strand conformation polymorphism.
STR:	Short tandem Repeat.
T:	Timina.
TAC	Tomografía axial computerizada.
TAE:	Buffer Tris-ácido acético-EDTA.
TDAH	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad.
TE:	Buffer Tris-EDTA.
TH:	Tirosina Hidroxilasa.
TUS:	Trastorno por uso de sustancias.
Δ^9-THC:	Δ^9 - Tetrahidrocannabinol.

Introducción.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

La esquizofrenia y el trastorno bipolar son consideradas, actualmente, dos de las enfermedades psiquiátricas más importantes, tanto por su elevada prevalencia dentro de la población como por ser ambas altamente incapacitantes. Los trastornos mentales graves son conocidos desde antiguo en la historia de la humanidad, sin embargo, la concepción de la esquizofrenia y del trastorno bipolar como entidades nosológicas diferenciadas es relativamente moderna. Ambas son debidas a Emil Kraepelin, quien utilizó para ellas los términos “demencia precoz” y “enajenación maníaco-depresiva” respectivamente (Jablensky, 2010; Angst, 2002).

Las primeras aproximaciones sistemáticas a estas enfermedades comenzaron a mediados del siglo XIX con las investigaciones de Karl Ludwig Kahlbaum, Ewald Hecker y Bénédicte Morel. Posteriormente, Kraepelin reuniría los diferentes trabajos realizando con ello una reclasificación desde su propia experiencia e investigación. Así pues, redefine el término “demencia precoz”, utilizado con anterioridad, y agrupa bajo esta denominación a patologías que estaban separadas hasta ese momento. Es, conjuntamente, el precursor de la línea de pensamiento por la cual empieza a considerarse que estos síndromes tienen un sustrato fisiológico y, además, es el primero en señalar la posible existencia de causas hereditarias. De forma similar, aunque ya habían aparecido históricamente descripciones de casos que se ajustaban a un cuadro clínico de trastorno bipolar, es también Kraepelin en 1896 y 1899 (en la quinta y sexta edición de su obra *Compendium der Psychiatrie*) quien lo enuncia como un trastorno independiente al que denomina “enajenación maníaco-depresiva” y también “perturbación afectiva”.

El término esquizofrenia (del griego; schizein (σχίζειν) escindir y phrēn (φρήν) inteligencia) aparece ya en el año 1908 acuñado por Paul Eugene Bleuler, quien se refiere a la patología en plural, “esquizofrenias”, quedando así establecida desde el comienzo la cuestión de si la esquizofrenia es una única enfermedad con diferentes desarrollos posibles o un conjunto de patologías relacionadas. Finalmente, el término “bipolar” llegaría en 1950, introducido por Karl Leonhard, aunque no es hasta 1980 que se utiliza por primera vez la denominación “trastorno bipolar” dentro del *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, en su tercera edición (DSM-III).

Desde el inicio de las investigaciones sistemáticas en estas patologías, la observación de cierta acumulación de casos familiares fundamentó la hipótesis de la existencia de factores heredables implicados en su origen. Así han parecido

confirmarlo los estudios de heredabilidad, los cuales muestran un riesgo incrementado de padecer ambas enfermedades en función de que se posean antecedentes familiares (Gottesman, 1991). Es este incremento el que pone de manifiesto la existencia de un componente genético y el que ha justificado los estudios que buscan determinar los genes implicados. Aunque estos factores aún no son bien comprendidos, existen, no obstante, diferentes teorías propuestas que pueden englobarse en un modelo genérico actualmente aceptado. Este modelo considera la existencia de unos factores de riesgo determinados genéticamente que establecerían una predisposición, es decir, una probabilidad mayor de desarrollar esquizofrenia o trastorno bipolar respecto a la población general (Porteous, 2008). El componente genético estaría en interacción con elementos de tipo ambiental de muy diverso tipo y acción, entre los que se han propuesto (para la esquizofrenia): infecciones tempranas, reacciones autoinmunitarias, toxinas, lesiones traumáticas y estrés. El conjunto de interacciones entre los distintos elementos estaría incidiendo sobre el desarrollo neurológico normal produciendo alteraciones y, por consiguiente, los síntomas característicos de cada trastorno (Lewis & Lieberman, 2000).

Los tratamientos utilizados han aportado una vía de investigación importante en la búsqueda por comprender la naturaleza de estas enfermedades psiquiátricas (Howes & Kapur, 2009). El primer fármaco con capacidad antipsicótica fue la clorpromacina a principios de la década de los años cincuenta, al que poco después seguiría la reserpina (Snyder, 1981). Ambos compuestos tienen estructuras químicas diferentes pero poseen una actividad similar, apareciendo los efectos después de que el paciente haya estado medicado durante dos o tres semanas. Dicha actividad se fundamenta en su capacidad para bloquear los receptores de dopamina. Paralelamente a los efectos terapéuticos comienzan los efectos secundarios que se asemejan a los síntomas de la enfermedad de Parkinson: temblores en reposo, rigidez muscular y disminución general de los movimientos voluntarios, lo que sirvió en su momento de base para establecer la vinculación entre las vías dopaminérgicas y la esquizofrenia. Por otra parte, el estudio de sustancias como la anfetamina (Jones et al., 1998) y la cocaína (Everitt & Robbins, 2005), que en ocasiones producen síntomas psicotomiméticos, demostraba la capacidad de éstas para producir un aumento de la acción monoaminérgica, entre ellas la de la dopamina. Esto consolidaba la hipótesis que relacionaba a este neurotransmisor con la patología.

Sobre estos datos se construyó la teoría dopaminérgica, la cual, en su versión clásica, suponía que una hiperfunción de las vías o rutas dopaminérgicas era la responsable de la etiología de la enfermedad. Sin embargo, en las últimas décadas,

esta teoría ha demostrado ser insuficiente para explicar todos los hallazgos y las evidencias recogidas (Howes & Kapur, 2009). Ha podido constatar, por ejemplo, la hipofunción dopaminérgica en las vías mesocorticales; a lo que debe añadirse la evidencia que muestra la participación de otros neurotransmisores, como la serotonina o el glutamato, en el desarrollo de los síntomas. Surgen así nuevas teorías dopaminérgicas que engloban tanto la hiperfunción como la hipofunción y que contienen, además, conceptos como el de rango de tolerancia y sensibilización (Ashcorft et al., 1981; Palomo et al., 1985; Howes & Kapur, 2009). A su vez, en los modelos actuales, queda incluida la acción de las vías serotoninérgicas o glutamatérgicas, entre otras, ya sea que se las considere como fundamentales o como vías de regulación de la primera.

En cuanto al trastorno bipolar, está incluido dentro de los trastornos del estado de ánimo y se caracteriza por presentar episodios de depresión y episodios de manía alternados, es decir, oscilaciones anormalmente intensas (Leibenluft, 2012). Los estudios familiares de los trastornos afectivos indican que existe un mayor componente de heredabilidad que en la esquizofrenia (Cardno & Gottesman, 2000), especialmente en los casos de inicio temprano, por lo que también se ha abordado su estudio desde la perspectiva de la investigación genética.

Las teorías que buscan explicar los mecanismos y las causas de la patología, de forma similar a lo que sucede en esquizofrenia, se sustentan en gran medida en las observaciones realizadas a partir del tratamiento suministrado con diferentes fármacos (Geddes & Miklowitz, 2013). Así pues, la teoría monoaminérgica, que explica los episodios de depresión como un estado de hipoactividad de las vías serotoninérgicas y noradrenérgicas, se fundamenta en el hecho de que algunos fármacos antidepresivos, como la iproniacida, tienen actividad inhibidora de la monoaminoxidasa. Este fármaco es, por lo tanto, un agonista de las monoaminas, dado que al evitar que sean metabolizadas por las enzimas monoaminoxidasa A y B, éstas pueden producir un efecto más prolongado sobre los receptores. Sin embargo, el trastorno bipolar se caracteriza por episodios de polaridad opuesta y, por consiguiente, otras teorías diferentes son necesarias para explicar las oscilaciones características. En este sentido, se valoran cuestiones tales como la participación de otros sistemas y la importancia de la regulación de los mismos.

Finalmente, debe destacarse la elevada presencia de trastornos por uso de sustancias (TUS) en los pacientes psiquiátricos. Algunos estudios epidemiológicos, como el *Epidemiological Catchment Area Study* (ECA) de 1990 (Regier et al., 1990), estiman que el 47% de los pacientes con esquizofrenia y el 56% de los pacientes con

trastorno bipolar presentará un TUS en algún momento. Esta situación comórbida ha sido objeto de diversas aproximaciones experimentales y teorías que intentan explicar la evidencia epidemiológica (Westermeyer, 2006). Uno de los aspectos más discutidos es su propia consideración como trastorno independiente. Hasta el momento, permanece considerado como una situación de coexistencia de dos trastornos diferentes en un mismo paciente. De este modo, el término patología dual, utilizado para definir el estado comórbido, no sería un término clínico estricto, sino un término práctico para denominar a un subgrupo de pacientes que además de presentar una patología psiquiátrica primaria presenta también un trastorno por uso de sustancias.

En general, los síndromes psiquiátricos son considerados enfermedades complejas a muy distintos niveles, tanto es su origen causal como en los factores que intervienen en su desarrollo. Así pues, se establece que las interacciones constantes entre los diferentes factores crearían complejidad en el diagnóstico, en el pronóstico y en el establecimiento de un tratamiento adecuado (O'Donovan et al., 2009).

Los estudios genéticos si bien han aportado ciertos elementos nuevos de comprensión, también han añadido sus propias incertidumbres y niveles de complejidad. En este sentido, podrían destacarse dos aspectos importantes y fundamentales: por un lado la dificultad existente para reproducir los resultados entre distintos trabajos de investigación y, en segundo lugar, el hecho de que muchos de los genes que evidencian asociación son comunes para diversas patologías, incluidas aquellas que estaban definidas como entidades claramente diferenciadas.

Como consecuencia de este solapamiento en genes y polimorfismos, es habitual que la esquizofrenia y el trastorno bipolar se estudien conjuntamente, segregando a su vez las poblaciones por el tipo de consumo, con el fin de determinar cuáles de los factores de riesgo genético son compartidos entre las distintas patologías y cuáles son particulares; lo cual, podría ayudar a comprender los mecanismos de desarrollo de los diferentes cuadros clínicos.

2. ESQUIZOFRENIA Y TRASTORNO BIPOLAR.

2.1. ESQUIZOFRENIA

2.1.1. DEFINICIÓN Y SÍNTOMAS.

La esquizofrenia es una patología grave de tipo psicótico que generalmente presenta un carácter crónico (DSM-IV-TR). El término “psicótico”, en su definición más restrictiva, implica la presencia de ideas delirantes y alucinaciones manifiestas sin que la persona tenga conciencia de la naturaleza patológica de las mismas. No obstante, la definición del término “psicótico”, así como su clasificación y dimensionalidad, no ha alcanzado un consenso universal (Peralta & Cuesta, 2007), existiendo definiciones más amplias que permiten abarcar otros síntomas frecuentes.

La esquizofrenia y los trastornos relacionados van a caracterizarse, por lo tanto, por un amplio espectro de síntomas, estando el diagnóstico condicionado por su presencia y por su permanencia en el tiempo. Históricamente, han existido diferentes clasificaciones que han ido cambiando y evolucionando en su concepción (Jablensky, 2010). Actualmente, se ha establecido un modelo de clasificación que sustituye las categorías por dimensiones (Salokangas, 2003). Estos síntomas aparecen reflejados en el Criterio A del DSM-IV-TR. De este modo, existirían dos dimensiones diferentes para los tradicionalmente llamados síntomas positivos (conceptualizados como un exceso o distorsión de funciones); estas dos dimensiones serían la “dimensión psicótica”, en la cual se incluirían los delirios (Criterio A1) y las alucinaciones (Criterio A2), y la “dimensión de desorganización”, en la cual entraría el lenguaje desorganizado (Criterio A3) y el comportamiento catatónico o gravemente desorganizado (Criterio A4). La tercera dimensión sería aquella que abarca los síntomas negativos (disminución o pérdida de funciones, Criterio A5): aplanamiento afectivo, alogia (pobreza del habla) y abulia (incapacidad para iniciar y persistir en actividades dirigidas a un fin). Por otra parte, el 13 de mayo de 2013 se publicó la quinta edición del DSM con ciertas modificaciones que no afectan prácticamente al capítulo de esquizofrenia, aunque sí se introducen cambios en la sección de consumo de sustancias. Conjuntamente a la caracterización de los síntomas, el diagnóstico incluye los criterios de duración (Criterio C) y de disfunción social/laboral (Criterio B).

De este modo, el trastorno se caracteriza por presentar una gran heterogeneidad entre individuos, tanto en la sintomatología presente en el momento del diagnóstico como en el desarrollo posterior (Jansson & Parnas, 2007). Ninguno de los síntomas es patognomónico de la esquizofrenia, es decir, ninguno de ellos es

definitorio ni está presente en todos los pacientes, a lo cual debe añadirse que algunos pueden aparecer en otras enfermedades psiquiátricas.

De forma general se estima que la esquizofrenia comienza durante la adolescencia o durante los primeros años de la vida adulta, pero también se ha planteado la existencia de una fase prodrómica en la cual los primeros síntomas aparecerían en etapas tempranas de la infancia, fundamentalmente los síntomas negativos, aunque no se reciba atención clínica o tratamiento (Häfner et al., 1999). El inicio de la atención clínica sucede con un episodio psicótico en forma aguda en el 50% de los casos (Ciompi, 1980). Desde ese momento, va a existir una alternancia entre las fases agudas (crisis) y las fases de estabilización (postcrisis), pudiendo aparecer también fases estables o de mantenimiento, con ausencia de síntomas o con una persistencia de formas atenuadas. Generalmente, se considera que la remisión de la enfermedad es infrecuente, ya sea ésta total o parcial. Sin embargo, algunos trabajos han propuesto la revisión y unificación de los criterios clínicos para determinar y valorar el porcentaje de pacientes que experimenta recuperación de los síntomas (Lambert et al., 2010). Así pues, aunque existe un rango muy amplio entre los estudios consultados, en la revisión de Lambert et al. se estima que en torno a un 30% de pacientes evoluciona hacia cierto grado de remisión.

El diagnóstico de esquizofrenia, consecuentemente, se basa en la evaluación, caracterización y estudio de la sintomatología del paciente, es decir, en la determinación del cuadro clínico. No existen, por lo tanto, pruebas orgánicas que sean definitivas o que ayuden a establecer el diagnóstico. En coherencia con ello, los subtipos de esquizofrenia se definen según la sintomatología predominante.

El segundo conjunto de criterios diagnósticos (recomendado por la OMS) está recogido en la Clasificación Internacional de las Enfermedades, actualmente en su décima edición (CIE-10, 1992). Entre ambos manuales existen ciertas diferencias, tanto en los criterios diagnósticos como en la clasificación. Los subtipos de esquizofrenia en el DSM-V son: paranoide, desorganizada, catatónica, indiferenciada y residual. En el CIE-10 son: paranoide, hebefrénica, catatónica, indiferenciada, depresión postesquizofrenia, residual, simple y esquizofrenia sin especificación.

2.1.2. ALTERACIONES NEUROANATÓMICAS Y NEUROFUNCIONALES.

Múltiples y diversos estudios se han realizado a lo largo de los últimos años para determinar las alteraciones que pudieran existir en el cerebro de los pacientes con esquizofrenia, tanto a nivel anatómico como fisiológico. Se ha buscado, además, que dichas alteraciones pudieran servir como base para explicar los síntomas de la

enfermedad (Cummings, 1995). Los estudios de neuroimagen (Cuevas-Esteban et al., 2011) tanto *post mortem* como *in vivo* mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y tomografía axial computerizada (TAC) dan como resultado la descripción de alteraciones de tipo difuso en algunas regiones (Frith & Dolan, 1998), indicándose con esto que no existen lesiones como tales, pero que sí pueden observarse reducciones en el volumen, pérdida de densidad de ciertas regiones, reducción en el número de neuronas y árboles dendríticos con una menor complejidad en comparación a los sujetos control (Cuevas-Esteban et al., 2011).

Entre estas anomalías se puede encontrar una corteza cerebral reducida (Harrison, 1999), principalmente en las áreas prefrontal (Lawrie & Abukmeil, 1998), cingular (Lennox et al., 2000; Salgado-Pineda et al., 2014) y temporal medial (Egan & Weinberger, 1997). También se aprecia en otros estudios una reducción significativa del área cerebelar (Shento et al., 2001), que ha sido asociada a los síntomas leves de las funciones motoras de algunos pacientes, en los que aparece cierto grado de descoordinación así como largos periodos de inmovilidad. Alteraciones similares han sido detectadas también en el bulbo olfatorio (Turetsky et al., 2000), el hipocampo (García-Martí et al., 2013) y en regiones parahipocampales y talámicas (Byne et al., 2001; Boos et al., 2007). Por otra parte, se observa que el volumen de los ventrículos cerebrales está aumentado (Boos et al., 2007).

En su conjunto, el modelo que progresivamente se ha elaborado con la integración de los diferentes trabajos implica a las regiones frontal (Salgado-Pineda et al., 2007), temporal (Zakzanis et al., 2000), talámica (Takahashi et al., 2004) y, en menor medida, cerebelosa (Nopoulos et al., 2001). Este modelo, aunque contempla distintas explicaciones que lo sustentan, en general, conceptualiza la esquizofrenia como un trastorno de la conectividad entre neuronas pertenecientes a los distintos circuitos neuronales enunciados (Ayalew et al., 2012; Lewis & Levitt, 2002), posiblemente como consecuencia de alteraciones en la neuroplasticidad (Balu & Coyle, 2011; Silverstein et al., 2013). Estas conexiones neuronales alteradas tendrían consecuencias sobre la funcionalidad, estando las etapas del neurodesarrollo fuertemente implicadas (Fatemi & Folsom, 2009). En esta concepción se integran, por consiguiente, múltiples procesos afectados (proliferación y migración celular, extensión axonal, mielinización, sinaptogénesis y apoptosis) como consecuencia de las interacciones entre los genes y múltiples factores ambientales en las etapas del desarrollo prenatal, de la infancia y de la adolescencia.

Una de las funciones más afectadas en la esquizofrenia es la que engloba a los procesos de percepción (Parwani et al., 2000). En este campo de estudio ha tenido

especial importancia la investigación de las alteraciones del potencial evocado de latencia media (PELM), la inhibición prepulso (PPI) y las ondas P50 y P300, todas ellas integrantes de la inhibición del reflejo del sobresalto (IRS) (Koch, 1999; Geyer et al., 2001; Santos et al., 2010; Sánchez-Morla et al., 2013). La intensidad de la inhibición del reflejo del sobresalto se ha establecido como una medida del correcto procesamiento de la información sensoriomotora (Ison & Hoffman, 1983), dado que una ausencia total o parcial de esta inhibición se ha vinculado al hecho de que los pacientes presenten dificultades para filtrar los estímulos irrelevantes (Braff et al., 2001; Jazbec et al., 2007). Las consecuencias de este déficit implicarían un flujo de información caótico por sobreestimulación y fragmentación cognitiva. La PPI está regulada en la corteza prefrontal, el hipocampo y el núcleo accumbens y su función se ve afectada por fármacos que interactúan con el sistema dopaminérgico y glutamatérgico (Swerdlow & Geyer, 1998). Es a su vez destacable que los familiares de pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, que no presentan a su vez la patología, poseen alteraciones en los componentes de la PPI (Cadenhead et al., 2000). Se evidencia, por lo tanto, que la IRS es un rasgo heredable, y por ello su estudio se ha constituido como un importante endofenotipo dentro de la investigación etiológica de la esquizofrenia.

2.1.3. EPIDEMIOLOGIA.

La realización de estudios epidemiológicos centrados en la esquizofrenia presenta diversos niveles de complejidad debido a la naturaleza multicausal de la enfermedad, a la propia definición de los síntomas y a lo amplio de su espectro (Rodríguez-Pulido & González de Rivera, 1993). También ha sido planteada la dificultad de la comparación entre los diferentes estudios a causa de la disparidad en el uso de los criterios diagnósticos, si bien existe una tendencia a corregir esta cuestión (Saha et al., 2005). Así, por ejemplo, el valor de prevalencia-vida habitualmente citado es de un 1% de la población a nivel mundial, no existiendo grandes variaciones entre países, regiones, culturas o etnias. La revisión sistematizada y el contraste de este valor con las evidencias mostradas en los estudios actualizados ha modificado profundamente esta perspectiva (Aleman et al., 2003; McGrath et al., 2004; Messias et al., 2007).

De este modo, la revisión realizada por Goldner et al. (2002) de la prevalencia y la incidencia a nivel internacional ofrecía una variación entre países muy amplia, indicando que la prevalencia en Nueva Zelanda era de un 0,4% (Wells et al., 1989) mientras que resultaba de un 2,2% en Finlandia (Lehtinen et al., 1990). Otros estudios,

han situado la prevalencia-vida en un 0,4% y la prevalencia puntual en un 0,46% a nivel mundial (Saha et al., 2005) también con amplias diferencias regionales.

Los resultados de la revisión de Messias et al. (2007) indican una prevalencia puntual de un 0,5% (5/1.000) y una prevalencia anual global que varía entre países y estudios en un rango de entre un 2,7/1.000 y un 8,3/1.000. Esta misma revisión muestra una incidencia anual para la esquizofrenia también con grandes variaciones, siendo la mínima de un 0,11/1.000 y la máxima de un 0,7/1.000.

La revisión realizada en población española por Ayuso-Mateos et al. (2006) reporta una incidencia anual de 3/1.000 en el caso de los hombres y 2,86/1.000 en el caso de las mujeres. Esta revisión se realiza siguiendo los criterios y metodología propuestos en el *Global Burden of Disease* (GBD) 2000 (López & Murray, 1998) a partir de los resultados ofrecidos por Vázquez-Barquero et al. (1995) en un estudio realizado en la población de Cantabria.

Otra de las revisiones que reúne gran número de estudios es la realizada por McGrath et al. (2004 y 2005), en la cual a partir de 158 estudios independientes en 33 países diferentes entre los años 1965 y 2001, se evalúa que el promedio anual (para un rango de edad de riesgo entre 15-54 años) es de 15,2 casos por cada 100.000 habitantes, siendo el rango de 7,7 a 43,0. Dentro de dicho rango los países desarrollados se encuentran en la zona de mayor incidencia y regionalmente es mayor en zonas urbanas que en zonas rurales.

También ha sido evidenciado una diferencia en prevalencia e incidencia entre la población masculina y femenina, presentando un ratio hombre/mujer de 1,42/1,00 (McGrath et al., 2004). Aunque la diferencia entre géneros es constante, también existen variaciones en los valores concretos ofrecidos por los distintos estudios. Así por ejemplo, en una investigación realizada en el Reino Unido, el ratio hombre/mujer resultó ser de 2,3/1,0 (Kirkbride et al., 2006). Otro estudio valora que el riesgo en hombres es entre un 30 y un 40 % superior al de mujeres (Aleman et al., 2003). De igual modo la edad de inicio de los síntomas clínicos es diferente en función del género, apareciendo en hombres a una edad más temprana, con medias en torno a 24 años en hombres y a 27 años en mujeres (Vázquez-Barquero et al., 1995).

En general, puede afirmarse que los estudios de prevalencia e incidencia muestran gran disparidad en los resultados obtenidos. Estas diferencias, además de las que puedan ser atribuibles a la metodología, evidencian que la epidemiología de la esquizofrenia presenta variaciones regionales y de género (Messias et al., 2007; McGrath, 2006).

2.1.4. TRATAMIENTO.

Aunque el tratamiento de los pacientes con esquizofrenia debe enfocarse desde diferentes ámbitos (social, familiar y clínico) conceptualizado como un tratamiento integral, el uso farmacológico resulta generalmente indispensable (Falkai et al., 2005 y 2006; Tajima et al., 2009). Los medicamentos se utilizan con varios objetivos. El primero es el tratamiento de los episodios psicóticos agudos, a continuación estaría la prevención de los episodios agudos una vez el paciente está estabilizado (Falkai et al., 2005). La principal herramienta farmacológica son los antipsicóticos, diferenciados entre los de primera generación (convencionales) y los antipsicóticos de segunda generación (atípicos).

Entre los antipsicóticos de primera generación autorizados en España (*Guía de Prescripción Terapéutica*, publicada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) pueden encontrarse los siguientes fármacos: clorpromazina, clotiapina, haloperidol, levomepromazina, perfenazina, periciazina, pimozida, tioproperazina, trifluoperazina y zuclopentixol. Están clasificados en tres grupos: los de alta potencia (e.g. el haloperidol), los de potencia intermedia (e.g. perfenazina) y los de baja potencia (e.g. clorpromazina).

En cuanto a la potencia, los estudios bioquímicos han determinado que está en función, principalmente, de su capacidad para unirse a los receptores dopaminérgicos D2 (Tajima et al., 2009). De igual modo, la potencia también indica su capacidad para causar efectos extrapiramidales, entre los que se encuentra el parkinsonismo inducido por medicamento (Casey, 1991; Chakos et al., 1992). Por último, es destacable que los antipsicóticos de primera generación presentan eficacia para suprimir los síntomas positivos (alucinaciones o delirios) pero son ineficaces paliando los síntomas negativos (apatía o embotamiento afectivo).

La *Guía de Prescripción Terapéutica* también indica los antipsicóticos de segunda generación actualmente autorizados: clozapina, asenapina, risperidona, olanzapina, paliperidona, sertindol, quetiapina, ziprasidona, amisulpride y aripiprazol. Este grupo de fármacos presentan una acción más eficaz respecto a los síntomas negativos y evitan los efectos extrapiramidales (pueden aparecer formas leves), si bien no están exentos de efectos adversos como pueden ser el síndrome metabólico, el aumento de peso y la hipotensión ortostática.

Ninguno de los fármacos actualmente utilizados carece de afinidad, al menos en cierto grado, por los receptores dopaminérgicos D2. No obstante, nuevos medicamentos con otras posibles vías de acción bioquímica han sido propuestos y son actualmente investigados. Entre ellos cabe destacar a los antagonistas selectivos del

receptor de cannabinoides CB1 (Guidali et al., 2011), los inhibidores de la recaptación de glicina para potenciar la transmisión glutamatérgica mediada por receptor NMDA (Menniti et al., 2013) o los agonistas de los receptores metabotrópicos mGluR2 y mGluR3 (Conn & Jones, 2009).

2.2. TRASTORNO BIPOLAR.

2.2.1. DEFINICIÓN Y SÍNTOMAS.

El trastorno bipolar es un trastorno psiquiátrico grave, caracterizado por la presencia de marcadas oscilaciones del estado de ánimo. Los extremos que definen dichas oscilaciones son los episodios de manía (o hipomanía en el caso de que sea leve) y los episodios de depresión. Existen, asimismo, los denominados episodios mixtos, en los cuales se solapan síntomas de manía y depresión (Goodwin & Jamison, 2007). En los pacientes también aparecen periodos de estabilidad denominados fases de eutimia. En estos periodos se da una remisión de los síntomas que, no obstante, no implica una remisión de la enfermedad (Sánchez-Moreno et al., 2009). Dentro del denominado “espectro bipolar” se distinguen distintas formas de la patología en función de los síntomas que predominen (Maina et al., 2007).

Se trata de un trastorno con una prevalencia muy elevada dentro de la población y suele aparecer durante la juventud, aunque puede presentarse a cualquier edad (Merikangas et al., 2011). El desarrollo de los síntomas a lo largo del tiempo es muy variable y puede manifestarse cierta sintomatología psicótica, congruente o no con el estado de ánimo (Judd et al., 2002; Winokur & Kadmas, 1989).

Consecuentemente, la sintomatología particular del trastorno bipolar estará en función del tipo de episodio en el que se encuentre el paciente en cada momento (DSM-IV-TR). En los episodios de manía pueden encontrarse algunos de estos síntomas: euforia, irritabilidad, grandiosidad, disminución de la necesidad de dormir, verborrea, pensamiento acelerado, dificultades de atención y concentración, aumento de la actividad, aumento de la sociabilidad, búsqueda excesiva de actividades placenteras y presencia de síntomas psicóticos. Los episodios de hipomanía comparten los síntomas de los episodios de manía, pero en una forma atenuada.

Los síntomas de un episodio depresivo pueden ser: sentimiento de extrema tristeza, incapacidad de experimentar placer, alteraciones del sueño, variaciones de peso corporal, fatiga, falta de energía, baja autoestima, falta de concentración, presencia de pensamientos de muerte y síntomas psicóticos.

Los episodios mixtos comparten características de manía y depresión, a veces alternándose rápidamente o siendo simultáneos. En muchas ocasiones este tipo de episodios conforman una fase de transición (Winokur & Kadrmaz, 1989). Las fases de eutimia, pese a la remisión de los síntomas, no suponen una mejora en la calidad de vida del paciente en una alta proporción de los casos (Ustün et al. 2000), habiendo sido determinado que en pacientes eutímicos persiste el déficit neurocognitivo (Sánchez-Morla et al., 2009).

En cuanto a su gravedad, se ha descrito una tasa de morbilidad y de mortalidad elevada para estos pacientes (Osby et al., 2001). La causa fundamental de la morbilidad sería el estilo de vida adquirido, mientras que la mortalidad se debería al riesgo de suicidio existente, en especial durante las fases depresivas o mixtas (Simpson & Jamison, 1999; Angst, 1995).

Aunque la heterogeneidad de la enfermedad es elevada, el cuadro típico contempla un episodio de manía, seguido de un episodio de depresión y un restablecimiento del equilibrio o eutimia que puede prolongarse más o menos en el tiempo (De Dios et al., 2010). Del mismo modo que sucede en la esquizofrenia, el diagnóstico del trastorno bipolar se fundamenta en la descripción del cuadro clínico que presenta el paciente, no existiendo, por lo tanto, una prueba de apoyo al diagnóstico de tipo bioquímico, radiológico, anatómico o fisiológico, salvo para descartar posibles causas orgánicas o consumo de sustancias. Los criterios de diagnóstico están recogidos en el DSM-V y en la Clasificación Internacional de las Enfermedades, actualmente en su décima edición (CIE-10). Dentro del DSM-V aparece en la sección general de los *Trastornos del estado de ánimo*, distinguiéndose (junto a otros) el trastorno bipolar de tipo I, de tipo II y el trastorno bipolar no especificado.

2.2.2. ALTERACIONES NEUROANATÓMICAS Y NEUROFUNCIONALES.

En comparación a la esquizofrenia, las alteraciones neuroanatómicas o estructurales en el trastorno bipolar son aún menos marcadas, por lo que en muchas de las investigaciones no se encuentran diferencias entre las muestras de pacientes y de controles en cuestiones como el volumen del córtex o de los ventrículos (Zimmerman et al. 2006). Sin embargo, en algunos estudios sí han podido encontrarse ciertas diferencias entre las muestras de pacientes y las de controles (Bremner et al. 2002; Bearden et al., 2008; Frazier et al., 2005). En estos trabajos, realizados sobre tejido *post mortem*, se hallaban alteraciones estructurales del hipocampo con reducción del mismo y alteraciones en los marcadores neuronales de

funcionalidad y plasticidad, detectados estos últimos por técnicas histoquímicas. Por otra parte, los ensayos utilizando la técnica de imagen por resonancia magnética funcional (RMNf) parecen revelar más claramente ciertas funcionalidades alteradas, especialmente las referidas a la conectividad entre áreas (Altshuler et al., 2005; Biswal et al., 1995).

Así pues, un estudio realizado con resonancia magnética funcional encontró que las conexiones entre la región del córtex prefrontal ventral y la amígdala eran diferentes entre pacientes e individuos control (Chepenik et al., 2010). De modo similar también encontraban que existía una conectividad interhemisférica desregulada.

En el trabajo de Keener et al. (2012) pudo determinarse que las regiones que se activan en el reconocimiento de las expresiones emocionales de rostros humanos tenían una respuesta reducida en pacientes, dado que respondían a los estímulos de manera significativamente menor a la de los individuos control. Estas áreas incluían el córtex cingulado ventral anterior, el córtex orbitofrontal y el estriado ventral. Congruentemente, el estudio de Mitsunaga et al. (2011) también encontraba una asociación entre el volumen del córtex cingulado y el trastorno bipolar en pacientes de pediatría.

También en el estudio del trastorno bipolar se ha abordado la investigación de la onda P50 en relación a la PPI. La alteración de esta onda, generada en el lóbulo temporal medio y en el hipocampo, es indicativa de que la función de filtrado sensorial está afectada de forma similar a lo que sucede en la esquizofrenia. Ha podido determinarse, por ejemplo, que los pacientes con trastorno bipolar en fase eutímica estable presentan una reducción del disparo de P50 (Sánchez-Morla et al., 2008).

2.2.3. EPIDEMIOLOGÍA.

El trastorno bipolar es un síndrome común. Presenta una prevalencia media de entre 0,5 y 1,6 % a lo largo de la vida, siendo diferente para cada uno de los subtipos (Kessler et al., 1997; Kessler et al., 2005). Algunos autores, sin embargo, estiman que la prevalencia-vida llega a alcanzar el 5,5% si se incluye la ciclotimia (Angst, 1995; Regeer et al., 2004). Aproximadamente la mitad de los pacientes comienza su patología con episodios depresivos, por lo que es habitual que reciban un diagnóstico de depresión mayor. Podrían existir, por lo tanto, desviaciones considerables en la estimación de la prevalencia exacta de la enfermedad (Judd et al., 2005). Por este motivo, entre otros, se ha propuesto que el diagnóstico de trastorno bipolar se realiza (como promedio general) con 10 años de retraso, por lo que las edades estimadas de aparición de entre 28 y 44 años estarían desplazadas.

En cuanto a las diferencias de género en prevalencia y edad de aparición existen discrepancias en función del estudio consultado. Así pues, el trabajo de Viguera et al. (2001) muestra un ratio femenino/masculino de 1,6 y una edad de diagnóstico en mujeres 3,2 años mayor. Sin embargo, la muestra reclutada por Almeida & Fenner (2002) confirma un ratio similar (1,5) pero no encuentra diferencias en la edad de inicio. Por otra parte, la aparición de formas precoces y de conductas antisociales está asociada al género masculino. Las mujeres, sin embargo, suelen iniciarse con episodios depresivos y presentan mayor número de recaídas de este tipo siendo su ciclación más rápida. Entre la población con trastorno bipolar el riesgo de suicidio es muy alto (15 veces superior al de la población general) y se estima que entre un 7 y un 15 % de los pacientes consuman el suicidio (Harris & Barraclough, 1997).

2.2.4. TRATAMIENTO.

El objetivo del tratamiento es conseguir reducir los episodios de manía (Cipriani et al., 2011), depresión (Gijsman et al., 2004) o mixtos, tanto en el tiempo de duración como en su intensidad, permitiendo que la fase de eutimia sea lo más prolongada posible (Geddes & Miklowitz, 2013). Dado el carácter cíclico del trastorno bipolar y la polaridad opuesta de los distintos tipos de episodio, se hace necesaria la combinación de diferentes fármacos (Grupo de trabajo de la GPC sobre el Trastorno Bipolar, 2012) siempre dentro de un marco de tratamiento integral en el cual deben coordinarse terapias de tipo psicológico, social y familiar.

La primera línea de tratamiento se centraría en los estabilizadores del ánimo, entre los que se encuentra el carbonato de litio y los anticonvulsivantes (e.g. valproato sódico o carbamacepina). El primero es útil tanto para los episodios de manía como para los depresivos, mientras que los anticonvulsivantes se utilizan en episodios de manía, en episodios mixtos o en pacientes de ciclado rápido. La acción molecular del carbonato de litio y del valproato sódico, pese a que han sido utilizados durante años, continúa sin estar completamente esclarecida (Chiu et al., 2013), si bien algunos de los efectos producidos indican los posibles mecanismos que sustentan su capacidad terapéutica. De este modo, se ha observado que el tratamiento con carbonato de litio produce un aumento del volumen del córtex cingulado anterior, contrarrestando así la reducción de volumen referida en pacientes no tratados (Sassi et al., 2004). Otros resultados muestran que los efectos estarían mediados por la acción del BDNF (de Sousa et al., 2011) y consecuentemente a ello se ha propuesto que el tratamiento produce efectos neurotróficos (Lyo et al. 2010). Los estudios centrados en los modos

de acción del valproato muestran, a su vez, una mejora en la señalización GABAérgica debida a una inhibición de las enzimas para su metabolización (Gould et al., 2004).

También para los episodios de manía pueden ser utilizados los antipsicóticos, de primera o de segunda generación, y de manera secundaria los ansiolíticos (Cipriani et al., 2011). Finalmente, se encontrarían los antidepresivos para los correspondientes episodios de depresión (Frye et al., 2011).

2.3. TRASTORNO POR USO DE SUSTANCIAS EN LA ESQUIZOFRENIA Y EL TRASTORNO BIPOLAR: PATOLOGÍA DUAL.

2.3.1. DEFINICIÓN DE PATOLOGÍA DUAL.

Existe una evidencia epidemiológica que vincula los trastornos psiquiátricos con los diferentes trastornos por uso de sustancias (TUS). Sin embargo, la situación comórbida, en la cual un paciente presenta ambos tipos de trastorno, no está definida actualmente como una entidad nosológica diferenciada (Compton et al., 2005).

En los últimos años ha aparecido el término patología dual para referirse a la situación clínica caracterizada por la presencia de una patología psiquiátrica primaria y un trastorno por uso de sustancias (Stowell, 1991), una vez que ha quedado descartado del diagnóstico la posibilidad de que el trastorno mental esté producido por un efecto psicoactivo del consumo o por la abstinencia (Nunes et al., 2006; Arias, 2009). El diagnóstico diferencial que distinga entre un trastorno mental inducido por el consumo de sustancias y una situación comórbida de las dos patologías, es decir, que el paciente presenta un trastorno psiquiátrico primario, es fundamental para confirmar una situación de patología dual (Arias, 2009). Dos son los criterios fundamentales. El primero sería establecer la secuencia temporal, es decir, determinar si ha aparecido antes el trastorno mental que el consumo. El segundo sería la comprobación de la persistencia de la patología psiquiátrica una vez retirado dicho consumo. El mayor problema que registra el primer criterio radica en el hecho de que habitualmente el promedio de edad de inicio en el consumo es menor a la edad de aparición tanto de la esquizofrenia como del trastorno bipolar (Batel, 2000), de manera que resulta complejo establecer con certeza la secuencia causal. En cuanto al segundo criterio se estima, por ejemplo, que en el 50% de los casos diagnosticados como trastorno psicótico inducido por cannabis los síntomas persisten una vez retirado el consumo, por lo que debe considerarse que el trastorno psiquiátrico es primario (Arendt et al., 2005).

2.3.2. EPIDEMIOLOGÍA.

La prevalencia de TUS en población de pacientes con un trastorno mental grave es extraordinariamente alta en comparación a la prevalencia del conjunto general de la población, si bien existen importantes variaciones en función del estudio consultado (Kessler, 2004; Arias et al., 2013). El valor aceptado para la prevalencia de TUS en esquizofrenia (psicosis dual) se cifra en torno al 50%, encontrándose estudios que dan un valor del 47% (Regier et al., 1990) mientras que en otros trabajos más recientes lo cifran en un 70% (Westermeyer, 2006). En el trastorno bipolar, el estudio de Regier et al. señalaba que la prevalencia de TUS era del 61% para el TB tipo I y del 48% para el TB de tipo II, aunque otros estudios han dado cifras aún mayores (Bauer et al., 2005). El perfil de consumo es similar en esquizofrenia y trastorno bipolar, siendo las sustancias consumidas más frecuentes el alcohol, el cannabis y la cocaína (Swartz et al., 2006; Regier et al. 1990).

Por otra parte, se ha determinado que existe un fuerte desequilibrio de género en la población de pacientes con patología dual, de modo que suelen ser de sexo masculino con predominancia de sintomatología positiva (Swartz et al., 2006; Talamo et al., 2006; Drapalski et al., 2011).

2.3.3. HIPÓTESIS RELATIVAS A LA PATOLOGÍA DUAL.

Se han planteado básicamente tres hipótesis para explicar la elevada frecuencia con la que se presenta una situación de coexistencia en un mismo paciente de un trastorno psiquiátrico y de un trastorno por uso de sustancias.

1- Base biológica común. En este modelo se postula que las alteraciones iniciales y causales son comunes a ambos tipos de patología, desarrollándose posteriormente de formas diferentes dependiendo de otros factores endógenos o ambientales (Extein & Gold, 1993). De este modo, una misma alteración bioquímica o neurofuncional podría dar origen a dos patologías distintas. Este modelo se fundamenta en los hallazgos que ponen de manifiesto que las áreas implicadas en la esquizofrenia o el trastorno bipolar son coincidentes con las que están involucradas en los mecanismos de refuerzo por consumo de sustancias (Volkow & Fowler, 2000; Chambers et al., 2001). Fundamentalmente estaría participando el sistema de recompensa con áreas de la corteza prefrontal, el hipotálamo lateral y el área tegmental ventral.

2- Trastorno psiquiátrico generado por consumo. El consumo de sustancias produciría alteraciones bioquímicas y neurofisiológicas que desencadenarían el

trastorno de tipo psiquiátrico (Álamo et al., 1999). Cabe destacar que en este apartado no se hace referencia a los trastornos mentales inducidos por el efecto tóxico del consumo o por la abstinencia, incluidos en el DSM-IV-TR o en el CIE-10. Por el contrario, se estaría suponiendo que el consumo a largo plazo produce cambios bioquímicos y moleculares, posiblemente como resultado de la respuesta compensatoria de adaptación al consumo de la sustancia exógena. Estos cambios podrían resultar irreversibles. Por consiguiente, este modelo conceptual sugiere que el consumo sería un desencadenante de la patología psiquiátrica. También se contempla que pueda existir una vulnerabilidad subyacente con la cual interacciona la sustancia, ya sea que el consumo actúe como desencadenante o como factor que agrava una patología previa. Una de las evidencias que apoya esta concepción es la constatación de que la población consumidora presenta una media de edad del primer brote significativamente menor (Leeson et al., 2012).

3- Automedicación. Esta hipótesis ha tomado relevancia a lo largo de los últimos años. Se considera en ella que los pacientes, por ensayo y error, encuentran a través del consumo de ciertas sustancias formas de paliar algunos de sus síntomas (Khantzian, 1997 y 2013). Estarían aquí implicados especialmente los síntomas negativos (Dixon et al., 1990). Algunos estudios muestran que los pacientes con esquizofrenia que no eran consumidores tenían peores resultados en su función cognitiva que los pacientes que sí presentaban consumo (Talamo et al., 2006; Potvin et al., 2005). No obstante, podrían existir explicaciones alternativas a este hecho.

Por último, debe considerarse que no es descartable que las tres hipótesis sean complementarias, y que cada una de ellas pueda explicar un subconjunto de los casos dentro de la población de pacientes que presentan una situación comórbida (Goswami, 2004).

2.3.4. TRATAMIENTO.

En el tratamiento del paciente de patología dual deben destacarse varios aspectos importantes. El primero es que el consumo puede interferir con la medicación, por lo que deben tenerse en cuenta las posibles interacciones (Mueser et al., 1992). Es por ello que el tratamiento tiene dos estrategias fundamentales: la primera, paliar los síntomas de esquizofrenia o trastorno bipolar y, la segunda, procurar el cese de la adicción (Szerman, 2009). Algunos antipsicóticos atípicos han demostrado ser buenos fármacos anticonsumo debido a su capacidad para bloquear los receptores (5-HT_{2c}) de la serotonina, lo cual corresponde a una disminución de la

impulsividad (Rubio et al., 2000; Antochi et al., 2003). Un ejemplo de esta estrategia sería la administración de clozapina, de la cual se ha comprobado que es capaz de reducir el consumo de cocaína y cannabis. En general, queda desaconsejada la administración de los antipsicóticos convencionales en los pacientes con patología dual. Estos fármacos, al disminuir el tono dopaminérgico, producen colateralmente un síndrome amotivacional (anhedonia y apato-abulia) que puede potenciar el deseo de consumo (Pino, 2009). A su vez, los pacientes que muestran un TUS suelen presentar una mayor sensibilidad a los efectos extrapiramidales de los antipsicóticos de primera generación, aunque los neurolépticos atípicos también pueden provocar este tipo de efectos.

La terapia psicológica y psicosocial para conseguir que el paciente mantenga la abstinencia y conserve la adhesión al tratamiento farmacológico resulta en este caso fundamental (Szerman et al., 2009).

3. LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN EN LOS TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS.

Se han descrito diversos neurotransmisores implicados en la aparición y desarrollo de los trastornos psiquiátricos, entre los que se encuentran las monoaminas, el glutamato, el GABA, los endocannabinoides y la serotonina (Sawa & Snyder, 2002; Gould et al., 2004). El presente estudio se ha centrado en los sistemas dopaminérgico, endocannabinoide y glutamatérgico.

3.1. SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

La dopamina es un importante neurotransmisor catecolaminérgico que participa en la regulación de múltiples funciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, entre las que se encuentran la función motora, emotiva, afectiva y la comunicación neuroendocrina. Está presente también en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), donde posee funciones como mensajero neuroquímico modulando la función cardíaca, la función renal, el tono vascular y la motilidad gastrointestinal (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994). Su síntesis se inicia con la L-Tirosina, aminoácido aromático y neutro, y se realiza en dos pasos catalizados por dos enzimas diferentes, la tirosina hidroxilasa (TH) y la DOPA-descarboxilasa (DDC). Las catecolaminas están formadas por un núcleo, denominado núcleo catecol, compuesto

por un anillo de benceno con dos grupos hidroxilos en los carbonos 3 y 4, mientras que las diferentes cadenas laterales definen las distintas catecolaminas. En la dopamina la cadena lateral es una etilamina (Cooper et al, 1996).

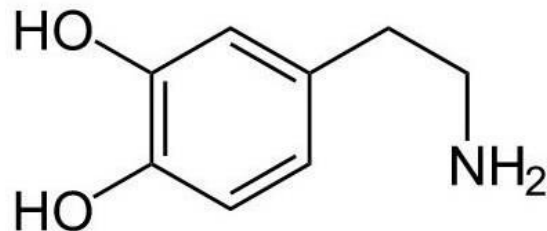


Figura 1. 3,4-Dihidroxifeniletilamina (Dopamina).

Desde hace décadas, la regulación de las vías dopaminérgicas ha resultado ser un importante foco de interés, dado que se ha constatado su participación en múltiples patologías, tales como la enfermedad de Parkinson (Ehringer & Honrykiewicz, 1960), los trastornos psiquiátricos (Carlsson & Lindqvist, 1963) o en la dependencia a sustancias de abuso (Imperato & Di Chiara, 1986; Di Chiara & Imperato, 1988). Aunque químicamente se conocía desde principios del siglo XX, es en los años cincuenta y sesenta cuando es descrita su presencia en el SNC y, por lo tanto, reconocido su papel como neurotransmisor. Posteriormente se caracterizaron los receptores a los cuales se une para realizar su función en la transmisión nerviosa (Kebabian & Calne, 1979). Hasta la fecha, se han encontrado cinco receptores diferentes clasificados en dos categorías en función de su homología, los D1-like (D1 y D5) y los D2-like (D2, D3 y D4). La inactivación o metabolización de la dopamina se produce a su vez por dos enzimas diferentes, la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la monoaminooxidasa (MAO). Ambas pueden actuar sobre la dopamina y ambas pueden catalizar el segundo paso de degradación hasta ácido homovalínico (HVA) siendo, por lo tanto, complementarias. En el caso de la monoaminooxidasa existen dos tipos, A y B, codificadas por diferentes genes (Bach et al., 1988).

El último elemento que compone el sistema es el transportador de dopamina (DAT) (Giros et al., 1992), proteína integral de membrana que se encarga de retirar el neurotransmisor de la hendidura sináptica y de reintroducirlo principalmente en el citoplasma de la neurona presináptica, aunque también se puede localizar DAT en la membrana de los astrocitos.

3.1.1. VÍAS DOPAMINÉRGICAS.

Las vías dopaminérgicas están compuestas por grupos de cuerpos neuronales situados en la substantia nigra o en el área tegmental ventral en la base del cerebro y los correspondientes axones que se proyectan hacia otras regiones (Cooper et al., 1996). Existen tres grupos de vías diferentes:

-Vía Nigroestriatal: desde los núcleos de substantia nigra en el mesencéfalo las terminaciones proyectan sobre la región estriada dorsal, asociada con funciones motoras (Romero et al., 2002).

-Vía Mesocorticolímbica: son las vías que parten desde el área tegmental ventral localizada en el mesencéfalo. Engloba a su vez a dos grupos distintos que mantienen cierto solapamiento entre sí, estando fuertemente relacionados (Kandel et al., 2000).

A) Mesolímbica: desde el área tegmental ventral, a través del núcleo accumbens, se conecta con el sistema límbico, el lóbulo temporal (amígdala e hipocampo), el bulbo olfatorio y con la corteza prefrontal. Tradicionalmente se ha vinculado la vía mesolímbica con la regulación de los sistemas de recompensa. Está relativamente establecido que las alteraciones de esta vía producen los síntomas positivos de la esquizofrenia.

B) Mesocortical: en este caso se conecta al área tegmental ventral con el lóbulo frontal de la corteza cerebral. Es muy importante dada su vinculación a la función cognitiva. También está íntimamente asociada a las respuestas relacionadas con la motivación y las emociones. Su alteración dentro de las patologías de espectro psicótico se relaciona con el deterioro cognitivo.

-Vía Tuberoinfundibular: se inicia en el núcleo arcuato del hipotálamo mediobasal (región tuberal) y se proyectan los axones hasta la eminencia medial o región infundibular, también en el hipotálamo. En este caso, la dopamina está produciendo una inhibición de la secreción de prolactina por parte de la adenohipófisis (Fernández-Ruiz et al., 1997). Dado que algunos neurolépticos bloquean la dopamina en esta vía, se produce, como consecuencia, un aumento de los niveles de prolactina, por lo que pueden aparecer alteraciones endocrinas, como por ejemplo: una secreción anormal de las glándulas mamarias, tanto en hombres como en mujeres, irregularidades en el ciclo menstrual, disfunción sexual e infertilidad.

3.1.2. SÍNTESIS DE DOPAMINA.

3.1.2.1. TIROSINA HIDROXILASA (TH).

La tirosina hidroxilasa (tirosín 3-monooxigenasa; EC 1.14.16.2) se localiza en el citoplasma de las neuronas productoras de dopamina (Weiner & Molinoff, 1994). Cataliza la conversión de L-Tirosina a L-Dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por adición de un grupo OH en la posición 3 del anillo bencénico, siendo éste el paso limitante en la ruta de síntesis tanto de dopamina como de otras catecolaminas (Ikeda et al., 1967). Para realizar la hidroxilación, la enzima utiliza tetrahidrobiopterina (BH_4) y hierro ferroso (Fe^{2+}) como cofactores, además de oxígeno molecular (Nagatsu, 1983).

A partir del ARNm, por procesamiento alternativo (*splicing*), pueden generarse cinco isoformas de la proteína (homómero), estando finalmente la enzima formada por cuatro de estas unidades, es decir, se configura como un tetrámero.

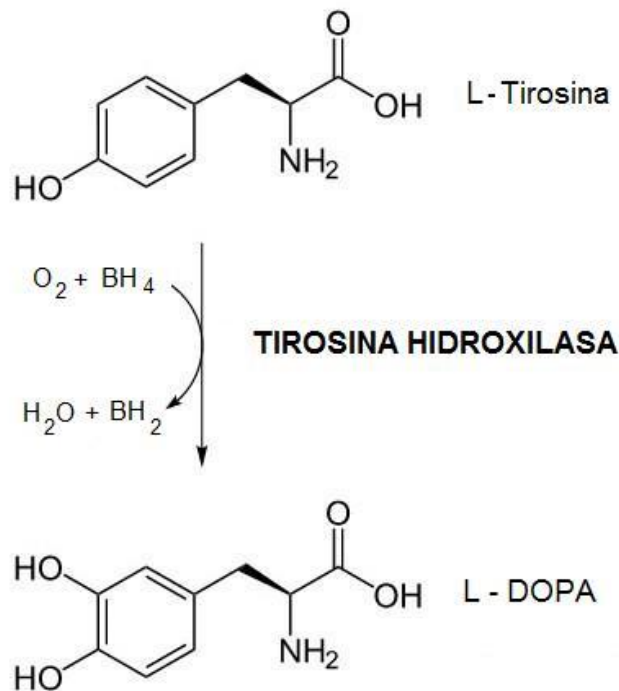


Figura 2. Acción de la tirosina hidroxilasa.

La regulación de la actividad de la TH puede ocurrir tanto por fosforilación como por retroinhibición, esto es, por unión de dopamina a la proteína (Kumer & Vrana, 1996). Existen dos dominios de unión a este efecto. El primero, de alta afinidad, es una unión competitiva en el lugar de BH_4 . El segundo es de baja afinidad y produce inhibición con independencia del estado de fosforilación.

3.1.2.2. DOPA DESCARBOXILASA (DDC).

La enzima DOPA-d Descarboxilasa (DDC, EC 4.1.1.28), también denominada como L-Aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), es una enzima de tipo liasa que está formada por un dímero de dos cadenas iguales (Christenson et al., 1972; Cooper et al., 1996). Esta proteína presenta 6 isoformas posibles que van de 338 a 480 aminoácidos, producidas a partir de los distintos ARNm que son generados por splicing alternativo.

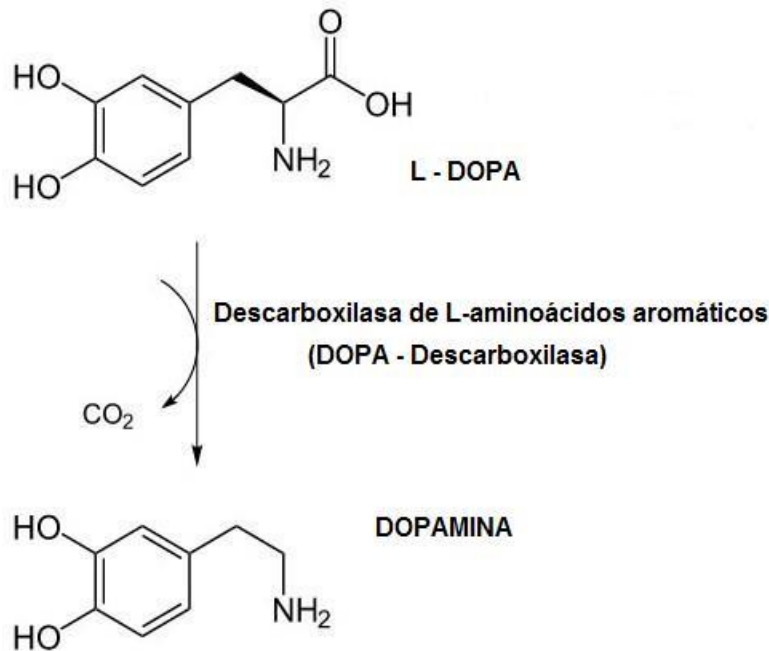


Figura 3. Síntesis de Dopamina por acción de la DDC.

La enzima DDC cataliza la síntesis de dopamina al descarboxilar la molécula de L-DOPA (Weiner & Molinoff, 1989). Aunque no es la reacción limitante de esta ruta, sí es crucial en aquellos pacientes que están en tratamiento con L-DOPA dado que la conversión a dopamina depende de esta enzima y por tanto la acción terapéutica.

3.1.3. INACTIVACIÓN DE LA DOPAMINA.

3.1.3.1. CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT)

La enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT, EC 2.1.1.6) es una de las enzimas más importantes en la inactivación de las catecolaminas. Cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-metionina hasta el grupo hidroxilo del carbono 3 del núcleo catecol (McGeer et al., 1987). Puede actuar utilizando como sustrato la dopamina pero también epinefrina, norepinefrina o los

catecol estrógenos (Chen et al., 2004). Cuando la acción se realiza sobre la dopamina el resultado es una molécula de 3-metoxitiramina (3-MT). No obstante, puede actuar como segundo paso de la ruta de inactivación de dopamina, utilizando como sustrato el metabolito ácido 3,4-dihidroxiacético (DOPAC) y dando como producto ácido homovalínico (HVA).

La enzima posee dos formas, una soluble (S-COMT) y otra unida a la membrana celular (MB-COMT). La forma S-COMT se encuentra en el citoplasma celular y se encarga de la inactivación de la dopamina una vez que ésta es recaptada hacia el interior celular por el transportador de dopamina (DAT). La forma unida a membrana (MB-COMT) es la de expresión mayoritaria en el tejido nervioso (Tenhunen et al., 1994) y realiza su actividad catalizando la dopamina extracelular que está en el espacio sináptico, ubicándose tanto en la membrana de la neurona presináptica como en la postsináptica. Ambas variantes se generan a partir del ARNm por la existencia de dos lugares de inicio de traducción diferentes, de tal modo que pueden traducirse los 6 exones originando una cadena de 271 aminoácidos (MB-COMT) o sólo 4 exones (S-COMT), en cuyo caso la cadena queda con 221 residuos.

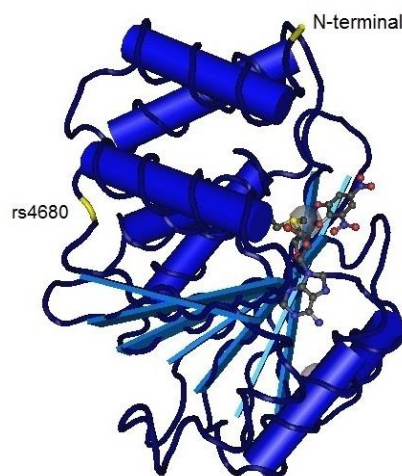


Figura 4. Estructura tridimensional de S-COMT. Imagen obtenida del software Cn3D v4.3. (NCBI) En amarillo aparece el residuo 108 de la proteína correspondiente al polimorfismo rs4680.

La catecol-O-metiltransferasa ha sido estudiada ampliamente en enfermedades como la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Craddock et al., 2006), pero también en el autismo (Anderson et al., 2008), en diversos trastornos del movimiento entre los que se encuentra la enfermedad de Parkinson (Klebe et al., 2013) y en tumores (Ates et al., 2013; Martínez-Ramírez et al., 2012).

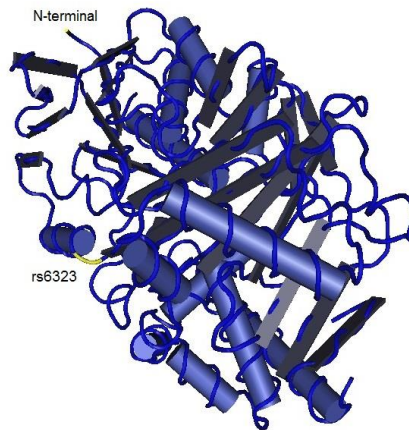


Figura 6. Estructura tridimensional de MAO-A. Imagen obtenida del software Cn3D v4.3. (NCBI) En amarillo aparece el residuo 164 o 297 en función de la isoforma de la proteína, correspondiente al polimorfismo rs6323.

Estas enzimas están unidas a membrana, ya sea a la membrana plasmática para inactivación de la dopamina sináptica o a la membrana mitocondrial externa en el interior de las neuronas y los astrocitos (McGeer et al., 1987).

Las enzimas MAO son además las que realizan la inactivación de las monoaminas exógenas, especialmente MAO-A, por lo que presentan un papel fundamental en el tratamiento de algunas patologías como la depresión clínica. Se han descrito, además, asociaciones a múltiples trastornos, especialmente cuando se produce una baja actividad enzimática, lo cual podría producir comportamientos violentos o impulsivos. Un ejemplo de ello se encuentra en la mutación causante del síndrome de Brunner (Brunner et al., 1993).

3.1.4. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (Kandel et al., 2000; O'Dowd et al., 1993). Todos poseen 7 dominios transmembrana y de 20 a 25 residuos hidrófobos. Los 7 dominios se conectan por 7 giros extracelulares y 7 intracelulares alternados. El extremo amino terminal queda hacia el exterior celular. En el tercer dominio citoplasmático (i3) aparecen las diferencias entre los diferentes receptores, siendo la base de la interacción diferencial para un tipo u otro de proteína G y, por lo tanto, de la diferente señalización celular (Dixon et al., 1987). El extremo carboxilo terminal también es responsable de los efectos de la interacción con proteína G (Schwartz et al., 1998; O'Dowd, 1993). Han sido descritos 5 receptores (D1 a D5), clasificados en dos grupos diferentes.

3.1.4.1. RECEPTORES D1-LIKE.

Este grupo está formado por los receptores D1 y D5, los cuales están acoplados a proteína G activadora (Andersen et al., 1990). Ante la unión del ligando activan adenilato ciclasa y, por lo tanto, proteínas quinasas dependientes de AMPc. El asa o dominio intracelular i3 es un asa corta (57 y 50 aa), mientras que la región carboxilo es grande (113 a 117 aminoácidos) y rica en residuos de serina, treonina y cisteína, tanto en D1 como D5 (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994).

El receptor D1, de 446 aa (NCBI Reference Sequence: NP_000785.1) es el más abundante en el SNC (Missale et al., 1998), se puede localizar en alta concentración en el bulbo olfatorio, el neocórtex, el núcleo accumbens, las islas de Calleja, la amígdala, el núcleo subtalámico, la substantia nigra (reticulada y compacta) y en la capa molecular del cerebelo. En niveles menores se localiza en la corteza cerebral (frontal, entorrinal y cingulada), en el tálamo y en el globo pálido. Estos receptores tienen una afinidad relativamente baja por la dopamina (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994).

El receptor D5 presenta 477 aminoácidos en su cadena (NCBI Reference Sequence: NP_000789.1) y tiene un 49% de homología con el receptor D1. Se localiza en el hipocampo en los núcleos lateral mamilar y parafascicular del tálamo (Jaber et al., 1996). Posee una afinidad a la dopamina mayor que la de D1. En cuanto a su función biológica, se ha determinado la importancia que presentan ambos receptores en la regulación del crecimiento y el desarrollo neuronal.

3.1.4.2. RECEPTORES D2-LIKE.

Los receptores D2, D3 y D4, forman la segunda familia de receptores dopaminérgicos (Andersen et al., 1990). Los receptores de este grupo se caracterizan por estar acoplados a proteína G inhibidora, es decir, hay una inhibición de la adenilato ciclasa. La combinación de i3 y región carboxilo es inversa a la anterior, por tanto el asa es larga (de 101 a 166 residuos) mientras que el extremo carboxilo es corto (O'Dowd, 1993).

El receptor D2 posee 2 isoformas diferentes producidas por *splicing* alternativo (Dal Toso et al., 1989). La forma corta, de 414 aa (NCBI Reference Sequence: NP_057658.2), es de expresión presináptica, mientras que la forma larga es de 443 aa (NCBI Reference Sequence: NP_000786.1) y de localización postsináptica. La mayor parte de los aminoácidos que producen esa diferencia de longitud se encuentran en el dominio intracelular i3.

La distribución del receptor D2 es amplia (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994). En gran cantidad puede encontrarse en el neocórtex, el bulbo olfatorio, la capa molecular de la formación hipocámpal, el núcleo accumbens, las islas de Calleja y el área tegmental ventral. En concentración media: sustantia nigra reticulada y compacta. En esta última el receptor se expresa como un autorreceptor somatodendrítico. También se encuentra en concentración media en las regiones prefrontal, entorrinal y cíngula de la corteza cerebral, el globo pálido, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo y en el núcleo subtalámico. Además de esto, aparece expresión del receptor D2 en la hipófisis como modulador de la apertura de los canales de Ca^{2+} y por tanto de la neurosecreción (Lledo et al., 1992; Missale et al., 1998).

En cuanto a su afinidad por el sustrato, D2 muestra una baja afinidad por la dopamina y, sin embargo, se ha establecido que es un receptor crucial en las características neurolépticas de los fármacos usados para el tratamiento de la esquizofrenia, pues en gran medida la potencia del fármaco está íntimamente relacionada con su afinidad por este receptor (Creese et al., 1976; Snyder, 1981). Su acción inhibitoria por unión a G_i lleva acoplada la apertura de los canales de K^+ y el cierre de los canales de Ca^{2+} .

Por su parte, D3 posee 400 aa (NCBI Reference Sequence: NP_000787.2), tiene una presencia elevada en las islas de Calleja, la región septal, los núcleos geniculados medial y lateral del tálamo, el núcleo mamilar medial del hipotálamo y en las células de Purkinje del cerebelo. Ya en una densidad menor se detecta en la corteza parietal y temporal, la formación hipocámpal, el bulbo olfatorio, el neocórtex, el núcleo accumbens, la amígdala, el núcleo subtalámico, la oliva inferior y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. En baja concentración se encuentra en sustantia nigra compacta, el área tegmental ventral, la corteza frontal y cíngula y el globo pálido (Schwartz et al., 1998; O'Dowd, 1993). Posee mayor afinidad que D2 por la dopamina y se ha encontrado que su activación estimula la proliferación celular.

El receptor D4 está formado por una única cadena de 419 aminoácidos (NCBI Reference Sequence: NP_000788.2). Se distribuye por la corteza frontal, el bulbo olfatorio, la amígdala, el mesencéfalo y la retina. Ya en cantidad menor también aparece en el neocórtex. Residualmente aparece en el hipotálamo y el hipocampo (Meador-Woodruff et al., 1994). De afinidad intermedia por la dopamina presenta una elevada afinidad por el antipsicótico atípico clozapina (Van Tol et al., 1991).

3.1.5. TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT1).

Es una proteína transmembrana de 620 aa (NCBI Reference Sequence: NP_001035.1) que presenta una elevada afinidad por la dopamina, pudiendo transportarla en ambas direcciones de la membrana (Amara et al., 1993). Está presente tanto en la neurona presináptica como en la membrana del astrocito que regula la homeostasis de la hendidura sináptica. Juega un papel fundamental en la regulación de la transmisión dopaminérgica y también en los efectos de algunas sustancias y fármacos. Así, por ejemplo, es diana de la cocaína y otras sustancias estimulantes provocando el bloqueo de la recaptación (Reith et al., 1997).

Posee un dominio de unión a soluto (SBD), el cual define a la superfamilia SLC6, proteínas transportadoras dependientes de Na⁺/Cl⁻. Posee 12 dominios alfa-hélice transmembrana (Kristensen et al., 2011), siendo estructuralmente parecido a otros transportadores de la superfamilia como el transportador de serotonina, el de norepinefrina, el de GABA o el de glicina.

3.1.6. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN LAS ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS.

Son múltiples las funciones cerebrales en las cuales las vías dopaminérgicas están implicadas y sobre las cuales presentan actividad reguladora; debido a ello, las alteraciones en el sistema dopaminérgico pueden generar patologías muy diferentes. Se constata así que el sistema dopaminérgico está vinculado tanto a trastornos del movimiento como a diversos trastornos psiquiátricos.

3.1.6.1 ESQUIZOFRENIA.

Desde que comenzó a establecerse en los años sesenta que los fármacos con acción neuroléptica debían su actividad a su capacidad de unión a los receptores dopaminérgicos, la dopamina y la esquizofrenia han quedado vinculadas (Carlsson & Lindqvist, 1963). No obstante, la evolución de un modelo explicativo coherente sobre los mecanismos etiológicos de la enfermedad ha sido dilatada, adquiriendo una gran multiplicidad de enfoques.

La hipótesis inicial era sencilla: dado que los fármacos antipsicóticos son bloqueantes de los receptores de dopamina, debía suponerse que la esquizofrenia es producida por un exceso de este neurotransmisor. No obstante, la hipótesis fue matizada progresivamente según se describían los diferentes receptores de dopamina, gracias a lo cual se vinculó la potencia del fármaco a la afinidad que presentara por el receptor D2 (Creese et al., 1976; Snyder, 1981). El segundo apoyo a la teoría dopaminérgica se produjo al determinarse los modos de acción de algunas sustancias

estimulantes con capacidad para inducir síntomas psicotomiméticos (Angrist et al 1975; Carlsson, 1988). En este sentido, se ha comprobado que la acción de la cocaína y de la anfetamina se ejerce sobre el transportador de dopamina y, en el caso de la segunda, también tiene capacidad para estimular la síntesis y liberación del neurotransmisor. Estas evidencias reforzarían la hipótesis dopaminérgica clásica (Angrist, 1994). Sin embargo, paralelamente, pudieron examinarse hallazgos que cuestionaban la teoría clásica de la dopamina obligando a replantear múltiples aspectos de la misma. En primer lugar, se ha confirmado que otros receptores están implicados. Entre estos se encuentran los receptores glutamatérgicos (Moghaddam & Javitt, 2012), serotoninérgicos (Eggers, 2013) y GABAérgicos (Hoftman et al., 2013). Estas evidencias muestran que, tanto la acción de los fármacos de nueva generación como la de las sustancias de abuso que producen síntomas miméticos, se produce (al menos en parte) a través de receptores no dopaminérgicos. Entre estos fármacos se encuentra la clozapina, que es el neuroléptico atípico más efectivo (Meltzer, 1997; Keefe et al., 1999). Esta molécula tiene cierta capacidad de activar los receptores D1 y D4, pero muy ligera para D2. Por el contrario, se ha determinado que su actividad está relacionada con los receptores serotoninérgicos. Finalmente, se constata que los antipsicóticos de primera generación afectan más a los síntomas positivos que a los negativos (Wong & Van Tol, 2003) y, por lo tanto, no debe considerarse que la alteración dopaminérgica abarca el espectro sintomatológico completo.

Entre las sustancias psicotomiméticas se halla la fenciclidina (PCP), la cual produce un cuadro más similar a la esquizofrenia que el de otras sustancias también alucinógenas, como el ácido lisérgico (LSD), dado que replica tanto los síntomas negativos como los positivos (Gorelick & Wilkins, 1989). Esta sustancia actúa a través de los receptores NMDA del glutamato.

Por su parte, los estudios *post mortem* de tejido cerebral de pacientes resultan controvertidos. Aunque se han encontrado, en algunos casos, densidades elevadas del receptor D2 (Reynold & Mason, 1994) y D4 (Seeman et al., 1993) en caudado y putamen, se discute si esa elevación puede deberse a una sobrecompensación debida a la medicación de los pacientes con antagonistas dopaminérgicos. Este fenómeno de sobrecompensación ante un fármaco no es inusual y hace que la interpretación de este tipo de resultados no sea concluyente. El sistema dopaminérgico se ha descrito tradicionalmente como un sistema con función inhibitoria, sin embargo, la realidad ha demostrado ser mucho más compleja. De este modo, los efectos de la dopamina van desde la activación hasta la inhibición, por lo que los modelos posteriores que se han desarrollado plantean que las vías dopaminérgicas ejercen fundamentalmente una

acción reguladora o moduladora de la neurona postsináptica (Grace, 1991; Howes & Kapur, 2009). Por lo tanto, funcionarían como un filtro de las señales de aferencia, modulando la integración de la información mediante su acción sobre las interneuronas que conectan con las neuronas eferentes. Este aspecto estaría en consonancia con los estudios de inhibición por prepulso (PPI) que se centran en los mecanismos de filtrado sensorial, es decir, los procesos que descartan estímulos irrelevantes (Geyer et al., 1990; Braff et al., 2008; Jazbec et al., 2007).

La teoría clásica, por consiguiente, no explica ciertas evidencias empíricas. Por una parte, las sustancias estimulantes que producen una elevación del tono dopaminérgico no replican todos los síntomas del espectro psicótico, centrándose fundamentalmente en los síntomas positivos y no en los negativos, del mismo modo que los antipsicóticos típicos tienen poco efecto terapéutico sobre los síntomas negativos (Green, 1996). En congruencia con ello, se observa que en la región cortical y prefrontal no sólo no habría una hiperdopaminergia, sino que existiría una hipodopaminergia (Davis et al., 1991; Abi-Dargham & Moore, 2003), motivo por el cual algunos tratamientos podrían agravar este tipo de síntomas. Además, la reducción del tono dopaminérgico no sólo explicaría los síntomas negativos y su falta de respuesta a los neurolépticos de primera generación, sino que explicaría también el deterioro cognitivo o la pérdida de memoria de trabajo.

Otra puntualización a la teoría tradicional proviene del tiempo que tarda el tratamiento con neurolépticos en paliar los síntomas, generalmente entre dos y tres semanas. Esto podría estar indicando que los mecanismos subyacentes, tanto en el tratamiento como en la propia patología, no son debidos, o al menos no exclusivamente, a la transmisión nerviosa por sí misma. Los neurolépticos bloquean de forma efectiva los receptores de dopamina desde el primer momento de la administración, no obstante, el proceso de reducción de los síntomas no comienza hasta varios días después. Esto se explicaría por los efectos a medio y largo plazo que produce la activación o la inhibición de los receptores D2 y D3, entre los que aparecerían, posiblemente, cambios plásticos en los circuitos neuronales implicados. Este efecto parece estar mediado por el bloqueo de la despolarización de las células dopaminérgicas (Grace et al., 1997). Inicialmente los bloqueantes aumentan el disparo pero, posteriormente, se produce una disminución general de la frecuencia, coincidiendo con el momento en el que se muestran los efectos antipsicóticos. Un aspecto que también plantea una revisión de la teoría dopaminérgica es que el tratamiento con antipsicóticos típicos no produce mejoras en todas las personas tratadas. Los neurolépticos tienen un elevado porcentaje de pacientes a los cuales no

les produce efectos terapéuticos, valorándose que en torno al 30% de los pacientes medicados no responde adecuadamente (Wong & Van Tol, 2003).

Es por todo ello que la hipótesis de la dopamina ha evolucionado hacia un modelo por el cual se considera que no es únicamente la regulación de sus niveles lo que podría estar alterado. Uno de los modelos propuestos en este sentido es la teoría de la constricción de los límites de tolerancia (Ashcroft et al., 1981; Palomo et al., 1985). En este modelo pueden coexistir estados de hiperdopaminergia y de hipodopaminergia, dado que la alteración radicaría en su modulación y en la reducción del rango de las concentraciones de neurotransmisor admisibles. De este modo, se integran tanto conceptos de hipersensibilidad como de desensibilización a la dopamina, junto a los efectos reguladores que podrían tener otros neurotransmisores como la serotonina o el glutamato (Grace, 1991) sobre las vías dopaminérgicas. Este concepto integrador sería considerado como una tercera versión de la hipótesis de la dopamina (Howes & Kapur, 2009), aglutinando en sí las muy diversas evidencias empíricas existentes.

3.1.6.2. TRASTORNO BIPOLAR.

La implicación de la dopamina en el trastorno bipolar ha sido evidenciada, si bien la interacción compleja con otros neurotransmisores no ha permitido que un modelo bien delimitado quede establecido (Willner et al. 2005; Cousins et al., 2009).

La primera evidencia radicaría en el hecho de que los episodios depresivos mejoran con un tratamiento basado en antidepresivos pro-dopaminérgicos directos o indirectos (Dremencov et al., 2004). Por su parte, aunque el metabolismo y regulación de la serotonina se ha contrastado como fundamental en esta patología, ésta es a su vez un regulador de la dopamina, estando, por lo tanto, estrechamente relacionadas en la patología (Parsons et al., 1996).

Conjuntamente, se considera que los episodios de manía estarían asociados a niveles sobreelevados de dopamina, especialmente en los circuitos de recompensa cerebrales, como las neuronas dopaminérgicas mesocorticales, o las vías que unen el núcleo accumbens con el córtex prefrontal (Leboyer et al., 1996; Cousins et al., 2009). De este modo, se ha observado que en pacientes con trastorno bipolar aparecen concentraciones aumentadas de ácido homovalínico (un metabolito de degradación de la dopamina) en líquido cefalorraquídeo y plasma, anticipando así la aparición de estos episodios. En consonancia con esto, los fármacos antipsicóticos son utilizados como terapia en el trastorno bipolar, evidenciando la posibilidad de un espectro continuo de los diferentes cuadros clínicos que implican elevaciones de la función dopaminérgica.

En adición a todo ello, en el ámbito de la investigación genética, es frecuente encontrar que los genes, mutaciones y polimorfismos que ofrecen resultados positivos en la esquizofrenia están también asociados al trastorno bipolar (Lichtenstein et al., 2009; Craddock et al., 2009; O'Donovan et al., 2009); entre ellos, se incluyen los pertenecientes al sistema dopaminérgico (Zhan et al., 2011; Kaalud et al., 2013). No obstante, esta superposición no siempre sucede en un mismo estudio. En cualquier caso, se pone de manifiesto que ambas patologías comparten mecanismos comunes en su desarrollo, si bien esta relación no está completamente dilucidada. Un estudio realizado en Suecia con una población de más de dos millones de familias, ha mostrado que el aumento del índice de riesgo al poseer antecedentes familiares es indistinto para la esquizofrenia y el trastorno bipolar, es decir, que existen familias en las que aparecen casos de ambas enfermedades (Lichtenstein et al., 2009). Esta evidente superposición de factores genéticos de riesgo comunes a las dos patologías ha llevado incluso a algunos investigadores a cuestionarse la separación entre ambas (O'Donovan et al., 2009), planteándose si la separación dicotómica responde realmente a un sustrato biológico diferente entre ellas. Esto implicaría que todas las asociaciones realizadas entre el sistema dopaminérgico y la esquizofrenia serían válidas, al menos parcialmente, para el trastorno bipolar.

3.1.6.3. PATOLOGÍA DUAL.

La vinculación principal entre el sistema dopaminérgico y las conductas adictivas proviene de la función de las vías dopaminérgicas en los mecanismos de refuerzo o sistemas de recompensa cerebrales. Entre las regiones cerebrales implicadas se encuentra el área tegmental ventral, el núcleo accumbens, la amígdala y el córtex prefrontal (Heimer et al 1991; Koob, 1999; Everitt & Robbins, 2005). Son las proyecciones del área tegmental ventral sobre el núcleo accumbens las que parecen tener mayor peso sobre el mecanismo de refuerzo positivo (Schultz, 1997), independientemente de la naturaleza del mismo: psicológica o farmacológica (Kelley & Berridge, 2002).

La cocaína (Everitt & Robbins, 2005), la amfetamina (Jones et al., 1998), la morfina (Spangler et al., 2003) o la nicotina (Hendrickson et al., 2013), incrementan la transmisión dopaminérgica en las áreas límbicas implicadas en la regulación emocional. En el caso de la cocaína y la amfetamina se produce por un bloqueo de la recaptura de la dopamina, aunque también de la serotonina o la noradrenalina (Feldman et al., 1997). La amfetamina, además, produce el aumento de la síntesis y liberación de la dopamina así como el bloqueo de las enzimas MAO, aunque esto

último sólo a dosis excepcionalmente elevadas (Jones et al., 1998). Otras sustancias pueden producir también elevaciones de la dopamina en estos circuitos neuronales por una vía indirecta. En el caso del consumo de *Cannabis sativa* las sustancias psicoactivas presentes interfieren en las vías del sistema endocannabinoide, el cual modula o regula otras vías de señalización, entre ellas, las de glutamato, péptidos opioides, GABA, serotonina y acetilcolina (Iversen, 2003). Los receptores CB1 no aparecen en las neuronas dopaminérgicas, sino en aquellas que son inervadas por éstas. Estos receptores se sitúan en la célula presináptica y, por lo tanto, participan en la regulación de la síntesis, liberación y recaptación, al actuar como mensajeros retrógrados.

Algunas investigaciones, en referencia al alcohol, han mostrado que su consumo también produce elevaciones de los niveles de dopamina, siendo en este caso la vía mesolímbica la más importante (Salamone et al., 2003). Este efecto parece estar mediado por el sistema opioide, dado que la administración de alcohol con antagonistas o agonistas opioides, modula la respuesta de dopamina. Esta elevación de dopamina se produce, en cualquier caso, por la intoxicación aguda a corto plazo, pero el consumo crónico genera, contrariamente, una reducción de la capacidad del sistema para producirla por sí mismo (Volkow et al., 2002).

En consecuencia a todo ello, la dopamina va a estar implicada independientemente de la sustancia consumida, ya sea por una acción directa o por una vía indirecta, ya sea por un refuerzo fisiológico o por un refuerzo psicológico. De este modo, las elevaciones de dopamina van a inducir una autoestimulación que refuerza el consumo de dicha sustancia y las conductas relacionadas con dicho consumo (Ito et al, 2004).

Tanto en población con esquizofrenia como en población con trastorno bipolar, la prevalencia de consumo y trastorno por uso de sustancias es muy elevada, poniendo de manifiesto la posibilidad de mecanismos fisiológicos comunes (Mueser et al., 1998). Las teorías propuestas contemplan diversas posibilidades en cuanto a la relación entre las alteraciones de los sistemas a nivel molecular y el amplio espectro de cuadros clínicos, como ya ha sido anteriormente expuesto. De este modo, desequilibrios bioquímicos similares podrían dar inicio a las diferentes patologías en función de otros factores. Podría ocurrir, por otra parte, que el consumo originara las alteraciones que se desarrollan en forma de síndromes psiquiátricos. Finalmente, los pacientes con esquizofrenia o trastorno bipolar podrían ser más sensibles a los efectos del consumo, ya sea que se exprese como una tendencia a dicha conducta o como una utilización de las sustancias por su percepción de efectos paliativos. En cualquier

caso, el sistema dopaminérgico tendría un papel primordial, si bien no completamente definido.

3.2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.

Históricamente, el estudio del sistema cannabinoide endógeno, o sistema endocannabinoide, se inicia con las investigaciones que buscan determinar los mecanismos bioquímicos y moleculares a través de los cuales actúa en el sistema nervioso el Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). Esta molécula es la principal sustancia activa de la planta *Cannabis sativa*, estando presente en los preparados que se obtienen de ella para su consumo. De este modo, se hallaron en primer lugar los receptores a los cuales se une el Δ^9 -THC y, por tanto, los receptores que median los efectos tanto a corto como a largo plazo (van der Stelt & Di Marzo, 2003). Posteriormente y gracias a ello, pudieron hallarse los ligandos endógenos para dichos receptores: los neurotransmisores denominados endocannabinoides. Llega a definirse así, todo un sistema de señalización compuesto además de por los receptores y sus ligandos, por las enzimas de síntesis, las enzimas de inactivación y por los transportadores de reciente descubrimiento (Di Marzo et al., 1998; Kaczocha et al., 2009)

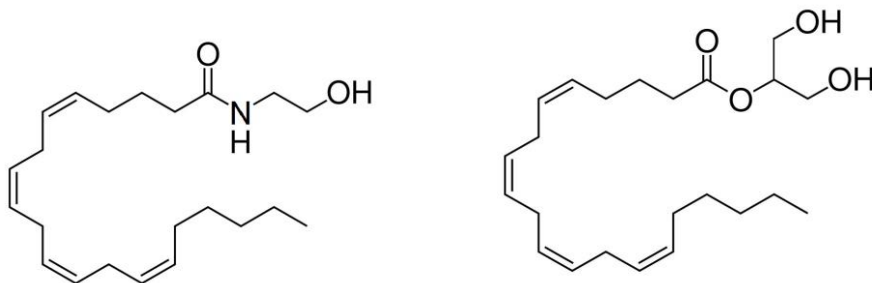


Figura 7. Estructuras del N-araquidoniletanolamina (AEA) y del 2-araquidonil glicerol (2-AG).

Bioquímicamente, los endocannabinoides son derivados lipídicos endógenos, de los cuales los dos considerados como principales son el N-araquidoniletanolamina (anandamida / AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG), aunque existen otros como el 2-araquidonilglicerol éter, el O-araquidonil etanolamina, el N-araquidonil-dopamina y el N-araquidonil-L-serina (Pertwee et al., 2010). De ellos, el más estudiado y mejor conocido, la AEA, se ha determinado que actúa como mensajero retrógrado en la sinapsis (Vaughan & Christie, 2005).

Cuando el neurotransmisor principal que define al tipo neuronal concreto (glutamatérgica, GABAérgica, etc.) se une a los receptores postsinápticos, la despolarización de la membrana junto a la apertura de canales iónicos va a producir la activación de las enzimas de síntesis presentes en ella. La AEA, una vez sintetizada, se dirige desde la neurona postsináptica hasta los receptores cannabinoides en la membrana presináptica y, al unirse a ellos y activarlos, desencadena mecanismos moleculares que establecen un feed-back de regulación (Katona et al., 2008).

3.2.1. SÍNTESIS DE ENDOCANNABINOIDES.

3.2.1.1. SÍNTESIS DE ANANDAMIDA (AEA).

La síntesis de anandamida se realiza en 2 etapas (Pacher et al., 2006). En la primera de ellas, se produce el paso de ácido araquidónico (AA) desde la fosfatidilcolina (PC) hasta la fosfatidiletanolamina (PE), formándose así N-ácido araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Esta reacción está catalizada por la enzima de membrana N-acil transferasa (NAT). En la segunda reacción, NAPE es hidrolizado por la fosfolipasa-D generando anandamida (AEA). La AEA se une con alta afinidad a los receptores CB1 por los que tiene preferencia, pero puede unirse también a los receptores CB2 con una afinidad menor (Pertwee et al., 2010).

3.2.1.2. SÍNTESIS DE 2-ARAQUIDONIL GLICEROL.

El 2-Araquidonil glicerol (2-AG) es el producto de la hidrolisis del diacilglicerol (DAG) por la acción de la enzima diacilglicerol lipasa (Sugiura et al., 2006). De esta enzima se han descrito dos tipos hasta el momento, α y β . A su vez, existen dos vías para la producción de DAG: la primera parte del inositol fosfato mediante la enzima fosfolipasa-C (PI-PLC), mientras la segunda parte del ácido fosfatídico (PA) siendo la enzima implicada la PA-fosfohidrolasa.

En el cerebro, el 2-AG tiene mayores niveles de concentración que la AEA, sin embargo, se estima que sólo una pequeña cantidad está implicada en la señalización endocannabinoide, dado que su afinidad por los receptores, tanto CB1 como CB2, es baja, siendo además la distribución del 2-AG mucho más generalizada que la de los receptores (Sugiura et al., 2006). Esto se explica por el hecho de que el 2-AG además de tener una función como neurotransmisor forma parte del metabolismo de los lípidos.

3.2.2. INACTIVACIÓN CANNABINOIDE.

3.2.2.1. AMIDO HIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS (FAAH).

La amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH; EC 3.5.1.99) es la enzima responsable de la inactivación de diversos compuestos de la familia de las amidas de ácidos grasos, en la que se encuentran los endocannabinoides (Cravatt & Lichtman, 2002). Se trata de una proteína de 579 aa (NP_001432.2) y 63 kD, con un dominio transmembrana, una secuencia consenso de amidasa y un dominio de unión SH3. La enzima completa está formada por un homodímero (McKinney & Cravatt, 2005).

La acción de la enzima FAAH sobre la AEA para su inactivación da como resultado ácido araquidónico y etanolamina. Aunque *in vitro* se ha constatado la capacidad de FAAH para degradar el 2-AG, *in vivo* no parece que esta acción sea importante (Goparaju et al., 1998).

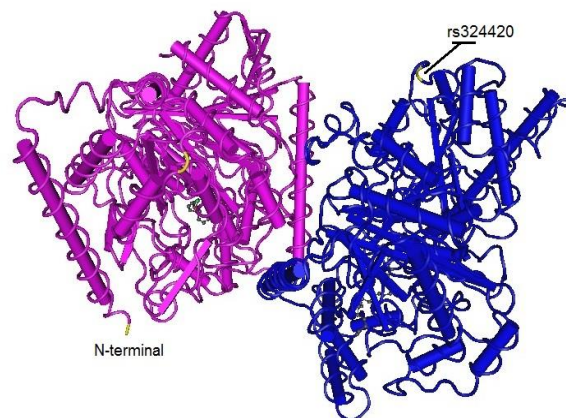


Figura 8. Estructura tridimensional de la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Imagen obtenida del software Cn3D v4.3. (NCBI). En amarillo aparece marcado el residuo 129 correspondiente al polimorfismo genético rs324420.

La expresión de FAAH es abundante en el cerebro, especialmente en las regiones del neocórtex, hipocampo, amígdala y cerebelo. En las neuronas se localiza en regiones de elevada expresión de CB1 (Egertová et al., 2003), aunque también se encuentra en células de la glia (Romero et al., 2002). Intracelularmente se sitúa en la membrana del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Se expresa también fuera del SNC en órganos como el hígado, el páncreas, los riñones y en músculo esquelético (Lambert & Fowler, 2005).

3.2.2.2. MONOACILGLICEROL LIPASA (MGLL / MGAL).

La monoacilglicerol lipasa (MGLL / MGAL; EC 3.1.1.23) es la enzima que inactiva el 2-AG, dando como resultado ácido araquidónico y glicerol. Puede actuar también sobre los triglicéridos o completar la degradación a monoglicéridos de las lipoproteínas (Karlsson et al., 2001; Dinh et al., 2002). Tiene por ello gran relevancia en los adipocitos y su expresión es prácticamente ubicua. No obstante, en cerebro su presencia es mayor en aquellas regiones donde hay una elevada expresión de CB1 (Dinh et al., 2002).

Pertenece a la superfamilia de las serina hidrolasas y es una proteína asociada a membrana de 313 aa (NCBI Reference Sequence: NM_007283.6) y 33 kD. Existen otras 2 isoformas, de 303 (NM_001003794.2) y 283 (NM_001256585.1) aminoácidos, en función del procesamiento alternativo del ARNm.

3.2.3. RECEPTORES CANNABINOIDES.

3.2.3.1. RECEPTOR DE CANNABINOIDES TIPO I (CB1).

El receptor de cannabinoides de tipo I (CB1; NCBI Reference Sequence: NP_001153731.1; NM_001160259.1) está formado por una cadena de 472 aa aunque existe una segunda isoforma de 439 aa (NP_149421.2; NM_033181.3). Posee 7 dominios transmembrana y varios dominios de unión a proteína $G_{(i-\alpha/s)}$ (Matsuda et al., 1990). Cuando CB1 se asocia a $G_{i/o}$, ésta a su vez se une a las adenilato ciclasas de tipo I, V, VI y VIII. Los tipos I y VIII son los de más amplia distribución en el cerebro, lo que se corresponde con el papel fundamentalmente inhibitor atribuido a los cannabinoides. CB1 unido a G_s se asocia con las adenilato ciclasas de tipo II, IV y VII. Estas combinaciones son propias del estriado y del globo pálido, por tanto, en estas regiones los cannabinoides tendrían una acción estimuladora (Rhee et al., 1998).

El receptor CB1 se localiza presinápticamente y participa en la retroinhibición de la liberación de neurotransmisores, de modo que su acción produce una atenuación de la transmisión sináptica. Esta función está ligada a las neuronas en las que se expresa: GABAérgicas (corticales y estriatales) y glutamatérgicas (corticales, hipocampales, hipotalámicas y cerebelares). También puede localizarse en las neuronas de las vías subcorticales ascendentes, correspondiendo así a las terminales colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas (Ramos & Fernández-Ruiz, 2003). La localización postsináptica también ha sido enunciada, y estaría modulando la inhibición de los canales de calcio sensibles a voltaje y los receptores ionotrópicos del glutamato (Salio et al., 2002). A su vez, CB1 tiene expresión en las células de la astroglia (Stella,

2011). En estas células estaría contribuyendo a la regulación de las funciones relacionadas con el aporte de nutrientes a las neuronas y al mantenimiento de la homeostasis del espacio sináptico. Además, a través de esta ubicación en el astrocito, estaría implicado en la regulación del endotelio vascular, ya que la activación del receptor produce vasodilatación.

La expresión del receptor CB1 es amplia dentro del sistema nervioso, pero también está presente en otros tejidos como el endotelio vascular, el tejido óseo o el tejido adiposo, y en órganos como testículo y útero (Howlett et al., 2002).

Es importante reseñar que el patrón de expresión de CB1 no es constante a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo. Durante la fase prenatal, los receptores CB1 son muy abundantes en las células progenitoras neurales y en las proyecciones axonales que conforman áreas de sustancia blanca (Fernández-Ruiz et al., 2000). Esto pone de manifiesto que el sistema cannabinoide endógeno regula procesos de proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular (Galve-Roperh et al., 2009) y, consecuentemente, está implicado en la elongación y fasciculación de los axones, en la formación de conexiones sinápticas y en el establecimiento de patrones morfogénicos del sistema nervioso (Harkany et al., 2007). Este papel se mantiene durante la neurogénesis adulta en aquellas células que preservan potencialidad como célula progenitora en las regiones neurogénicas, es decir, zona subventricular-lóbulo olfatorio y giro dentado del hipocampo.

3.2.3.2. RECEPTOR DE CANNABINOIDES TIPO II (CB2).

El receptor de cannabinoide de tipo II (CB2; NCBI Reference Sequence: NP_001832.1; NM_001841.2) posee una cadena de 360 aa en la cual existen 7 dominios transmembrana y varios dominios de unión a proteína G. Posee un 44% de homología general con CB1 mientras que la homología en los residuos que conforman los dominios transmembrana es de un 68% (Munro et al., 1993; Galiègue et al., 1995).

Este receptor tradicionalmente se consideró un receptor de tejidos periféricos de expresión muy reducida (Galiègue et al., 1995), siendo denominado receptor cannabinoide de macrófagos. Sin embargo, pudo localizarse posteriormente en las células de la microglia del SNC (Carlisle et al., 2002; Klegeris et al., 2003), por lo que seguiría considerándose como un receptor que participa principalmente en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria (Benito et al., 2008). En esta concepción, el 2-AG se uniría a CB2 produciendo una inhibición de la respuesta, es decir, se inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Baker et al., 2007).

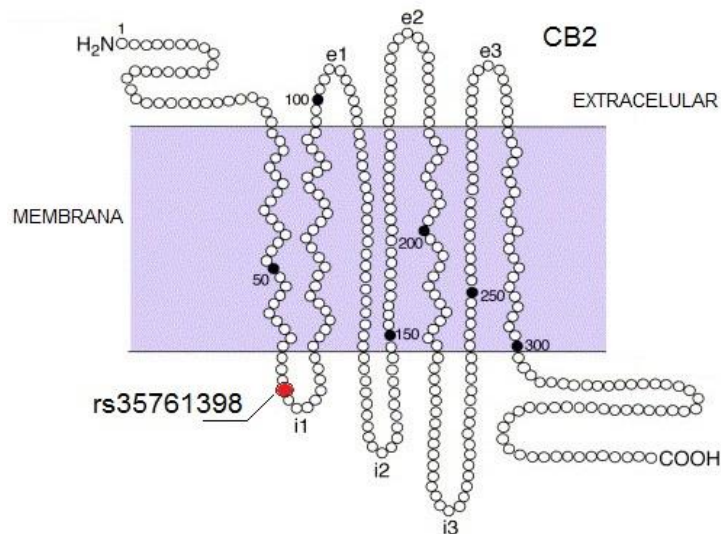


Figura 9. Estructura del receptor de cannabinoides de tipo II (CB2). En rojo aparece el residuo 63 de la proteína que corresponde al polimorfismo genético rs35761398.

Sin embargo, la presencia de CB2 en otros tipos celulares dentro del SNC ha sido detectada, aunque continúa siendo una cuestión discutida (Atwood & Mackie, 2010). No obstante, puede considerarse aceptada la expresión en otros tipos celulares de glia, entre los que se encontrarían los astrocitos (Sheng et al., 2005), y en neuronas granulares del cerebelo (Skaper et al., 1996), así como también en células precursoras neuronales (Galve-Roperth et al., 2013)

3.2.3.3. OTROS RECEPTORES DE CANNABINOIDES.

Además de los receptores CB1 y CB2, se han propuesto otros posibles receptores cannabinoides que podrían mediar funciones específicas en regiones restringidas. Entre ellos se encuentra el receptor huérfano acoplado a proteína G (GPR55; NP_001171656.1), receptor que media diversas funciones vasculares tanto en cerebro como en otros tejidos (Ryberg et al., 2007). También estaría el receptor vanilloide (TPRV1; NP_542437.2), un receptor ionotrópico que comparte ligandos con CB1 y que se expresa conjuntamente en algunos grupos de neuronas (Cristino et al., 2006).

También se ha descrito una subfamilia de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR α - γ), entre cuyas funciones se encontrarían la regulación de la alimentación y la lipólisis, presentando además capacidad analgésica (Sun & Bennett, 2007).

3.2.4. TRANSPORTADOR DE ENDOCANNABINOIDES.

Tras su unión a los receptores, los endocannabinoides pasan del espacio sináptico al interior celular para ser inactivados por las enzimas de degradación. Originalmente, debido a la naturaleza lipídica de los endocannabinoides, se supuso que el paso a través de la membrana se producía por difusión. Sin embargo, dada la eficacia del proceso, se propuso que debían existir mecanismos que lo facilitaran, incluyendo la existencia de una proteína transportadora (Maccarrone et al., 2000), la cual no ha podido ser aislada aunque hay estudios que parecen evidenciar su presencia en la membrana celular (Chicca et al., 2012).

Sí han sido encontradas y caracterizadas dos proteínas que actúan como transportadores intracelulares para la AEA. Estas proteínas, una vez está la AEA en el citoplasma, se unen a ella y la conducen hasta el aparato de Golgi o al retículo endoplasmático, donde es inactivada por la enzima FAAH. Estas dos proteínas son FABP5 (NP_001435.1; ADU05470.1) y FABP7 (NP_001435.1; CAG33338.1), proteínas de unión a ácidos grasos (Kaczocha et al., 2009). Inicialmente fueron aisladas a partir de células epidérmicas (Siegenthaler et al., 1994), siendo habitualmente estudiada su función en procesos tumorales (Liang et al., 2005).

3.2.5. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LOS TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS.

El sistema endocannabinoide presenta una función reguladora sobre diversos neurotransmisores, entre los que se encuentran: glutamato, péptidos opioides, dopamina, GABA, serotonina y acetilcolina (Iversen, 2003). Respecto a las neuronas dopaminérgicas, el receptor CB1 no ha sido localizado en sus membranas, pero sí en las neuronas de las regiones cerebrales inervadas por ellas (Tsou et al., 1998). Por lo tanto, se ha propuesto la existencia de un mecanismo indirecto entre la activación de los receptores CB1 y la modulación de la transmisión dopaminérgica. Conjuntamente, se han elaborado diferentes teorías y modelos que expliquen, a partir de la relación entre ambos sistemas, la aparición y desarrollo de las patologías psiquiátricas, integrando los resultados de las múltiples investigaciones que han abordado la cuestión (Ujike & Morita, 2004; Parolaro et al., 2010). De manera similar a lo que sucede en el estudio del sistema dopaminérgico, parte de las conclusiones obtenidas acerca de cómo se vincula el sistema endocannabinoide con la esquizofrenia y el trastorno bipolar provienen de la observación de los efectos provocados por fármacos o sustancias de abuso. En el caso del sistema endocannabinoide, muchas de las evidencias surgen de las investigaciones que buscan determinar la acción bioquímica del consumo de cannabis (Fernández-Espejo et al., 2009).

3.2.5.1. ESQUIZOFRENIA.

El estudio de D'Souza et al. (2004) confirmó los efectos psicomiméticos del Δ^9 -THC en individuos control. En dicho estudio, se administró Δ^9 -THC por vía intravenosa a voluntarios sin síntomas psicóticos y se pudo observar que se reproducían tanto los síntomas positivos como los síntomas negativos. Esto sucedía, además, de una manera dosis-dependiente. Por otra parte, cuando era administrado a pacientes con esquizofrenia los síntomas se exacerbaban. Queda establecido, por lo tanto, que las vías endocannabinoides poseen una vinculación con la sintomatología del espectro psicótico. Por ello, se propuso que las alteraciones en su regulación podrían producir un desequilibrio que provocara o contribuyera a la aparición de la patología. Estas alteraciones no sólo harían referencia a las que se producen durante el consumo de cannabis, sino que podrían existir alteraciones endógenas de efectos análogos, entre las cuales se incluirían las derivadas de factores genéticos que afectan al equilibrio del sistema endocannabinoide.

Por tanto, los estudios que relacionan el sistema cannabinoide endógeno y la esquizofrenia van a tener dos vertientes diferentes (Fernández-Espejo et al., 2009). La primera será aquella en la que se valora la implicación del sistema en pacientes con síntomas psicóticos que además tengan o hayan tenido un consumo de cannabis, de modo que se puedan correlacionar las diferencias sintomatológicas con las variaciones bioquímicas o fisiológicas generadas por el propio consumo. Otros trabajos buscarán, complementariamente, las alteraciones intrínsecas e independientes al consumo, que puedan existir en el sistema endocannabinoide y que podrían generar los síntomas de la patología.

Desde la perspectiva de alteraciones en el sistema cannabinoide endógeno en pacientes con esquizofrenia sin consumo se encuentran diversos hallazgos de interés. Uno de los primeros es el hallazgo de elevados niveles de AEA en sangre (De Marchi et al., 2003) en pacientes con brotes agudos y también en líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes que no están tomando medicación o que son tratados con antipsicóticos atípicos (Leweke et al., 1999; Giuffrida et al., 2004). Esta sobreelevación de los niveles no se observa en pacientes tratados con antipsicóticos típicos. Esto parece relacionar los niveles de AEA con el receptor D2, diana principal de la acción de los antipsicóticos de primera generación. A su vez, y en congruencia con lo anterior, se ha observado la capacidad que tiene el Δ^9 -THC para reducir la actividad del receptor D2 (Vorunganti et al., 2001), así como el bloqueo selectivo de CB1 potencia a los receptores D1 y D2 (Ferrer et al., 2007). Por consiguiente, una

sobreelevación de la AEA podría estar indicando un mecanismo compensatorio para reducir la actividad de D2 y por tanto paliar síntomas psicóticos.

Otros estudios ponen de manifiesto una reducción de los niveles del receptor CB1 en la corteza frontal dorsolateral de los pacientes (Urigüen et al., 2009; Eggan et al., 2008). En el trabajo de Eggan et al. se encontraba también reducido el ARNm codificante para el receptor, mientras que en el de Urigüen et al. la reducción se ceñía a la proteína y únicamente en el grupo de pacientes con tratamiento antipsicótico, no así en las muestras de pacientes que no recibieron tratamiento. Dada la función inhibitoria de los endocannabinoides, se ha interpretado esta reducción como una compensación para aumentar los niveles del neurotransmisor GABA, es decir, se trataría de una adaptación compensatoria para paliar los síntomas neurocognitivos. También podría relacionarse con la dopamina, pues los efectos cognitivos pueden deberse a hipodopaminérgica en el córtex. Por consiguiente, una reducción en niveles de CB1, y de su acción inhibitoria, podría tener como efecto una elevación de la transmisión dopaminérgica.

No obstante, otros trabajos encuentran una elevada densidad de receptores CB1 en la corteza cingulada anterior, en las capas I y II de la corteza cingulada posterior y en la corteza prefrontal dorsolateral, ofreciendo así datos contradictorios (Dean et al., 2001; Zavitsanou et al., 2004; Dalton et al 201).

En consonancia con esto, se ha observado que la remisión de los síntomas clínicos iba acompañada de reducciones significativas de AEA y del ARNm del gen CNR2 (codificante para el receptor CB2) y del gen FAAH (De Marchi et al., 2003).

Existen, además, investigaciones que relacionan la esquizofrenia con alteraciones debidas no tanto a la transmisión nerviosa como a la función colateral que tienen los neurotransmisores en el refuerzo de las conexiones neuronales y en la plasticidad de las mismas. Parte de esta concepción estaría sustentada en el hecho de que el tratamiento produce los efectos terapéuticos semanas después de su inicio. En este sentido, se ha descrito la función de los receptores CB1 y CB2 en el establecimiento de conexiones entre neuronas y en la formación de los circuitos neuronales durante el desarrollo (Fernández-Ruiz et al., 2000; Harkany et al., 2007). Por ello, un desequilibrio en la transmisión cannabinoide podría causar que estos procesos no sucedieran correctamente. De este modo, la esquizofrenia ha sido también conceptualizada como una patología en la cual la plasticidad y la conectividad entre neuronas está comprometida (Duan et al., 2007; Ayalew et al., 2012). En ello podría incluirse el papel fundamental que presenta el sistema endocannabinoide en la

regulación de la respuesta inflamatoria o en los procesos de neurodegeneración (Ashton & Glass, 2007). Quedaría, por lo tanto, implicado el sistema endocannabinoide en el desarrollo de la esquizofrenia no solo por su función reguladora sobre otros neurotransmisores, sino por su función sobre el neurodesarrollo y sobre el mantenimiento de la integridad neuronal (Galve-Roperh et al., 2009; Fernández-Ruiz et al., 2004).

3.2.5.2. TRASTORNO BIPOLAR.

Dada la naturaleza oscilatoria de los episodios de distinto tipo del trastorno bipolar, las hipótesis generales estiman que deben existir alteraciones en la regulación tanto de la activación como de la inhibición de los circuitos neuronales implicados en los estados de ánimo (Goodwin & Jamison 2007). Aunque se ha determinado que la esquizofrenia y el trastorno bipolar comparten características y elementos en su etiología, estableciéndose casos en los que la sintomatología parece compartir rasgos de uno y otro tipo, en el caso del TB la vinculación con el sistema cannabinoide endógeno podría deberse no tanto a la acción reguladora sobre la dopamina como a la modulación de los neurotransmisores GABA y serotonina (Glass et al., 1997; Eggen et al., 2008; Ashton et al., 2011).

Se ha buscado, por consiguiente, relacionar diferencias en la expresión de los componentes del sistema endocannabinoide con síntomas del espectro bipolar (Koethe et al., 2007), aunque no se han obtenido resultados concluyentes. En este sentido, los estudios de pacientes con trastorno bipolar que además presentan consumo, han podido comprobar que los episodios de manía estarían exacerbados por el consumo de cannabis, por lo que se teoriza que un tono endocannabinoide elevado por causas endógenas podría producir por sí mismo este tipo de episodios (Agrawal et al., 2011). Por otra parte, la baja actividad de los receptores CB1 podría contribuir a generar depresión, lo cual ha sido descrito también para el trastorno unipolar o depresión mayor. Sin embargo, los resultados no han sido replicados.

Por otra parte, en los estudios de asociación genética se encuentran distintos polimorfismos dentro de los genes CNR1, CNR2 y FAAH asociados con el trastorno bipolar (Monteleone et al., 2010; Minocci et al., 2011) y polimorfismos del gen CNR1 con la respuesta al tratamiento con antidepresivos (Domschke et al., 2008). Esto indicaría una implicación directa de la actividad y de la pérdida del equilibrio endocannabinoide en esta patología.

3.2.5.3. PATOLOGÍA DUAL.

El papel del sistema cannabinoide endógeno en el trastorno por uso de sustancias y en la patología dual es complejo y presenta diferentes niveles.

Inicialmente, cabe destacar que el sistema endocannabinoide está relacionado con los TUS de un modo general y no solo con el consumo de cannabis. De este modo se han detectado alteraciones en los niveles de endocannabinoides en el consumo de sustancias como el alcohol, la nicotina, la cocaína o los derivados opioides (Justinova et al., 2009). A su vez, los niveles de endocannabinoides modularían la transmisión dopaminérgica en los sistemas de recompensa cerebrales vinculados con las conductas de consumo (Lupica & Riegel, 2005).

La investigación genética ha aportado conjuntamente evidencias de la relación del sistema endocannabinoide con el consumo de múltiples sustancias de abuso. Así, por ejemplo, se han encontrado polimorfismos dentro de los genes CNR1 (Zhang et al., 2004; Chen et al., 2008; Clarke et al., 2013) y FAAH (Flanagan et al 2006; Tyndale et al., 2007; Schacht et al., 2009) asociados al riesgo de presentar consumo. Incluso, aparecen polimorfismos en los cuales cada uno de los alelos es de riesgo para sustancias distintas (Tyndale et al., 2007). Esto indica que cada genotipo tiene en sí mismo diferentes vulnerabilidades y a la vez resistencias, y pone de manifiesto el papel que juega el sistema endocannabinoide en el procesamiento neurológico de los refuerzos asociados al consumo, ya sea de cannabis o de otras sustancias.

Como se ha referido en apartados anteriores, existe una elevada prevalencia de TUS en las poblaciones de pacientes con esquizofrenia y trastorno bipolar. Esta evidencia epidemiológica de un estado comórbido caracterizado por un trastorno psiquiátrico y un trastorno por uso de sustancias ha tenido diferentes explicaciones agrupadas en tres modelos fundamentales (Mueser et al., 1998). Cada teoría está apoyada por determinados resultados experimentales, pero existen también evidencias contradictorias además de hallazgos que pueden ajustarse a uno u otro modelo en función de su interpretación. En cualquier caso, dada la vinculación de los mismos genes, así como de las proteínas codificadas por estos, tanto en el desarrollo de TUS como de esquizofrenia y trastorno bipolar, se hace patente que existen mecanismos biológicos compartidos, si bien la relación entre ellos no está por completo esclarecida (van der Stelt & Di Marzo, 2003; Ujike & Morita 2004).

3.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.

El glutamato es considerado como el principal y más abundante neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso (Niciu et al., 2012), estimándose que en torno a dos tercios de las neuronas del cerebro son glutamatérgicas (Francis, 2003). Las proyecciones axonales de estas neuronas se extienden por múltiples áreas del encéfalo y de la médula, así como por el sistema nervioso periférico, en complejos circuitos de regulación.

3.3.1. SÍNTESIS E INACTIVACIÓN DEL GLUTAMATO.

El glutamato es un aminoácido no esencial que forma parte de las proteínas. Se trata, además, de un intermediario fundamental en las rutas metabólicas de aminación y desaminación comunes a todas las células.

En el caso del sistema nervioso, el precursor más importante es la glucosa sanguínea (Shen et al., 1999), que es captada y convertida a lactato por los astrocitos, exportándolo posteriormente al espacio extracelular, de donde es captado por las neuronas. A partir de él, mediante sucesivas reacciones, se obtiene el α -cetoglutarato, que por una reacción de transaminación catalizada por diferentes transaminasas se convierte en glutamato (Broman et al., 2000).

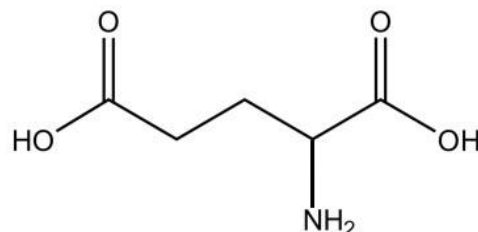


Figura 10. Estructura del glutamato.

La inactivación se realiza por la acción de la enzima glutamina sintetasa mediante adición de un grupo amino a la molécula. Existe también una segunda vía de eliminación de glutamato, en este caso a través de la reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa, la cual recupera el α -cetoglutarato (Erecinska & Silver, 1990).

Algunas neuronas presentan, además, la enzima glutaminasa localizada en la membrana mitocondrial interna, lo que permite a su vez la conversión de glutamina en glutamato. La retirada del glutamato del espacio sináptico puede realizarse tanto por los astrocitos como por las neuronas mediante transportadores dependientes de Na^+ . Se

han descrito 5 transportadores (O'Shea, 2002; Niciu et al., 2012): EAAT1 (de expresión en neocórtex y cerebelo exclusivamente en astrocitos), EAAT2 (aparece mayoritariamente en astrocitos del prosencéfalo pero puede detectarse en neuronas), EAAT3 (de expresión en neuronas presinápticas GABAérgicas), EAAT4 (en dendritas de células de Purkinje) y EAAT5 (transportador específico de retina).

3.3.2. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.

3.3.2.1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS.

Son receptores que forman un canal iónico por el que circulan cationes cuando son activados por el neurotransmisor, estando generalmente localizados en la membrana de la neurona postsináptica. De este modo, se produce la entrada de calcio y sodio y la salida de potasio, transmitiendo el potencial excitatorio (Madden, 2002). Son, por lo tanto, los responsables de los efectos de despolarización, transmisión del impulso y de la respuesta rápida de la sinapsis.

Existen tres tipos de receptores que se designan en función de la molécula (agonista sintético) que presenta capacidad de unión a ellos (Bergles et al., 1999).

-Receptores de N-metil-D-Aspartato (NMDA).

Presentan localización pre y postsináptica aunque son de presencia mayoritaria en la segunda. En la localización presináptica tendrían una función de retroinhibición (Clarke & Collingridge, 1996). Este tipo de receptor es estimulado por glutamato y NMDA, pero se pueden unir también el quisqualato y el aspartato, que lo activan en menor medida. Poseen lugares de unión a moléculas que cumplen una acción moduladora, entre las cuales se encuentran la ketamina (Krystal et al. 1994) y la fenciclidina (Javitt, 2007).

El receptor se conforma como un gran complejo proteico a partir de la asociación 4 o 5 subunidades NR en una estructura heteromérica (Seeburg et al., 1995). La combinación implica al menos 1 de las 8 isoformas de NR1 que se combina con cualquiera de las de subtipo NR2A a NR2D. En función de las posibles combinaciones que pueden establecerse, el receptor tendrá unas propiedades diferentes tanto en su afinidad como en su capacidad de respuesta. También ha sido descrita la subunidad NR3A, cuyo estudio en esquizofrenia indica que posee un papel fundamental en las etapas del neurodesarrollo del córtex prefrontal, tanto en la infancia como en las etapas prenatales (Henson et al., 2008). Existe, también, una subunidad NR3B de expresión en el hipocampo (Bendel et al., 2005).

-Receptores de Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA).

Son los responsables de la respuesta rápida de la neurona postsináptica por unión de glutamato (Palmer et al., 2005), aunque estos receptores también presentan afinidad por AMPA, kainato y quisqualato. Están formados por subunidades que pueden ser de cuatro tipos y que están codificadas por los genes GLUR1 a GLUR4. La estructura final conforma un receptor heterologomérico que, además de los sitios de unión para el neurotransmisor, presenta un sitio de unión con capacidad moduladora al cual se unen las benzodiazepinas. Aunque son los responsables de la aparición rápida del potencial postsináptico, también están implicados en la potenciación a largo plazo (Holtmaat et al., 2006), pues se ha encontrado que están regulando, en el hipocampo, los mecanismos moleculares de memoria (Whitlock et al., 2006).

-Receptores de Kainato.

Están formados por subunidades de dos familias de genes diferentes. Por un lado las subunidades codificadas por los genes GLUR5, GLUR6 y GLUR7, las cuales serían las subunidades que forman propiamente el canal. La segunda familia está compuesta por los genes KA1 y KA2, aunque no se conoce completamente su función, pues en ocasiones forman receptores virtualmente inactivos (Alt et al., 2004; Niciu et al., 2012). No obstante, parecen actuar como modificadores de las propiedades dinámicas y cinéticas de la localización en la que se encuentran, tanto presináptica como postsináptica, por lo que el complejo tetramérico que configuran tendría un papel modulador en la liberación del neurotransmisor (Smart & Paoletti, 2012). En cuanto a los ligandos que se unen a estos receptores, presentan afinidad por kainato y glutamato, pero también por AMPA y NMDA, aunque por estas dos últimas la afinidad es mucho menor.

3.3.2.2. RECEPTORES METABOTRÓPICOS.

Los receptores metabotrópicos del glutamato son receptores acoplados a proteína G, ya sea de tipo activadora o inhibidora (Willard & Koochekpour, 2013). Se han descrito ocho subtipos agrupados en 3 grupos. Estructuralmente, presentan similitudes con otros receptores metabotrópicos, es decir, poseen 7 dominios transmembrana (Nakanishi, 1994). Su activación implica cambios moleculares prolongados que requieren variaciones en la expresión génica. Por ello, en su conjunto, son los responsables principales de la potenciación a largo plazo (LTP) y por tanto en el establecimiento de los esquemas de memoria y de aprendizaje (Conn & Pin, 1997). De modo general, su ubicación presináptica los presenta como receptores

con capacidad de regulación de la sinapsis al establecerse una señalización retrógrada (Gereau & Conn, 1995).

-Grupo I.

Está integrado por los receptores mGluR1 y mGluR5. Se unen a proteína G activadora actuando sobre PL-C, PK-C y sobre los canales de calcio del retículo endoplasmático. Los receptores de este grupo se localizan tanto presinápticamente (Hubert et al., 2001) como postsinápticamente (Mateos et al., 2000). En ambos casos su localización es perisináptica, es decir, quedan en la periferia de la conexión. Regulan a los receptores de NMDA y AMPA, modulando consecuentemente la excitabilidad de la neurona (Rosenbrock et al., 2010).

-Grupo II.

Está formado por los receptores mGluR2 y mGluR3. Tienen alta afinidad por el glutamato (Schoepp et al., 1999) y realizan su función a través de su unión a proteína G_i o G_o , por lo que la unión del ligando al receptor conlleva la inhibición de la adenilato ciclasa y la activación de canales de K^+ (Conn & Pin, 1997). La distribución en la sinapsis es similar a la del grupo I, de modo que pueden situarse presinápticamente y postsinápticamente, pero siempre en la región periférica. Pueden localizarse además en células gliales (Petralia et al., 1996). Se estima, por lo tanto, que estos receptores poseen una función eminentemente inhibitoria.

-Grupo III.

El tercer grupo de receptores metabotrópicos es el más amplio, estando formado por los receptores mGluR4, mGluR5, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Estos receptores están asociados a proteína G inhibitoria, por lo que consecuentemente su activación está vinculada con el descenso de AMPc. En la sinapsis actúan como autorreceptores presinápticos (Conn & Pin, 1997) y por tanto poseen una función moduladora sobre la liberación del glutamato. Por su parte, mGluR6 está además vinculado a GMPc fosfodiesterasa. Su respuesta va a mediar cambios plásticos en la neurona que generalmente implican expresión génica, así por ejemplo, la activación de mGluR5 produce modificación local en las dendritas sobre la traducción de ARNm de diversos genes (Weiler & Greenough, 1993). A su vez, estos mecanismos formarían parte de los cambios moleculares que suceden en la depresión a largo plazo (LTD) en las neuronas.

3.3.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN LAS ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS.

El sistema glutamatérgico es uno de los más importantes sistemas de neurotransmisión en el cerebro, tanto por el elevado porcentaje de neuronas y vías que forman parte de él como por las funciones en las que está implicado. En consonancia con ello, ha sido objeto de investigación su relación con las diferentes enfermedades psiquiátricas, lo cual engloba tanto a la comprensión de los mecanismos etiológicos de las patologías referidas como al establecimiento de posibles estrategias terapéuticas. Al igual que en los sistemas de neurotransmisión tratados anteriormente, las evidencias en las que se sustentan las hipótesis iniciales parten, en gran medida, de los estudios realizados en torno a los efectos producidos sobre el sistema por el tratamiento con diferentes fármacos y por el consumo de sustancias, ya sea éste agudo o crónico.

3.3.3.1. ESQUIZOFRENIA.

En cuanto a la esquizofrenia, la fenilciclohexilpiperidina (fenciclidina o PCP) se caracteriza por sus propiedades psicotomiméticas y ha demostrado ser un antagonista no competitivo de los receptores de NMDA (Javitt & Zukin, 1991). Además, es destacable que el cuadro de síntomas propios que produce presenta un parecido mucho mayor con las características de la esquizofrenia que el que se genera a partir otras sustancias como la cocaína o las anfetaminas, las cuales interaccionan con el sistema dopaminérgico (Jentsch & Roth, 1999). Conjuntamente, se ha referido que los agonistas que facilitan o estimulan la transmisión glutamatérgica pueden ser utilizados como fármacos que mejoran los síntomas negativos, si bien no parecen tener un efecto considerable sobre los positivos (Goff & Coyle, 2001).

No obstante, las evidencias obtenidas en torno a la vinculación del sistema glutamatérgico no excluyen ni refutan las teorías que se sustentan en la participación de otros sistemas, pues parte de estas evidencias relacionan la señalización vía glutamato con otros sistemas de neurotransmisión. Así, por ejemplo, otro de los antagonistas de los receptores de NMDA, el MK-801, al igual que la PCP, produce al ser administrado con regularidad un aumento de la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas y un aumento del propio metabolismo de la dopamina en el área tegmental ventral, demostrando así que estos dos sistemas están relacionados (Murase et al., 1992). En concordancia con esto, también se ha encontrado que la PCP y el MK-801 aumentaban la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens (Svensson et al., 1995; Mathé et al., 1999).

Esta relación entre los dos sistemas se pone igualmente de manifiesto en experimentos realizados en los que se observa que la hiperactividad locomotora inducida por antagonistas de receptores NMDA es inhibida por 6-hidroxidopamina o por los neurolépticos antagonistas de dopamina (French et al., 1985; Leriche et al., 2003). Para subrayar esta vinculación puede observarse que el receptor de dopamina D1 está modulando la respuesta glutamatérgica. De este modo, se ha visto que los agonistas de D1 aumentan la actividad de los receptores NMDA de glutamato (Chen et al., 2004b). En el área tegmental ventral los receptores D1 no se sitúan en las neuronas dopaminérgicas sino que se encuentran en la membrana presináptica de las neuronas glutamatérgicas que provienen de la corteza prefrontal y del área tegmental dorsolateral. El receptor D1 está unido a proteína G activadora, de modo que la unión al ligando supone la producción de AMPc (Cooper et al., 1996). En este caso, se ha encontrado que la activación de D1 produce fosforilaciones vía PK-A que modulan la actividad de los receptores de NMDA (Nishi et al., 2002). Han sido establecidas, de este modo, vinculaciones entre diferentes sistemas de neurotransmisión que establecen relaciones bidireccionales y sinérgicas que podrían explicar distintas patologías (McMillen et al., 2013). Por todo ello, puede establecerse que la hipótesis glutamatérgica y dopaminérgica no serían excluyentes, sino que podrían ser complementarias entre sí. A lo expuesto puede añadirse que los receptores CB1 se localizan presinápticamente en las neuronas glutamatérgicas, cumpliendo una función de regulación retrógrada, y que a su vez están colocalizados con receptores D1 en la vía dopaminérgica nigroestriatal. En este sentido, se ha observado que los agonistas del receptor CB1 inhiben la acción de los agonistas del receptor D1 (Meschler & Howlett, 2001). Por lo tanto, existe una conexión entre los sistemas dopaminérgico, endocannabinoide y glutamatérgico tanto directa como indirecta.

3.3.3.2. TRASTORNO BIPOLAR.

En lo referente al trastorno bipolar, se ha observado que los fármacos inhibidores de la liberación de glutamato eran efectivos en el tratamiento de la patología (Xie & Hagan, 1998; Bott & Raskind, 1999; Chengappa et al., 2001). En consonancia a estas evidencias, se ha detectado un aumento del ARNm del gen VGluT1 (codificante para el transportador vesicular 1 de glutamato) que indica un aumento de la transmisión glutamatérgica en el córtex cingulado anterior en pacientes con trastorno bipolar. Este aumento era además característico y diferencial con respecto a los pacientes con esquizofrenia que formaban parte del estudio (Eastwood & Harrison, 2010).

Recientes hallazgos han descrito que en pacientes con trastorno bipolar aparecen diferencias en la densidad postsináptica (PSD) que correlaciona con las manifestaciones clínicas. Estas diferencias en la densidad se deben a cambios en la expresión de proteínas estructurales y funcionales. Entre ellas, se encuentran las proteínas implicadas en la señalización cruzada de segundos mensajeros entre las vías dopaminérgicas y glutamatérgicas y, por lo tanto, sus alteraciones estarían afectando a la plasticidad sináptica (Bartolomeis et al., 2014).

De modo similar, las técnicas basadas en espectroscopia de resonancia magnética, que han permitido tomar medidas neuroquímicas in vivo, muestran la existencia de alteraciones en el sistema glutamatérgico (Gigante et al., 2012) y en las mitocondrias (Stork & Renshaw, 2005; Manji et al., 2012), ya sea de manera independiente o relacionada (Kondo et al., 2014).

3.3.3.3. PATOLOGÍA DUAL.

La implicación del sistema glutamatérgico en las conductas de consumo de sustancias ha sido observada, siendo muy numerosos los trabajos que muestran evidencias al respecto (Cornish et al., 1999; Tzschentke & Schimdt, 2003; Uys & Lalumiere, 2008; McMillen et al., 2013). Es importante destacar que esta relación no está limitada a las sustancias que interactúan directamente con elementos del sistema glutamatérgico a nivel molecular, por el contrario, se encuentra que existe una implicación en el consumo de sustancias como la cocaína (Itzhak & Martin, 2000) o la heroína (Wang et al., 2012). De este modo, se reincide en el planteamiento que estima que este sistema podría presentar relaciones directas o indirectas (pero no obstante cruciales) con otros sistemas, de manera que el conjunto formaría el sustrato biológico subyacente a este tipo de trastornos, abriendo con ello posibles estrategias terapéuticas (McClure et al., 2014).

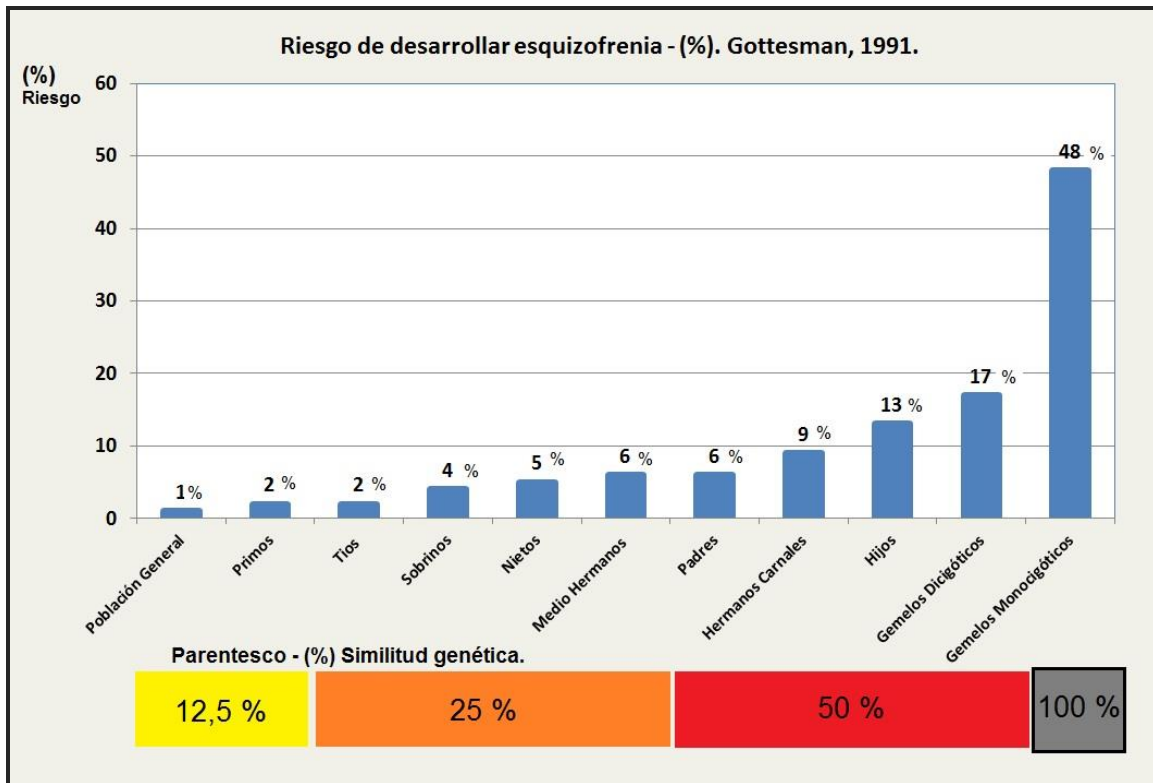
En esta línea de investigación se ha evidenciado la utilidad de diversos fármacos que interactúan con la señalización glutamatérgica en el tratamiento de los trastornos por uso de sustancias. Así, por ejemplo, el topiramato, la lamotrigina y el modafinilo han sido utilizados en el tratamiento de la adicción a cocaína (Martínez-Raga et al., 2009), siendo reseñable que los mismos medicamentos han demostrado eficacia en el tratamiento de trastornos de tipo psicótico o bipolar. Con ello, se pone además de manifiesto la compleja red de interacciones que unen a los distintos sistemas de neurotransmisión con las patologías psiquiátricas y los trastornos por uso de sustancias.

4. ESTUDIOS GENÉTICOS EN ESQUIZOFRENIA Y TRASTORNO BIPOLAR.

Las actuales investigaciones genéticas sobre esquizofrenia y trastorno bipolar se engloban, fundamentalmente, dentro del paradigma que postula la existencia de factores genéticos que predisponen a padecer dichas enfermedades (Sawa & Snider, 2002). Estos factores genéticos son interpretados como elementos que incrementan el riesgo de base presente en la población general, originando así una vulnerabilidad debida al genotipo pero no una determinación de adquirir estas patologías, pues los factores genéticos estarían en interacción con factores ambientales de diferente naturaleza (Caspi & Moffitt, 2006). Es en la interacción compleja entre los factores genéticos y los ambientales donde se produciría la causa etiológica de las enfermedades psiquiátricas. De este modo, los factores de riesgo genético en esquizofrenia y trastorno bipolar se valoran como un aumento en la probabilidad de desarrollar la enfermedad en función del genotipo presente.

Considerados los diferentes cuadros clínicos como fenotipos a estudiar desde la perspectiva genética, debe apreciarse que el fenotipo siempre es el resultado de una interacción entre el genotipo y el ambiente (Falconer & Mackay, 1996). La expresión de los genes está condicionada por la acción del entorno sobre el organismo durante toda la vida del individuo, produciendo como consecuencia que las características observables no sean una correspondencia unívoca del genotipo (Dobzhansky, 1977); por el contrario, existe un rango fenotípico, que puede ser más o menos amplio, para cada genotipo posible. Dicho rango se denomina norma de reacción. A su vez, las normas de reacción de los distintos genotipos pueden solaparse, de modo que existirán características y valores fenotípicos que puedan deberse a diferentes genotipos. Por este motivo, resolver la causa genética de determinadas patologías, o fenotipos, conforma una cuestión de resolución compleja que requiere de múltiples aproximaciones metodológicas (Chanock et al., 2007; Porteous, 2008)

La primera evidencia de la existencia de un componente genético en la esquizofrenia y el trastorno bipolar proviene de la variación del riesgo de padecer la enfermedad en función de que existan antecedentes familiares, es decir, en función del parentesco que se posea respecto a un familiar diagnosticado positivamente (Gottesman, 1991). La estimación del riesgo puede realizarse determinando el parentesco que presentan los diferentes individuos afectados dentro de una misma familia, es decir, el riesgo es deducido a partir de la epidemiología de ambos síndromes mediante la concordancia de los casos.



Gráfica 1. Representación gráfica de los porcentajes de riesgo de padecer esquizofrenia frente al parentesco respecto a un familiar ya diagnosticado. Los grados de parentesco equivalen a porcentajes de similitud genética. (Gottesman, 1991).

En este sentido, para un diagnóstico de esquizofrenia, los hermanos gemelos monocigóticos (con un 100% de la variabilidad genética en común) presentan una concordancia del 46% al 50% (Cardno & Gottesman, 2000; Allan et al., 2009). Esta concordancia, o riesgo, pasa a ser de aproximadamente un 11% para los familiares en primer grado, correspondiendo a una carga de la variabilidad genética común del 50%. A continuación se sitúa el parentesco familiar en segundo grado, es decir, con un 25% de la variabilidad genética compartida, al cual corresponde un 4% de riesgo promedio. Por último, se sitúa el riesgo de un 1% para la población general en su conjunto, cuya variabilidad y similitud será la que caracterice a dicha población concreta, aunque puede aceptarse una estimación de aproximadamente un 12,5% (Gottesman, 1991; Cardno et al., 2002; Lichtenstein et al., 2009).

Por consiguiente, se aprecia que el riesgo va incrementándose según aumenta el grado de parentesco respecto a un paciente que haya presentado la enfermedad. Sin embargo, este aumento del riesgo no es lineal sino que traza una curva que puede aproximarse a una curva exponencial.

El porcentaje de gemelos monocigóticos discordantes (uno de ellos afectado por la patología y el otro no) puede tomarse como una aproximación, aunque no una medida directa, de la carga genética y ambiental dentro de la patología. La relación

entre genes y ambiente se pone también de manifiesto en la incidencia de la enfermedad en estudios realizados sobre la descendencia de este tipo de gemelos (Gottesman & Bertelsen, 1989). En estos trabajos se observa que la incidencia de esquizofrenia entre las descendencias de gemelos discordantes es la misma independientemente del hermano del que se trate. Esto indica que la predisposición genética está presente en ambos, manifestándose solamente en uno de ellos. Estos factores genéticos son heredados a su vez por las dos progenies con una distribución similar, de modo que en la segunda generación la frecuencia de casos es la misma en ambos grupos. Los estudios realizados con gemelos monocigóticos que son separados al nacer y educados en ambientes adoptivos confirman estos hallazgos. En estos seguimientos se observa que el riesgo aparece con independencia de los antecedentes de los padres adoptivos, tanto en el sentido positivo como negativo (Gottesman & Shields, 1982).

La influencia del ambiente no sólo puede valorarse en la comparación de gemelos, sino que el porcentaje de riesgo para la categoría de familiares en primer grado aporta una información muy significativa (ver Gráfica 1). En los resultados ofrecidos por Gottesman (1991) se aprecian claras diferencias entre el tipo de parentesco en primer grado y el porcentaje de riesgo atribuido, de modo que la distribución no es homogénea. Destaca, por ejemplo, el hecho de que los gemelos dicigóticos (hermanos mellizos) poseen un mayor riesgo o porcentaje de concordancia que los hermanos de distintos embarazos. El grado de similitud genética entre ambos tipos de hermanos es el mismo, por lo que esta mayor concordancia de los mellizos pone de manifiesto que la similitud ambiental durante su desarrollo, embrionario o posnatal, es un factor importante en la aparición de la patología (Lewis & Levitt, 2002).

Los estudios equivalentes realizados en el trastorno bipolar ofrecen conclusiones muy similares pero con valores superiores. De este modo, la concordancia en gemelos monocigóticos es del 70 % y del 15% en mellizos o gemelos dicigóticos, ya sea que se críen y eduquen juntos o separados (Allen, 1976; Bertelsen et al., 1977). Sin embargo, existe gran discrepancia a este respecto, pues estudios recientes estiman valores considerablemente inferiores, dando como resultado una concordancia de entre un 38,5% y un 43% para gemelos monocigóticos, y de un 4,5% a un 5,6% para gemelos dicigóticos (Kendler et al., 1995; McGuffin et al., 2003; Kieseppa et al., 2004).

No obstante, pese a la información obtenida de estas investigaciones, no han podido determinarse modelos de herencia definidos. Por consiguiente, aunque se estiman valores de heredabilidad elevados, se concluye que ambas enfermedades no

siguen un patrón discernible que se ajuste a un modelo de herencia conocido, ya sea un modelo mendeliano o de mendelismo complejo. Este es, en consecuencia, el primer aspecto de los estudios genéticos en patologías psiquiátricas que ha causado que sean englobados dentro de lo que se considera genética compleja (O'Donovan et al., 2009).

La siguiente cuestión relevante que debe evaluarse es la elevada prevalencia de estas enfermedades en la población, la cual es mucho mayor que la de cualquier enfermedad monogénica (Kessler et al., 2005; Messias et al., 2007).

Estos dos aspectos, la elevada prevalencia y el modelo de herencia complejo, configuran conjuntamente la hipótesis principal sobre la que se sustentan los estudios genéticos en esquizofrenia o trastorno bipolar (Porteous, 2008). Bajo estas premisas se concluye que las variaciones genéticas que producen riesgo de padecer la enfermedad son variedades comunes, ampliamente distribuidas en la población, cuya acción sobre el fenotipo implica múltiples factores, ya sean estos ambientales o consecuencia de las interacciones con otros genes. De este modo se explica que no puedan seguirse patrones claramente discernibles de herencia pese a la evidencia de una predisposición genética. Así pues, generalmente, los estudios genéticos sobre esquizofrenia y trastorno bipolar se centran en polimorfismos genéticos de amplia distribución dentro de la población (Lewis et al., 2003; Sawa & Snyder, 2002). El hecho de que los alelos que predisponen al desarrollo de estas patologías sean variedades comunes, ha llevado a plantearse bajo qué mecanismos evolutivos estos alelos han alcanzado frecuencias tan elevadas en la población y cuáles son los factores que compensan la fuerte presión selectiva (Keller & Miller, 2006; Crow, 2006), hasta el punto de que esta persistencia de los alelos de riesgo ha sido definida como “la paradoja central de la genética de la esquizofrenia” (Doi et al., 2009).

No obstante, el planteamiento de variaciones genéticas comunes no excluye la existencia de mutaciones con un peso determinante en estas patologías, pues algunas ya han sido descritas dentro del espectro psicótico. Una de las más importantes es la translocación balanceada del gen DISC1 (*disrupted in schizophrenia 1*). En esta mutación, descubierta en una familia escocesa (Millar et al., 2000), ha podido determinarse no sólo la existencia de una mutación vinculada al desarrollo de esquizofrenia, sino que ha quedado constatado que en la misma familia aparecen diversos síndromes psiquiátricos ligados a los portadores de la translocación (Blackwood et al., 2001), entre ellos el trastorno bipolar. Esto ha supuesto un respaldo a resultados anteriores que ya marcaban el solapamiento genético existente entre

estos síndromes y está en consonancia con estudios más recientes (Lichtenstein et al., 2009).

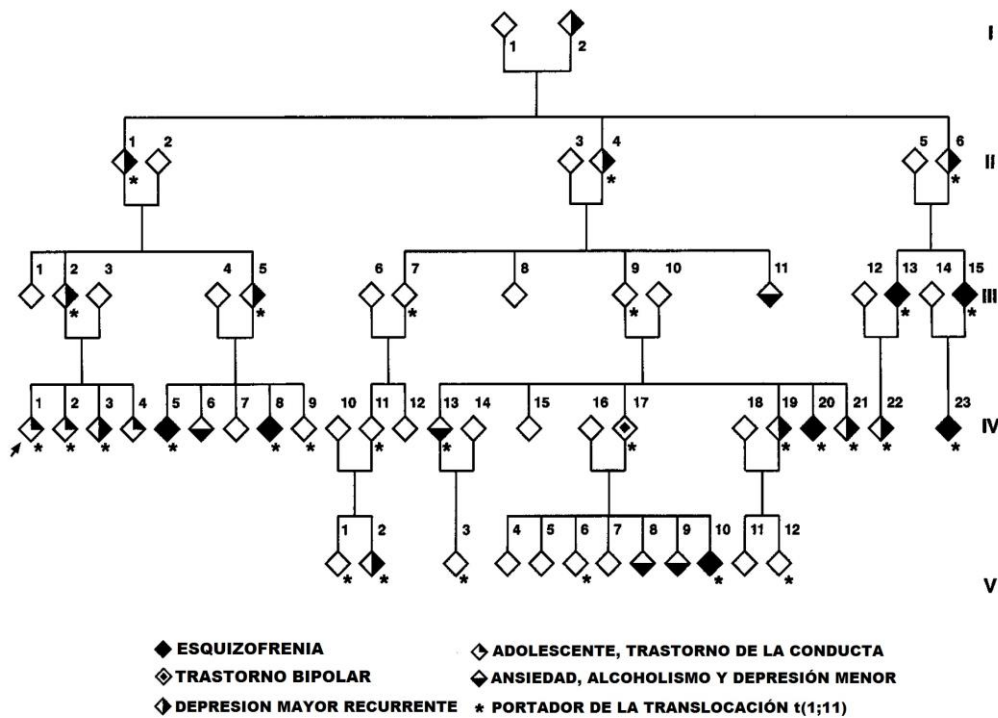


Figura 11. Árbol genealógico en el que se describe por primera vez la translocación del gen DISC1 ligada a la aparición de esquizofrenia y de otros trastornos psiquiátricos (Blackwood et al., 2001).

Los hallazgos en las investigaciones sobre el gen DISC1 demuestran dos hechos importantes, primero, que pueden existir mutaciones individuales que causen patología psiquiátrica y, segundo, que desde un punto de vista genético la esquizofrenia, el trastorno bipolar o los trastornos por uso de sustancias, pueden estar relacionados de forma similar a lo que ocurre en la mutación de este gen (Millar et al., 2007; Kamiya et al., 2005). Podrían existir, consecuentemente, otras mutaciones en la población que produjeran patologías psiquiátricas en un determinado número de casos. Estas mutaciones producirían fenotipos equivalentes, es decir, serían fenocopias. La hipótesis de las fenocopias supone que diferentes genotipos en distintos genes, o conjuntos de genes, pueden producir el mismo fenotipo o fenotipos clínicamente similares, lo cual puede expresarse también como un solapamiento de las normas de reacción de los distintos genotipos. Así pues, cada genotipo de riesgo ofrecería la explicación a un número determinado de casos pero no sería extensible a toda la población de pacientes.

Existen, además, investigaciones que han puesto de manifiesto una posibilidad que podría considerarse intermedia entre las dos anteriores. Estas investigaciones son

aquellas que han encontrado una importante influencia para el desarrollo de las patologías psiquiátricas de los denominados alelos raros (Cirulli & Goldstein, 2010). Estos alelos o variedades raras son considerados como variaciones de un gen que, si bien no llegan a considerarse mutaciones como tales, presentan una frecuencia en la población muy baja. A su vez, el peso sobre el desarrollo de la enfermedad parece ser mayor que el de los polimorfismos comunes pero menor que el de las mutaciones. A este respecto, han sido especialmente descritas las variaciones en el número de copias (CNVs), es decir, variaciones en la repetición de una determinada secuencia que son generadas por deleciones o duplicaciones superiores a 1 Kb (kilobase). Este tipo de polimorfismo presenta una gran diversidad entre individuos (O'Donovan et al., 2009; Kirov et al. 2009; Xu et al., 2008). Ejemplos de estos hallazgos son las variaciones encontradas en los genes CHNRA7 (Kirov et al., 2009), NRXN1 (Rujescu et al., 2009; Südhof, 2008) y NXP2 (Kirov et al. 2009) entre otros. Es destacable que estos resultados ofrecen, además, un claro solapamiento de los genes vinculados entre la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Craddock et al., 2009), pero también con patologías del espectro autista (Wang et al., 2009; Sebat et al., 2009; Glessner et al., 2009), abriendo con ello, aún más, la discusión sobre los límites moleculares que diferencian cada una de las enfermedades.

Todos los descubrimientos conforman, en cualquier caso, un paradigma conceptual sobre la herencia de la esquizofrenia y del trastorno bipolar en el cual pueden y deben compatibilizarse modelos monogénicos, oligogénicos y poligénicos, postulándose que en la población clínica va a existir una mezcla de las diversas situaciones posibles (O'Donovan et al., 2009; Craddock et al., 2009; Porteus, 2008; Risch, 1990).

La acción de cada uno de los múltiples loci dentro de todo el genoma configuraría un sumatorio (Tsutsumi et al., 2011) que daría como resultado el riesgo general de padecer la enfermedad (siempre en función de las interacciones con el ambiente), existiendo loci de bajo peso específico y loci altamente determinantes. El estudio de esta situación, en la cual aparecen simultáneamente genes y polimorfismos de elevada influencia junto a otros de influencia menor, se ve ampliamente desarrollado en la investigación de los caracteres cuantitativos y los loci implicados en ellos, denominados QTLs, de sus siglas en inglés (*quantitative trait loci*). En las enfermedades de tipo psiquiátrico puede aplicarse esta metodología cuando un fenotipo es claramente cuantificable y, por tanto, cuando puede establecerse una escala: como pueden ser las puntuaciones obtenidas en test de memoria espacial o de trabajo siguiendo diferentes modelos neurocognitivos (Lien et al., 2010; Xiang et al.,

2012; de Jong et al., 2013). Mediante esta metodología se valora, por lo tanto, el peso o magnitud de la influencia que tiene un locus definido para una determinada característica fenotípica.

En consecuencia a todo lo expuesto, las diversas hipótesis propuestas para interpretar la complejidad genética en esquizofrenia y trastorno bipolar implican una aproximación metodológica que abarca un espectro amplio de posibilidades. Uno de los argumentos que sostiene y reincide en la necesidad de esta perspectiva es el elevado número de genes que han dado un resultado de asociación positiva. En este sentido, cabe mencionar la base de datos denominada *SZGene* (Allen et al., 2008) que recopila los genes y polimorfismos que han ofrecido un resultado positivo por alguna de las metodologías existentes. Esta base de datos puede consultarse online y actualmente documenta 1008 genes, dentro de los cuales se han analizado 8788 polimorfismos. Todos ellos en algún momento han ofrecido al menos un hallazgo positivo. Para una estimación de 20.687 genes codificantes en el ser humano (The ENCODE Project Consortium, 2012), esto supondría una implicación de un 4,87 % de los genes en el desarrollo de la esquizofrenia. Sin embargo, del mismo modo, todos los polimorfismos investigados ofrecen múltiples estudios con resultados negativos.

Se presenta así la segunda de las grandes dificultades en las investigaciones genéticas sobre esquizofrenia y trastorno bipolar: el problema de la reproducibilidad de los resultados entre diferentes trabajos. Esto significa que a menudo los hallazgos positivos de asociación entre un polimorfismo y la enfermedad no son reproducidos por grupos de investigación diferentes. Es por ello que, en general, se considera que existe una baja consistencia en los resultados obtenidos (Colhoun et al., 2003; Sullivan, 2007). Además, no solo se pone de manifiesto que no siempre se reproducen los resultados de asociación de una patología con determinados alelos, sino que se observa que en función del estudio consultado incluso pueden aparecer asociados alelos opuestos. Este fenómeno ha sido denominado efecto flip-flop (Lin et al., 2007) y se han planteado diferentes hipótesis al respecto. Entre ellas se encuentra la consideración del diferente background genético, el cual podría ser determinante. Debe considerarse que la implicación biológica de un alelo puede estar en función de los alelos presentes en otros genes, dado que pueden establecerse relaciones de tipo epistasia entre los diferentes loci (Griffiths et al., 2000). De este modo, el valor de eficacia biológica de un alelo concreto no es constante (Dobzhansky, 1977). Por consiguiente, puede suceder que la contribución al riesgo general para desarrollar una patología concreta dependa de los alelos en otros loci diferentes, de posibles efectos pleotrópicos sobre el fenotipo y de factores ambientales, hasta el extremo de que

cambie de signo su contribución, es decir, que un alelo de riesgo en una población determinada resulte protector en una población diferente.

En síntesis, la contribución de un alelo a la patología está en función de los alelos presentes en otros genes o en otras regiones del mismo gen, valorados en su conjunto como background genético, especialmente cuando son alelos compartidos entre los diferentes miembros de una región geográfica o de una etnia concreta. Esto cobra especial interés cuando se comparan resultados a nivel internacional, pues pueden generarse resultados incongruentes y contradictorios, tal y como ha sido señalado por algunos autores (Tsutsumi et al., 2011).

4.1. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN.

La metodología tradicional de los estudios de asociación se basa en la elección de genes candidato. Para la elección de dichos genes se parte de una hipótesis previa, por la cual se estima que los genes implicados serán aquellos que codifican para las proteínas presentes en las rutas y vías que están afectadas en la etiología de la enfermedad estudiada (Elston, 2009).

En el planteamiento básico se establecen dos poblaciones diferentes, la población control y la población de pacientes, en la cuales se determinan las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los polimorfismos elegidos. La desviación de la distribución de frecuencias en la población de pacientes con respecto a la de controles permite establecer el valor biológico del alelo o del genotipo a estudio, interpretándose como de riesgo o protector según la frecuencia esté aumentada o disminuida (Laird & Lange, 2011).

Del mismo modo que para la elección de los genes candidato, la elección de los polimorfismos se realiza teniendo en cuenta su papel dentro del gen. Aunque suelen elegirse preferentemente polimorfismos funcionales, no siempre esto es posible, dado que a menudo cobra prioridad que los diferentes alelos del polimorfismo estén ampliamente distribuidos en la población (Elston, 2009). Se tiende a excluir, por lo tanto, aquellos polimorfismos que tengan uno de sus alelos en una frecuencia muy baja, dado que la aparición de un pequeño número en una de las dos poblaciones, pero no en la otra, aumenta la probabilidad de asociaciones espurias. No obstante, cualquier polimorfismo permite establecer con una probabilidad elevada las frecuencias alélicas de los polimorfismos en los loci adyacentes si se posee información del bloque de ligamiento del cual forma parte. Estos bloques se generan debido a que las posiciones próximas dentro del mapa físico del cromosoma tienden a

heredarse en combinaciones concretas de alelos, dada la baja probabilidad de que se produzca una recombinación entre las posiciones intermedias. Estas combinaciones alélicas que establecen una combinación que se hereda en bloque se denominan haplotipos y amplían la información que se obtiene del análisis de las frecuencias de un único polimorfismo (Neale, 2008). Por ello, en los estudios de asociación no se utilizan únicamente polimorfismos funcionales, sino que también se utilizan polimorfismos sinónimos o polimorfismos que están localizados en intrones, siempre que el alelo menos frecuente presente una distribución suficientemente amplia en la población.

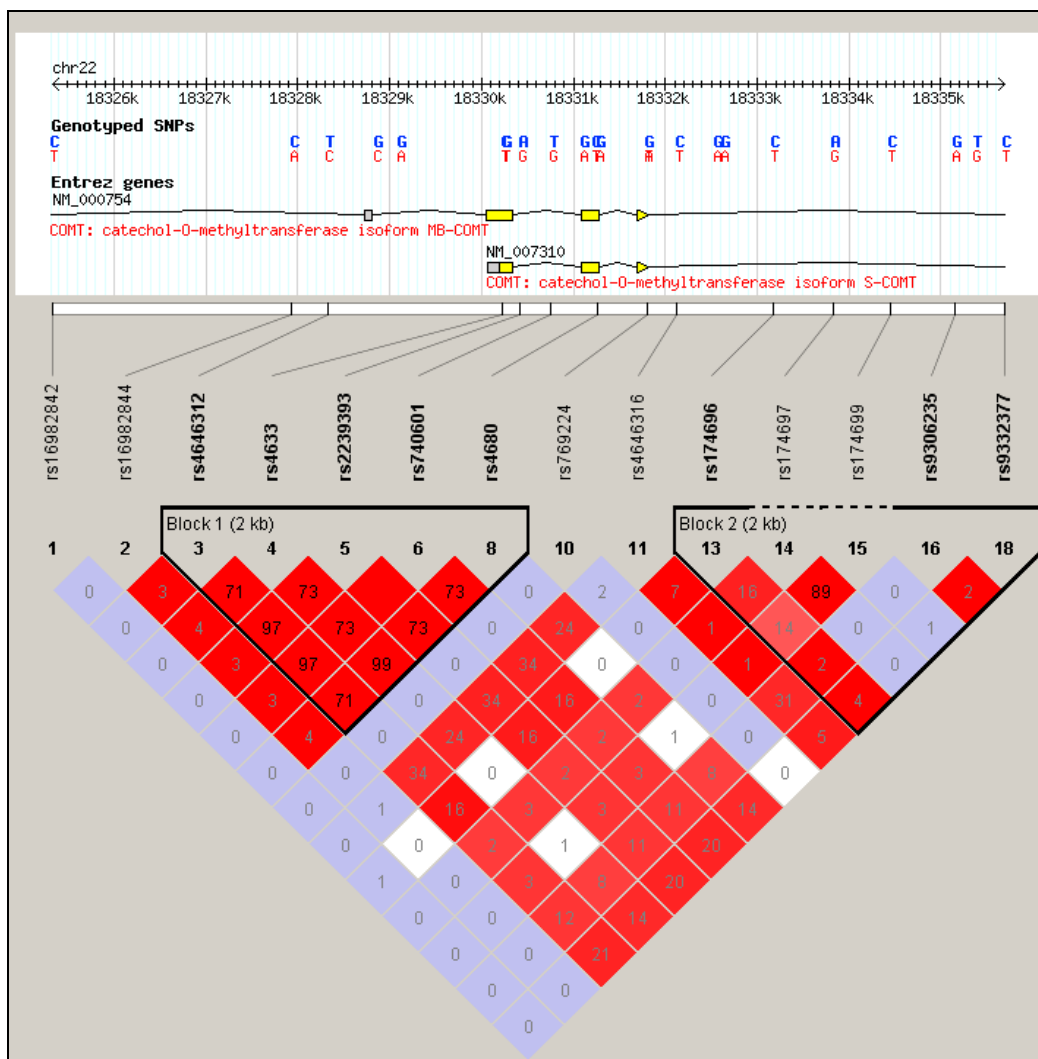


Figura 12. Bloques de ligamiento. Gen COMT. Polimorfismo 8: rs4680. Imagen obtenida desde el software Haploview 4.2.

En este sentido han aparecido plataformas como HapMap (International HapMap Consortium, 2003), en las cuales puede consultarse la información asociada a los bloques de ligamiento de las regiones cromosómicas que estén implicadas en el

estudio a realizar. Estos haplotipos son característicos de cada población y se encuentran múltiples diferencias tanto en la presencia o ausencia como en la distribución de frecuencias. No obstante, existen hallazgos que han demostrado que algunos polimorfismos sinónimos o de regiones intrónicas sí podrían tener una consecuencia funcional (Hotamisligil & Breakefield, 1991; Hunt et al., 2009; Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Por consiguiente, aunque la hipótesis inicial cuando aparece asociación de un polimorfismo no funcional con un fenotipo es que dicho locus está vinculado por desequilibrio de ligamiento a polimorfismos funcionales, la hipótesis de un valor biológico en sí mismo no debe ser totalmente descartada.

La metodología de estudios de asociación por genes candidatos ha sido ampliamente utilizada, sin embargo, también ha demostrado tener importantes limitaciones. La potencia de los resultados está directamente relacionada con el número de individuos en las poblaciones reclutadas (Slager & Schaid, 2001): cuanto menor sea el efecto que produce el gen sobre el fenotipo, más numerosas tendrán que ser las poblaciones para poder detectar estadísticamente dicho efecto y compensar la posibilidad de que aparezcan falsos negativos.

Dentro de esta metodología también existe la variante “*case-only*” (solo casos) (Khoury & Flanders, 1996). En dicha estrategia se comparan sólo poblaciones de pacientes en las que se establecen diferentes categorías o subgrupos en función de la presencia de un síntoma o endofenotipo, el cual estratifica o segrega claramente dos tipologías clínicas diferentes. Por lo tanto, en este caso, el polimorfismo y el gen estarán marcando ya no una influencia en la aparición de la enfermedad, sino la aparición de un endofenotipo que segrega con claridad a la población de pacientes en dos grupos diferenciados. Ejemplo de ello sería establecer grupos por el tipo de consumo o en función de la edad de inicio de la patología.

4.2. GENOME WIDE ASSOCIATION STUDY (GWAS).

La metodología GWAS (*Genome Wide Association Study*) es una ampliación de la metodología de los estudios de asociación (Hirschhorn & Daly, 2005). La diferencia fundamental con el planteamiento clásico reside en el hecho de que en los GWAS no se parte de una hipótesis previa ni de una selección de regiones de interés. En este caso, se distribuyen marcadores a lo largo de todo el genoma, llegando a utilizar varios cientos o miles de ellos, por lo que cada cromosoma queda cubierto en múltiples puntos, cubriéndose así todos los bloques de ligamiento, o al menos un

porcentaje muy elevado de ellos, por lo cual la potencia experimental es muy alta (Barrett & Cardon, 2006).

El elevado número de polimorfismos que se analizan en este tipo de estudios, que además suelen realizarse con poblaciones amplias, ofrece unos valores de significación muy altos (Dudbridge & Gusnanto, 2008). Inicialmente, cuando esta metodología empezó a utilizarse, había grandes expectativas puestas en ella, dado que parecía resolver el problema de la reproducibilidad de los estudios de asociación en esquizofrenia y trastorno bipolar (Lencz et al., 2007; Sullivan et al., 2007; Sklar et al., 2008; Baum et al., 2008). Sin embargo, los estudios basados en GWAS demuestran poseer las mismas características que los estudios tradicionales de asociación en esquizofrenia y trastorno bipolar, dado que se siguen obteniendo resultados diferentes e incluso contradictorios. Por lo tanto, el problema de la consistencia de los resultados permanece, posiblemente porque sigue existiendo la necesidad de interpretar el valor del diferente background genético y la comprensión de las epistasias que aparecen entre los diferentes loci (Andreasen et al., 2012).

Por tanto, ambas metodologías resultan complementarias, siendo conveniente la confirmación de las regiones de interés o marcadores señalados por los estudios de GWAs mediante estudios de asociación.

4.3. ESTUDIOS DE LIGAMIENTO.

El análisis de ligamiento se basa en el estudio de familias en las que aparecen individuos afectados (Neale, 2008). Esta metodología ha sido la más utilizada tradicionalmente para determinar las regiones cromosómicas y los genes implicados en enfermedades producidas por un único gen o por un número reducido de ellos, por lo que la utilidad en esquizofrenia y trastorno bipolar estaría limitada. No obstante, se han realizado trabajos en esta línea con resultados positivos, como ha sido el propio hallazgo del gen DISC1 (Millar et al., 2000; Marx, 2007).

El trabajo implica poseer la mayor cantidad posible de individuos que abarquen distintas generaciones dentro de una misma familia. A lo largo del genoma se van a disponer una serie de marcadores que cubran los bloques de ligamiento dentro de los cromosomas, buscando correlacionar la segregación del fenotipo patológico con uno de los marcadores. Esta metodología ofrece como limitación principal el número efectivo de individuos que puede conseguirse dentro de una familia. Considerando, además, que deben estar adecuadamente caracterizados para los rasgos de interés.

<u>Cromosoma</u>	<u>Localización (Mb)</u>
1p32.2 - 31.1	57.3 - 84.6
1p13.2 - q23.3	114.6 - 162.1
2q12.1 - 21.2	103.3 - 134.0
2q21.2 - 31.1	134.0 - 169.9
2q33.3 - 36.3	206.3 - 228.3
3p14.1 - q13.32	71.6 - 120.2
5q31.3 - 35.1	141.8 - 167.7
5q35.1 - 35.3	167.7 - 180.4
6p21.31 - 12.1	33.9 - 56.6
8p22 - 12	15.7 - 32.7

Cuadro 1. Ejemplo de regiones localizadas por análisis de ligamiento en esquizofrenia.

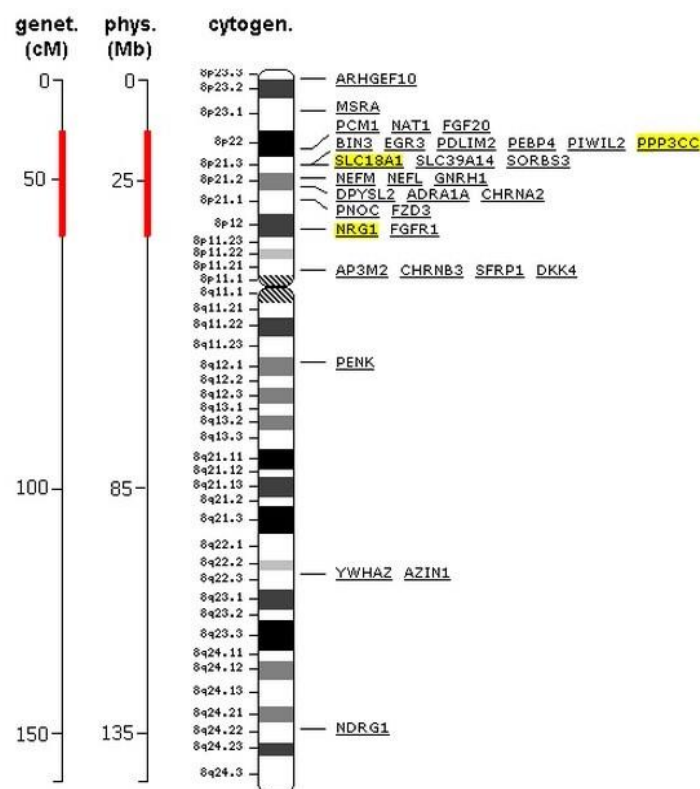


Figura 13. Mapas genético, físico y citogenético. Cromosoma 8. Estudios genéticos en esquizofrenia. La línea roja indica la región vinculada por análisis de ligamiento. Los genes señalados en amarillo son aquellos que ofrecen resultados más consistentes por estudios de asociación. Fuente: Schizophrenia Reserch Forum (www.szgene.org).

Asimismo, estos trabajos pueden ofrecer datos poco esclarecedores cuando la mutación es de baja penetrancia (Griffiths et al., 2000). En estos casos, existen individuos que portan la mutación o el genotipo determinante para la patología, pero que no expresan el fenotipo, por lo que si el número de sujetos no es alto para compensar dicha pérdida de información, pueden obtenerse resultados negativos.

En cualquier caso, aunque haya sido una de las primeras metodologías utilizadas, sigue vigente y se utiliza, dado que la posibilidad de mutaciones aún no descritas en la esquizofrenia y el trastorno bipolar sigue existiendo (Power et al., 2013). Por consiguiente, es una metodología válida para los casos en los que se dispone de una muestra familiar amplia que presenta múltiples miembros afectados en ella.

4.4. ESTUDIO DE TRÍOS: CASO-PROGENITORES (TCP).

El estudio por establecimiento de tríos es una metodología que integra el planteamiento de los estudios de asociación con el de los análisis de ligamiento en familias. Por un lado se basan en poblaciones amplias de pacientes, pero se utiliza como unidad básica el trío, compuesto por el paciente y la pareja parental correspondiente (Schaid, 1999 y 2002).

Este tipo de estudio se realiza sobre los polimorfismos que ya han dado un resultado positivo en los estudios de asociación tradicionales, siendo actualmente propuesta como metodología para confirmar o corroborar las asociaciones entre los alelos y la patología. Este tipo de test crea lo que se denomina un pseudocontrol, que sería un individuo no real, cuyo genotipo se construye a partir del alelo que cada uno de los padres no ha transmitido al hijo. De este modo, a partir de la población de pacientes, con la información parental, se elabora una población control. Posteriormente se realiza una comparación igual a la que se realiza en los estudios tradicionales de asociación (Falk & Rubinstein, 1987).

En los tríos, los padres pueden o no estar afectados, por lo que se va a obtener también la información que correlaciona los polimorfismos asociados con la heredabilidad del fenotipo vinculado. Esto se consigue mediante el test de transmisión (TDT) en el cual los padres informativos son los de genotipo heterocigoto (Schaid, 1999b).

En general esta metodología es muy útil una vez que se han detectado posibles asociaciones y se propone, por tanto, como una técnica complementaria.

4.5. GENÉTICA DE POBLACIONES.

4.5.1. EL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.

Los estudios genéticos que implican el análisis de grupos poblacionales amplios utilizan generalmente como valor referencial de control las frecuencias genotípicas esperadas en un equilibrio Hardy-Weinberg.

La ley del equilibrio Hardy-Weinberg fue desarrollada a partir de los teoremas demostrados por Godfrey Harold Hardy y por Wilhelm Weinberg de manera independientemente en 1908, los cuales fueron derivados a su vez de las leyes de Mendel. Esta ley de equilibrio es considerada como el nacimiento de la genética de poblaciones o genética evolutiva (Dobzhansky, 1977). Fundamentalmente, el equilibrio Hardy-Weinberg es un concepto teórico que establece las condiciones necesarias que deben existir para que en una población la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas se mantenga constante a lo largo de las sucesivas generaciones. Estas condiciones para que el equilibrio Hardy-Weinberg aparezca son: que el tamaño de la población sea infinito o al menos lo suficientemente grande como para que los efectos aleatorios o estocásticos (deriva genética) no sean considerables y, además, que la población sea panmíctica, es decir, que los cruzamientos sean aleatorios respecto al locus considerado (Falconer & Mackay, 1996).

Así pues, en una población dada, cuando se determinan las frecuencias genotípicas se obtienen a partir de ellas las frecuencias alélicas correspondientes en la generación de partida. Con el resultado de las frecuencias alélicas pueden calcularse las frecuencias genotípicas en la siguiente generación. Según la ley de equilibrio, si sobre esta población no actúa ninguno de los mecanismos evolutivos (mutación, migración, selección o deriva genética), las frecuencias calculadas se mantendrán constantes en el tiempo, es decir, serán frecuencias de equilibrio. Por lo tanto, para una población cualquiera, si no actúan procesos evolutivos, las frecuencias alélicas y genotípicas de equilibrio se alcanzan en una única generación y permanecen invariables. Las deducciones y consecuencias que se derivan de este teorema, o ley inicial, sustentan gran parte de las aplicaciones que se realizan de ella en el estudio de la genética de poblaciones (Crow, 1999).

En los estudios de asociación en genética humana, la aplicación del equilibrio Hardy-Weinberg sobre la población control comenzó a utilizarse para confirmar que se estuvieran valorando correctamente los diferentes genotipos (Elston, 2009). Las primeras técnicas de genotipado, como podían ser el análisis de polimorfismos mediante técnicas basadas en enzimas de restricción, podían fallar a la hora de

determinar uno de los dos tipos de homocigotos. El cálculo de las frecuencias de equilibrio serviría entonces para confirmar que la técnica utilizada no cometía un error sistemático. Conjuntamente, podría suponerse que la población control no estuviera reclutada correctamente, con dos posibilidades principales: la primera, que la población esté sesgada por una característica que está relacionada con el gen o con el polimorfismo estudiado y, la segunda, que exista consanguineidad entre los individuos de la muestra.

Que las frecuencias observadas presenten diferencias con respecto a las esperadas, en sentido estricto y una vez descartadas las posibilidades anteriores, implica que alguna de las condiciones necesarias para el equilibrio no se produce o que alguno de los mecanismos evolutivos está actuando (Ayala, 1993).

4.5.2. DESVIACIONES DEL EQUILIBRIO.

Descartados los sesgos o posibles segregaciones poblacionales en el reclutamiento de una muestra, los cuatro mecanismos evolutivos que producen un cambio en las frecuencias alélicas y genotípicas son de cuatro tipos (Falconer & Mackay, 1996).

-Mutación.

Las mutaciones son los cambios producidos en la cadena de ADN y suponen el origen de la variabilidad genética. Puede suceder que la frecuencia de uno de los alelos estudiados esté aumentando o disminuyendo por una elevada tasa de mutación. Sin embargo, en las poblaciones humanas no es habitual encontrar tasas tan elevadas que sean capaces de modificar de manera apreciable o significativa las frecuencias en las muestras obtenidas. Aunque sí se ha planteado que en las enfermedades psiquiátricas podrían estar apareciendo mutaciones *de novo* en función, por ejemplo, de una mayor edad de los padres (Crow, 2003).

-Migración.

Las frecuencias alélicas y genotípicas presentan variaciones tanto étnicas como regionales. Cuando se producen flujos genéticos de dos grupos con diferente distribución pueden encontrarse frecuencias en la muestra poblacional reclutada que no se ajusten a las esperadas en el equilibrio. En poblaciones humanas esto puede suceder y es por ello que en las investigaciones deben seleccionarse individuos del mismo origen. A su vez, en los estudios genéticos de asociación de polimorfismos con una patología, el grupo de control y de pacientes deben ser también homogéneos en

su origen (Lander & Schork, 1994). Esto es necesario por dos causas fundamentales. La primera de ellas supone que si dos poblaciones tienen distintas distribuciones de frecuencias y en las dos muestras obtenidas (control y pacientes) existe diferente porcentaje de mezcla poblacional, podrían aparecer asociaciones espurias. La segunda implicaría al background genético, dado que las epistasias presentes entre los loci podrían modificar la asociación del polimorfismo tanto en sentido positivo como negativo.

-Selección.

La selección como proceso modificador de las frecuencias génicas implica la existencia de diferencias en la viabilidad y en la fecundidad de cada genotipo. De este modo cada genotipo posee una potencialidad diferente para transmitirse a la siguiente generación, lo cual se denomina eficacia biológica, valor adaptativo o valor selectivo (Falconer & MacKay, 1996). Cuando un genotipo está sometido a una presión selectiva, va a existir una diferencia entre la frecuencia observada y la esperada en el equilibrio. Este factor es cuantificado a partir del valor de *fitness*, es decir, el valor que indica en qué medida un genotipo es transmitido a la siguiente generación.

-Deriva genética.

En el concepto de deriva genética se incluyen todos aquellos fenómenos que afectan a la transmisión de los alelos pero que no pueden cuantificarse o predecirse, es decir, aquellos que son considerados aleatorios o en los que interviene el azar (Dobzhansky, 1977). Los fenómenos estocásticos son especialmente importantes en grupos poblacionales pequeños, así como en especies con un número reducido en la descendencia. La deriva genética produce, por ejemplo, que la frecuencia de un alelo aumente o disminuya independientemente de su eficacia biológica.

4.5.3. CONFLICTO SEXUAL INTRALOCUS.

El conflicto sexual intralocus es un mecanismo evolutivo que implica que la eficacia biológica, o valor selectivo, de un genotipo o de un alelo concreto está definido en función del sexo en el que se presenta (Parker, 1979; Partridge & Hurst, 1998). De este modo, la ventaja de un alelo determinado en un locus definido es antagónica entre sexos, favoreciendo a uno mientras que produce una reducción del *fitness* en el otro (Rice, 1992; Bonduriansky & Chenoweth, 2009). Este tipo de mecanismo evolutivo está englobado dentro de los mecanismos de selección equilibradora, es decir, procesos por los cuales se mantienen en el acervo génico los diferentes alelos de un gen. El hecho de que exista una ventaja adaptativa diferente para cada sexo, supone que cada sexo tiene un genotipo favorecido. Esto genera dos vectores selectivos

diferentes y, por lo tanto, que las frecuencias entre ambos alelos alcance un determinado equilibrio, manteniendo la variabilidad genética en la población al conservarse ambos. Este tipo de proceso ha sido ampliamente descrito en poblaciones de diversas especies y ha comenzado más recientemente a describirse en poblaciones humanas contemporáneas (Byars et al., 2010; Stearns et al., 2010; Stearns et al., 2012).

En su aplicación al estudio de asociaciones genéticas con situaciones clínicas, estos modelos podrían suponer el soporte que explicara la frecuencia con la que se encuentran alelos de riesgo vinculados al género. Dadas las diferencias epidemiológicas que presentan las enfermedades psiquiátricas entre la población femenina y masculina, tanto en prevalencia como en gravedad y desarrollo (Leung & Chue, 2000; Mendrek & Stip, 2011; Ochoa et al., 2001; Ramsey et al., 2013), sería esperable encontrar este fenómeno en genes vinculados a las patologías que no obstante han ofrecido habitualmente resultados contradictorios.

5. GENES Y POLIMORFISMOS INCLUIDOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.

5.1. COMT / rs4680.

El gen COMT (Gene ID: 1312; NCBI Reference Sequence: NG_011526.1 RefSeqGene) codifica para la enzima catecol-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.6). Su localización citogenética es 22q11.21 (región q11.21 del cromosoma 22) entre las bases 19.941.740 y 19.969.975 (NC_000022.11, GRCh38 Primary Assembly). Fue clonado por Lundstrom et al. (1991) y mapeado por Winqvist et al. (1991). Posee 6 exones y 2 variantes de procesamiento alternativo o *splicing*.

El polimorfismo rs4680 perteneciente al gen COMT es del tipo "*variación de un único nucleótido*", es decir, polimorfismo de tipo SNV (*Single Nucleotide Variation*), también denominados SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Se localiza en la posición 19.951.271 del cromosoma 22 (según referencia GRCh37.p10 Primary Assembly). Dentro del gen, el polimorfismo se encuentra en la base 472 del ADNc (NM_000754.3:c.472G>A), la cual equivale a la base 183 del exón 4. Esta posición puede presentar dos variantes o alelos. En el alelo ancestral la posición está ocupada por guanina (G), siendo el segundo alelo una sustitución por alanina (A). La presencia de una u otra equivale a un cambio de aminoácido, siendo por lo tanto un polimorfismo con cambio de sentido (missense). El alelo G, es la primera base del triplete GTG,

codificante para el aminoácido valina (Val), mientras que el alelo A forma el triplete ATG que codifica para metionina (Met). Dado que el gen presenta procesamiento alternativo, el aminoácido correspondiente al codón del ARNm se sitúa en el residuo 108 o en el 158 de la proteína, correspondiendo a las formas, soluble (S-COMT) y unida a membrana (MB-COMT), respectivamente. Este polimorfismo es, por la tanto, de tipo funcional, estando tanto el alelo ancestral como el alelo alternativo en amplia distribución en casi todas las poblaciones en las que ha sido estudiado.

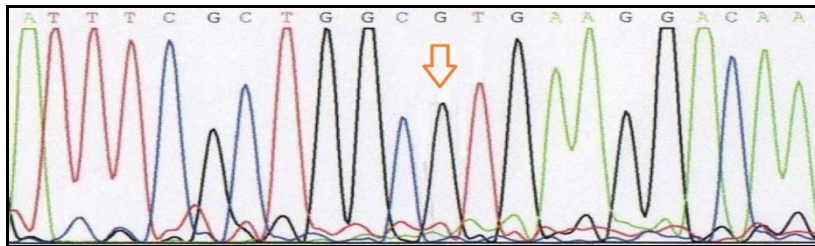


Figura 14. Gen COMT. Polimorfismo rs4680. Genotipo homocigoto GG.

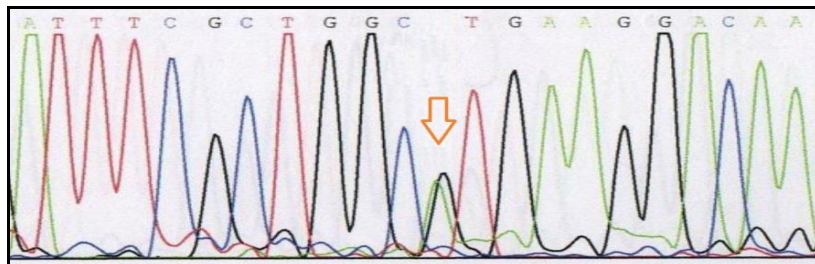


Figura 15. Gen COMT. Polimorfismo rs4680. Genotipo heterocigoto GA.

Ha podido contrastarse que existe una actividad enzimática distinta en función del alelo presente. De este modo, sobre la actividad basal, correspondiente al alelo ancestral G (Val), se estima que la actividad del enzima para el alelo A (Met) está reducida en cuatro veces (Lotta et al., 1995; Lachman et al., 1996). Junto a esta reducción de la actividad se ha descrito un aumento de la degradación de la proteína también para el alelo A (Met), lo cual repercute de la misma manera en una menor tasa de actividad. En coherencia con ello, los estudios *in vitro* han encontrado que aquellas células que presentan el alelo de menor actividad en homocigosis tienen menor capacidad para metabolizar monoaminas (Chen et al., 2004).

Es por todo ello que este polimorfismo ha sido ampliamente estudiado en aquellas patologías en las cuales el metabolismo de la dopamina tiene una implicación relevante, como en la enfermedad de Parkinson (Klebe et al. 2013; Kiyohara et al., 2011) o en la fibromialgia (Vargas-Alarcón et al., 2007). Así, por ejemplo, en el estudio

de Klebe et al. (2013) el polimorfismo se presenta como un modificador de la edad de inicio en función del género. En cuanto a su papel en el desarrollo de los trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia o el trastorno bipolar, el SNP rs4680 ha sido investigado repetidamente desde que fuera descrito, sin embargo, su vinculación no está establecida completamente y son frecuentes los resultados contradictorios al igual que los hallazgos que no se replican entre diferentes estudios (Williams et al., 2007; Ira et al., 2013; Hoenicka et al., 2010; Costas et al., 2011 y 2011b).

5.2. MAO-A / rs6323.

El gen MAO-A (Gene ID: 4128; NCBI Reference Sequence: NG_008957 RefSeqGene) codifica para la enzima monoamino oxidasa A (EC 1.4.3.4). Está localizado citogenéticamente en Xp11.3, región p11.3 del cromosoma X, entre las bases 43.654.907 y 43.746.824 (NC_000023.11 GRCh38 Primary Assembly) con una estructura de 15 exones en su secuencia, descrita por Grimsby et al. (1991). Fue mapeado por Levy et al. (1989) y clonado por Hotamisligil & Breakefield (1991).

El polimorfismo de tipo SNP, rs6323 del gen MAO-A, está localizado en la posición 43.591.036 del cromosoma X (según referencia GRCh37.p10 Primary Assembly). Dentro del gen, el polimorfismo se encuentra en la base 891 del ADNc (NM_000240.3:c.891G>T). Esta localización equivale a la base 98 del exón 8. El alelo ancestral es timina (T), situada en la tercera posición del triplete correspondiente, siendo en este caso CGT, el cual codifica para arginina (Arg). La variación es un cambio por la base guanina (G), formando así el codón CGG, que codifica también para el aminoácido arginina (Arg). Por lo tanto, este polimorfismo es de tipo sinónimo. El ARNm del gen MAO-A presenta procesamiento alternativo, de modo que el codón correspondiente se localiza en la posición 164 o en la 297 de la proteína.

Pese a que el polimorfismo no supone un cambio de aminoácido, ha sido descrita una diferencia de actividad del enzima en función del alelo presente (Hotamisligil & Breakefield, 1991). De este modo, según los resultados obtenidos *in vitro*, la forma derivada del alelo G sería más activa.

Dado que este polimorfismo, en principio, no es funcional, se estima que debe de estar en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo, justificando con ello dicho cambio en la actividad. Se han descrito polimorfismos contiguos en el exón 8 (rs150176511, rs138703731, rs61730725, rs144688481 y rs1799835) así como una mutación que produce la aparición de un codón de parada (rs72554632). No obstante,

dichas frecuencias de aparición no se ajustan a las del polimorfismo rs6323, siendo muy bajas en las poblaciones en las que se han encontrado.

En el caso del polimorfismo rs6323 se han referenciado diversos estudios que encuentran asociación con múltiples patologías, entre las que cabe destacar, esquizofrenia (Sun et al., 2012), trastorno bipolar (Lin et al., 2008), depresión (Zhang et al., 2010), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Das et al., 2011), conductas agresivas y suicidas (Antypa et al., 2013) y resistencia a tratamientos antidepresivos (Leuchter et al., 2009). Estas asociaciones hacen referencia tanto al polimorfismo individual como a la presencia del mismo en determinados haplotipos.

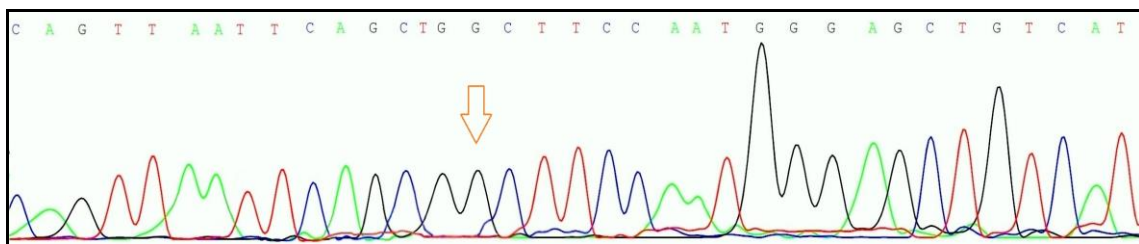


Figura 16. Polimorfismo rs6323. Genotipo homocigoto GG.

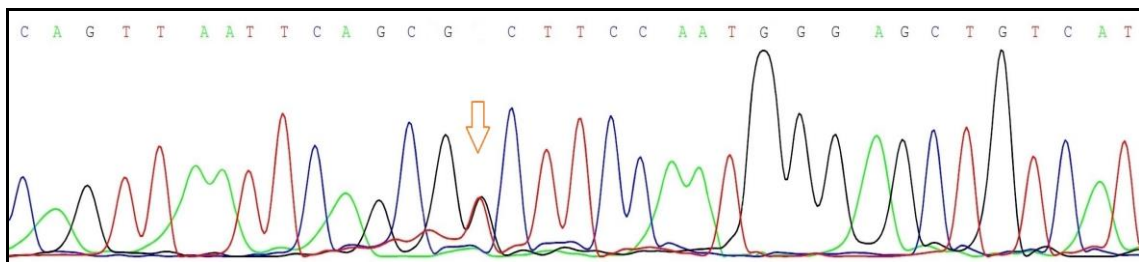


Figura 17. Polimorfismo rs6323. Genotipo heterocigoto TG.

Dado que este polimorfismo se localiza en el cromosoma X, los hombres poseen una única copia del gen (hemicigotos), mientras que las mujeres portan las dos copias correspondientes a cada uno de los cromosomas del par 23.

5.3. MAO-B / rs1799836.

El gen MAO-B (Gene ID: 4129; NCBI Reference Sequence: NG_008723.1 RefSeqGene) codifica para la enzima monoamino oxidasa B (EC 1.4.3.4), estando su localización citogenética en la banda 11.3 del brazo corto del cromosoma X (Xp11.3), entre las bases 43.766.610 y 43.882.475 (NC_000023.11 GRCh38 Primary Assembly) contiguo al gen MAO-A. Posee una estructura de 15 exones determinada por Grimsby et al. (1991). Fue clonado por Bach et al. (1988) y mapeado por Chen et al. (1992).

El polimorfismo rs1799836, perteneciente al gen MAO B, es un polimorfismo de tipo SNP. Está situado en la posición 43.627.999 del cromosoma X (según referencia GRCh37.p10 Primary Assembly). Dentro del gen, el polimorfismo se encuentra en la base 1348 a 1336 del ADNc (NM_000898.4:c.1348-36A>G) en función de la longitud intrónica, la cual puede variar debido a polimorfismos de inserción o deleción. Su localización, en consecuencia, lo sitúa en el intrón 13, a una distancia de 35 bases del inicio del exón 14. Pueden darse dos alelos diferentes, el alelo ancestral alanina (A) y el alelo alternativo guanina (G). Ambos están distribuidos ampliamente en la población.

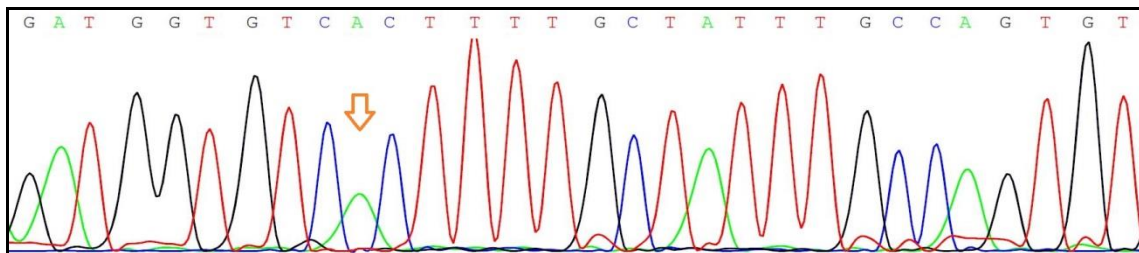


Figura 18. Gen MAO B. Polimorfismo rs1799836. Genotipo homocigoto AA.

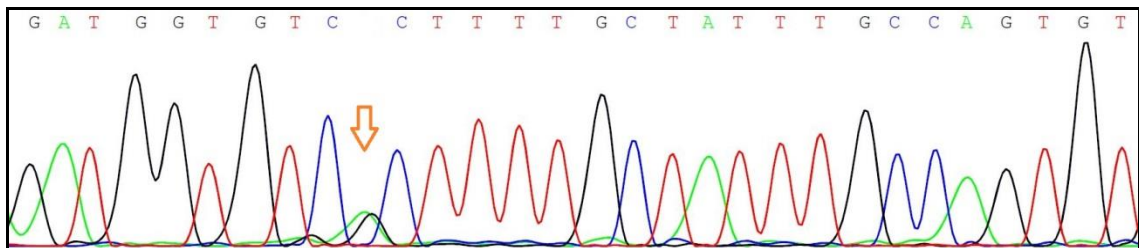


Figura 19. Gen MAO B. Polimorfismo rs1799836. Genotipo heterocigoto AG.

Este polimorfismo, al igual que el polimorfismo de MAO-A, al encontrarse en el cromosoma X, implica que los hombres son hemocigotos para el gen.

El polimorfismo ha sido vinculado a la esquizofrenia por diversos estudios (Wei et al., 2011; Camarena et al., 2012) pero también a otros trastornos relacionados con el metabolismo de las monoaminas, entre los que se encuentran el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (Li et al., 2008) o la enfermedad de Parkinson (Gao et al., 2008).

5.4. FAAH / rs324420.

El gen FAAH (Gene ID: 2166; NCBI Reference Sequence: NG_012195.1 RefSeqGene) codifica para la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (EC 3.5.1.99). Su localización citogenética es 1p33 (región p33 del cromosoma 1), entre las bases 46.394.267 y 46.413.848 (NC_000001.11 GRCh38 Primary Assembly). Posee 15

exones en su estructura, la cual fue determinada por Wan et al. (1998), quienes también mapearon el gen. Fue clonado por Giang & Cravatt (1997).

El polimorfismo rs324420 del gen FAAH es un polimorfismo de una sola base (SNP) con dos posibles alelos, citosina (C) y adenina (A). Su posición corresponde a la base 46.870.761 del cromosoma 1 (según referencia GRCh37.p10 Primary Assembly). Dentro del gen, el polimorfismo quedaría localizado en la base 385 del ADNc (NM_001441.2:c.385C>A). Esta posición lo sitúa en la base 76 del exón 3, que es a su vez la primera base del codón correspondiente al residuo 129 de la proteína. De este modo, los dos tripletes posibles son CCA o ACA, codificantes para prolina (Pro) y treonina (Thr) respectivamente. Se trata, por lo tanto, de un polimorfismo con cambio de sentido (missense). La variante de la enzima con treonina (alelo A) en la cadena, presenta una mayor sensibilidad a la degradación proteolítica, lo que produce una reducción de la misma en la célula, aunque la actividad catalítica, es decir, la capacidad de metabolizar AEA, es igual a la que posee la variante con prolina (alelo C) (Sipe et al., 2002). La comparación de la actividad enzimática en su conjunto, realizada en linfocitos T, estima que las células con genotipo AA tiene un 50% menos de actividad que aquellas que poseen un genotipo CC (Chiang et al., 2004).

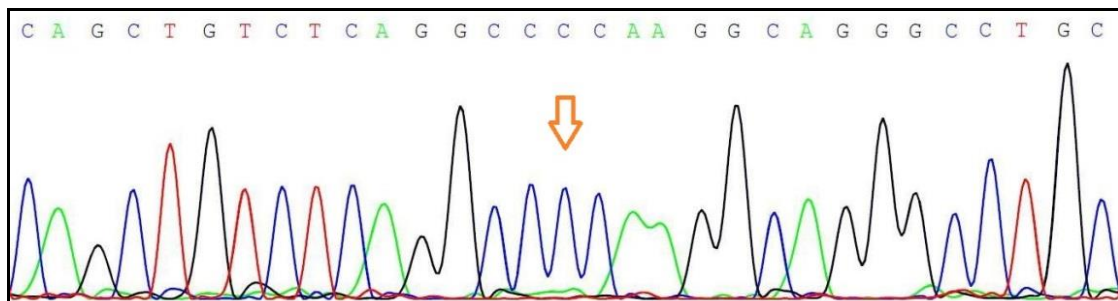


Figura 20. Gen FAAH. Polimorfismo rs324420. Genotipo homocigoto CC.

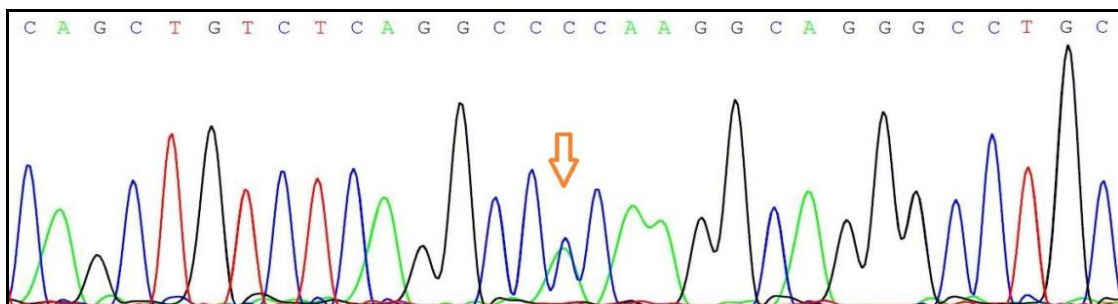


Figura 21. Gen FAAH. Polimorfismo rs324420. Genotipo heterocigoto CA.

Ambos alelos son considerados normales y frecuentes, siendo su distribución diferente en distintas áreas geográficas.

El papel fundamental de la enzima FAAH en el metabolismo de los endocannabinoides ha motivado que este gen, y en particular este polimorfismo funcional, haya sido ampliamente estudiado en muy diferentes patologías. En este sentido, se encuentra que han sido descritas asociaciones de los diferentes alelos a patologías psiquiátricas como esquizofrenia y trastorno bipolar (Hillard et al., 2012), a trastornos por uso de diversas sustancias (Tyndale et al., 2007; Schacht et al., 2009), además de a patologías metabólicas como la anorexia nerviosa (Müeller et al., 2008) o la obesidad (Müeller et al., 2010), en consonancia al hecho de que FAAH es una enzima fundamental en el metabolismo de los lípidos.

5.5. CNR1 / (AAT)_n - rs137998297.

El gen CNR1 (Gene ID: 12668; NCBI Reference Sequence: NC_000006.12) codifica para el receptor de cannabinoides de tipo I (NP_001153731.1). Está localizado en la región citogenética 6q15, entre las bases 88.139.864 y 88.166.688 (NCBI Reference Sequence: NT_025741.16; NM_016083.4). Fue clonado por Gerard et al. (1991) y mapeado por Modi & Bonner (1991).

El polimorfismo rs137998297, tradicionalmente denominado (AAT)_n, es de tipo microsatélite. Consiste en la repetición en tándem del triplete de bases AAT, que puede aparecer repetido entre 7 y 15 veces, configurando, por lo tanto, 9 alelos diferentes. Ha sido también descrito un alelo 10 con 16 repeticiones de aparición muy infrecuente (Ponce et al., 2003; Zhang et al., 2004). Este tipo de polimorfismos reciben la denominación genérica de STRs (de sus siglas en inglés, *short tandem repeats*) y tienen una gran importancia en la evolución del genoma (Kozlowski et al., 2010). Dado el alto número de alelos posibles, habitualmente, para facilitar el análisis estadístico, suelen clasificarse los alelos en dos categorías: largos (L) y cortos (C). Esta distinción se realiza a partir del alelo 5, equivalente a 11 repeticiones, de modo que los alelos 5 y superiores serían considerados alelo L y, consecuentemente, los alelos 4 e inferiores como alelo C. Es habitual encontrar también la notación (≥ 5) y (< 5) para los alelos largo y corto respectivamente. Esta clasificación responde a la propuesta por Comings et al. (1997) a partir de los resultados de Schroth et al. (1992). Según mostraban, a partir del alelo 5 el ADN adquiere una conformación en Z que reduce parcialmente la transcripción del gen, de modo que la longitud del polimorfismo es inversamente proporcional a la producción de ARNm.

En cuanto a su localización, este polimorfismo se encuentra en la región 3' UTR del gen, iniciándose en la posición 88.836.862 del cromosoma 6. Esta ubicación lo

5.6. CNR2 - rs35761398.

El gen CNR2 (Gene ID: 1269) codifica para el receptor de cannabinoides de tipo II (NP_001832.1). Está localizado en el cromosoma 1, en la región p36.11 (1p36.11), entre las bases 23.870.515 y 23.959.054, (NC_000001.11 GRCh38 Primary Assembly). Fue clonado por Munro et al. (1993) y mapeado por Karsak et al. (2005).

Este polimorfismo (NM_001841.2:c.188_189delAAinsGG) está constituido por un dinucleótido localizado en las posiciones 24.201.919 y 24.201.920 del cromosoma 1 (GRCh37.p10 Primary Assembly), siendo a su vez cada uno de ellas un polimorfismo de una única base: rs2502992 y rs2501432, respectivamente. Dichas bases forman los alelos CC (citosina-citosina) y TT (timina-timina). Ha sido descrito en la bibliografía la posibilidad de encontrar las combinaciones CT y TC (Ishiguro et al., 2009), si bien ninguno de los dos ha sido referido en población española. En el caso de este SNP, la cadena codificante es la opuesta a su nomenclatura habitual, de modo que los dinucleótidos codificantes forman los tripletes CGG (alelo CC) y CAA (alelo TT), los cuales equivalen en la proteína a los aminoácidos arginina (Arg) y glutamina (Gln) respectivamente, localizados en el residuo 63.

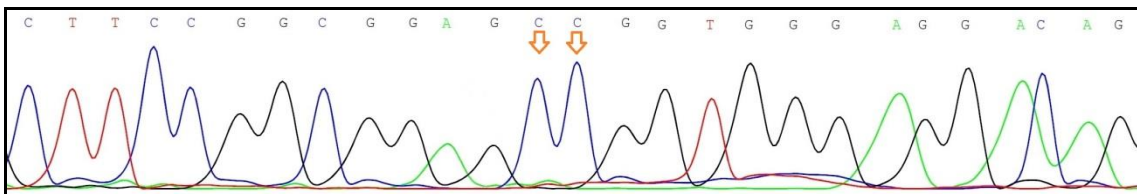


Figura 23. Gen CNR2. Polimorfismo rs35761398 Genotipo homocigoto CC/CC.

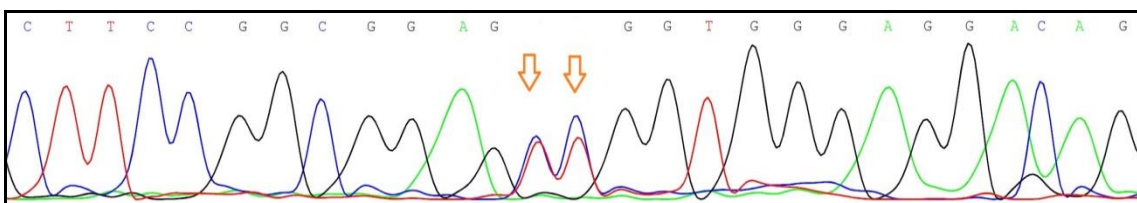


Figura 24. Gen CNR2. Polimorfismo rs35761398 Genotipo heterocigoto CC/TT.

Se han realizado ensayos de actividad que indican que el cambio del alelo ancestral CC por el alelo TT supone una reducción en la funcionalidad del receptor. Esta reducción parece deberse a la ubicación del residuo en uno de los dominios intracelulares responsables de la transducción de señal. De este modo, los receptores con alelo TT (glutamina) producirían una menor respuesta ante la unión del ligando (Ishiguro et al., 2009). Por otra parte, ha sido descrito que el polimorfismo rs35761398 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo rs12744386. Estos

polimorfismos están, por tanto, englobados dentro de un haplotipo. Los alelos posibles de rs12744386 son dos, el alelo ancestral C y el alelo alternativo T. Este polimorfismo, según los resultados obtenidos por Ishiguro et al. (2009), está modificando la expresión del gen, de modo que el alelo T presentaría mayores niveles de ARNm. El estudio del polimorfismo rs35761398 lo ha vinculado con la esquizofrenia (Tong et al., 2013; Ishiguro et al., 2009). No obstante, las asociaciones con los trastornos psiquiátricos no han quedado completamente clarificadas.

5.7. GRM3 - rs1468412.

El gen GRM3 (Gene ID: 2913; NC_000007.14 GRCh38 Primary Assembly) codifica para el receptor metabotrópico 3 de glutamato (GenBank: ABY87922.1; UniProtKB: Q14832). Posee una localización citogenética 7q21.11-q21.12, entre las posiciones de las bases 86.643.914 y 86.864.876. Fue clonado por Bjarnadottir et al. (2005), quienes determinaron también la estructura de 5 exones para el gen. Fue mapeado por Scherer et al. (1996).

El polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 está localizado en la posición 86.433.451 del cromosoma 7 (según referencia GRCh37.p10 Primary Assembly). Dentro del gen se sitúa en el intrón 3, a 17.019 bases del final del exón 3 y a 34.704 del inicio del exón 4 (NM_000840.2:c.1324+17019A>T). El alelo ancestral es timina (T), y el alelo alternativo que puede sustituir a éste es adenina (A), estando ambos distribuidos ampliamente en la población general.

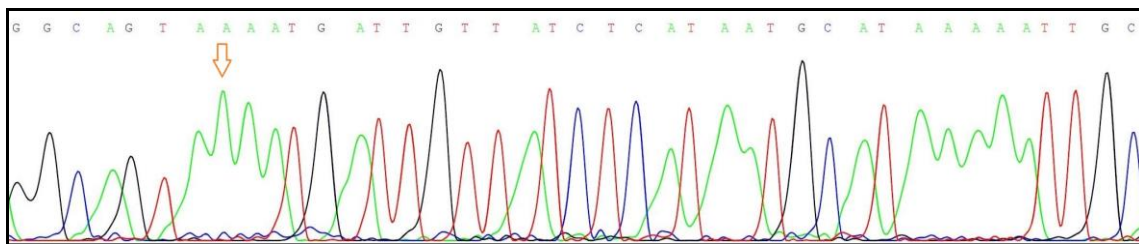


Figura 25. Polimorfismo rs1468412. Genotipo homocigoto AA.

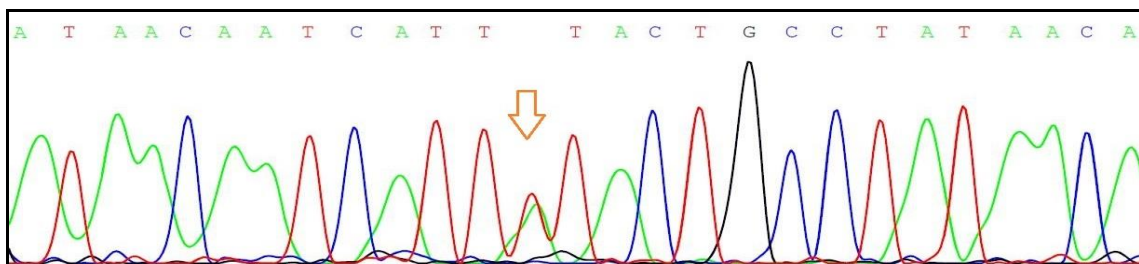


Figura 26. Polimorfismo rs1468412. Secuenciación de la hebra complementaria (B). Genotipo heterocigoto TA.

Este polimorfismo ha sido asociado al desarrollo de esquizofrenia (Egan et al., 2004; Fujii et al., 2003) y más recientemente se ha focalizado el estudio en su posible vinculación a la presencia de endofenotipos relacionados con el componente preatencional de la percepción auditiva (Kawakubo et al., 2011), dado el papel que presenta el sistema glutamatérgico en el procesamiento de este tipo de percepción en el córtex. Otros fenotipos, como la respuesta al tratamiento (Bishop et al., 2001), también han sido asociados con los alelos de este SNP.

Objetivos.

Objetivos.

1- ANTECEDENTES AL ESTUDIO.

La esquizofrenia y el trastorno bipolar son dos enfermedades psiquiátricas que muestran múltiples niveles de complejidad, estando implicados en su desarrollo factores tanto endógenos como ambientales (Jablensky, 2010; Goodwin & Jamison, 2007). La sintomatología y el cuadro clínico que define a cada una de las patologías muestra relación con las alteraciones neuroanatómicas y neurofisiológicas, aunque esta relación no ha sido completamente esclarecida (Andreasen, 2000). No obstante, estas alteraciones parecen estar generadas por conexiones neuronales anómalas dentro de las vías de señalización del sistema nervioso, implicando con ello a los procesos de neurotransmisión y neuroplasticidad (Howes & Kapur, 2009; Hillard et al., 2012; Niciu et al., 2012; Silverstein et al., 2013). Por otro lado, la investigación genética afronta la tarea de poder llegar a explicar la predisposición familiar observada en el desarrollo de estas patologías, encontrando los factores genéticos vinculados (Sawa & Snyder, 2002; O'Donovan et al., 2009). Finalmente, se ha puesto de manifiesto una evidente diferencia de género en la epidemiología de estas enfermedades tanto en prevalencia como en edad de inicio (Messias et al., 2007; Medrek & Stip, 2011). Esta diferencia es aún más marcada en aquellos pacientes que además de la patología psiquiátrica presentan un trastorno por uso de sustancias (Swartz et al., 2006).

En el presente trabajo se ha partido de una metodología basada en el estudio de asociación de genes candidato en poblaciones no emparentadas (Slager & Schaid, 2001). Los genes elegidos son codificantes para receptores o enzimas pertenecientes a los sistemas de neurotransmisión que han sido vinculados a la etiología de estas enfermedades.

2- OBJETIVOS GENERALES.

En función de los antecedentes en los estudios genéticos previos y en consonancia a la epidemiología de la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la situación comórbida de trastorno psiquiátrico y trastorno por uso de sustancias, se plantearon los siguientes objetivos:

1- Determinar la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en una población control de referencia en los siguientes polimorfismos genéticos: rs4680 (COMT), rs6323 (MAO-A), rs1799836 (MAO-B), (AAT)_n (CNR1), rs35761398 (CNR2), rs324420 (FAAH) y rs1468412 (GRM3).

2- Determinar la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos enunciados en el Objetivo-1 en muestras poblacionales de dos patologías psiquiátricas: esquizofrenia y trastorno bipolar, valorando las diferencias que puedan existir en las correspondientes situaciones comórbidas con presencia de trastorno por uso de sustancias.

3- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1- Estudiar las asociaciones que pudieran existir entre los genotipos de cada polimorfismo y la aparición de las patologías citadas, así como también las asociaciones vinculadas a diferencias fenotípicas en los cuadros clínicos, valorando con ello las implicaciones biológicas de cada uno de los alelos y los genotipos.

2- Determinar si existen epistasis entre los distintos loci del estudio que se asocien a la aparición de las patologías o a la diferenciación dentro de cada patología en diversos grupos fenotípicos.

3- Evaluar si pueden establecerse correlaciones entre las diferencias de la epidemiología genética y las diferencias observadas en la epidemiología clínica en función del género, estableciendo una explicación genética para los parámetros epidemiológicos de la esquizofrenia y del trastorno bipolar.

Material y Métodos.

1. PARTICIPANTES DEL ESTUDIO.

Todos los participantes, pacientes y controles, incluidos en el presente estudio, fueron informados de la naturaleza y objetivos del mismo y firmaron un consentimiento. De igual modo, el comité ético de investigación de los hospitales y centros mencionados a continuación aprobó la metodología y realización del presente trabajo. Los datos completos de edad, consumo y tratamiento pueden consultarse en las tablas incluidas en los anexos.

1.1. POBLACIÓN CONTROL.

La población control está formada por 316 voluntarios sin trastornos psiquiátricos de edades comprendidas entre los 29 y los 83 años de edad no emparentados entre sí. Ninguno presentaba trastornos mentales ni tenía familiares en primer o segundo grado que hubieran presentado su vez este tipo de patologías, es decir, no poseían antecedentes familiares relacionados.

Estos individuos no cumplían criterios de trastorno por uso de sustancias.

Se ha diversificado la población realizando un reclutamiento a través de la Fundación Hospital de Alcorcón, el Hospital Severo Ochoa, la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y el Hospital Virgen de la Luz de Cuenca.

1.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA.

La población completa de pacientes de esquizofrenia abarca un total de 503 individuos diagnosticados positivamente siguiendo criterios DSM-IV-TR mediante entrevista estructurada (*Structured Clinical Interview para DSM-IV (SCID-I)*).

Los pacientes presentan un rango de edades comprendido entre los 18 y los 75 años y no están emparentados entre sí.

El reclutamiento, así como la toma de muestras, tuvo lugar en el Servicio de Psiquiatría de la Fundación Hospital de Alcorcón, en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Virgen de la Luz de Cuenca (Programa del Trastorno Mental Grave). De los 503 pacientes con esquizofrenia, 124 (24,45%) presentaban además criterios positivos para trastorno por uso de sustancias (TUS) con consumo principal de cannabis.

Además de estos 503 pacientes, en la muestra obtenida, existían pacientes policonsumidores con un consumo indeterminado, de clasificación compleja, dado que no se pudieron determinar variables como la cantidad, la frecuencia, o el consumo principal. Estos pacientes fueron excluidos del presente estudio.

1.3. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR.

Se han incluido 120 pacientes no emparentados entre sí diagnosticados de trastorno bipolar siguiendo criterios DSM-IV-TR mediante entrevista estructurada (*Structured Clinical Interview* para DSM-IV (SCID-I)). Este grupo pertenece íntegramente a la población reclutada para el presente trabajo en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Virgen de la Luz de Cuenca (Programa del Trastorno Mental Grave).

Dentro de este grupo de pacientes el 10% cumplía criterios de trastorno por uso de sustancias. Su perfil de consumo se tuvo en cuenta en las diferentes segregaciones poblacionales para el análisis de las posibles asociaciones, siendo excluidos en algunas de las comparaciones.

1.4. POBLACIÓN DE CONSUMIDORES CON TRASTORNO POR USO DE SUSTANCIAS SIN TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS MAYORES.

Como población de contraste de los resultados obtenidos, se reclutó una población de 71 individuos que presentaban trastorno por uso de sustancias con un consumo único o principal de cannabis.

Esta población de consumidores fue reclutada en el Servicio de Psiquiatría de la Fundación Hospital de Alcorcón y en diversos centros de ayuda al drogodependiente (CAD) de la Comunidad de Madrid. Estos usuarios no presentan sintomatología psiquiátrica añadida a las complicaciones psicosociales derivadas del propio consumo, por el cual reciben tratamiento en dicho servicio. No cumplen, por tanto, criterios DSM-IV-TR para esquizofrenia ni trastorno bipolar.

2. EXTRACCIÓN DE ADN.

El ADN se extrajo de leucocitos presentes en muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA. Se han utilizado dos metodologías diferentes para la obtención de ADN.

Método 1 - (Sambroock et al., 1993).

1- A partir de 5 a 10 mL de sangre se añade H₂O Millipore hasta 45 mL en un tubo Falcon. Se mezcla por inversión y se centrifuga a 3.000 rpm durante 15 minutos.

2- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* enrasando hasta 25 mL con H₂O Millipore. Se centrifuga 15 minutos a 3.000 rpm.

3- Se descarta el sobrenadante y en caso de observar que dicho sobrenadante está anormalmente turbio, se repite el lavado con 25 mL como en el paso anterior.

4- Se añaden 6 mL de tampón de lisis (10 mM Tris-Cl, pH=8,0 ; 0.4 M NaCl ; 2mM EDTA, pH=8,0) , 1 mL de proteinasa K (Boehringer) y 200 µL de SDS (0,6%).

5- La suspensión se incuba a 37° C toda la noche.

6- Se añaden 2 mL de NaCl (6M) y se centrifuga a 3.000 rpm, 15 minutos.

7- El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo y se añaden dos volúmenes de etanol absoluto frío. El aglomerado o “medusa” que se forma por precipitación se recoge utilizando una varilla de vidrio.

8- La “medusa” se deja secar al aire para evaporar completamente el etanol y se resuspende en 300 µL de buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH=7,5 ; 1 mM EDTA)

La concentración de ADN se calculó por medición de absorbancia a 260 nm. Se midió también la absorbancia a 280 nm para calcular la pureza, de tal modo que cuando la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm fue menor a 1,5 se procedió a realizar un protocolo de lavados sucesivos de fenol, fenol-cloroformo y cloroformoisoamílico.

Protocolo de lavados:

1- Se añade 1 volumen de fenol y se mezcla por vórtex hasta alcanzar una mezcla homogénea. Se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 minutos.

2- Se toma el sobrenadante con precaución de no arrastrar parte de la interfase. Se procede a continuación a mezclar con 1 volumen de fenol-cloroformo. Se mezcla por Vórtex y se centrifuga a 14.000 rpm, 15 minutos.

3- Se toma el sobrenadante y se mezcla con 1 volumen de cloroformo isoamílico. Se mezcla por vórtex y se centrifuga 15 minutos a 14.000 rpm.

4- Se toma el sobrenadante y se mezcla con 200 µL de acetato sódico y con 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-4°C). Se forma un aglomerado que se recupera utilizando una varilla de vidrio.

5- Se realiza un lavado con etanol al 70 % a temperatura ambiente y se deja secar.

6- Finalmente, se resuspende en 300 µL de tampón TE (10 mM Tris-Cl, pH=7,5; 1 mM EDTA).

Esta metodología permite obtener cantidades de 300 µL por muestra a concentraciones entre 500 y 1000 ng/µL. A partir de estas extracciones se han realizado entre 2 y 3 alícuotas de trabajo de 100 ng/µL o 50 ng/µL dejando la mayor parte del ADN extraído conservado a -80° C para trabajos futuros.

Método 2 -DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen).

También se ha utilizado un kit de extracción de ADN para aquellas muestras en las cuales la cantidad de sangre obtenida era insuficiente (100 μ L o menos) o cuando la metodología anterior no consiguió obtener ADN viable.

El kit comercial utilizado fue “DNeasy Blood & Tissue kit” suministrado por la empresa Qiagen.

1- Se añaden 20 μ L de proteinasa K y 120 μ L de PBS a 100 μ L de sangre.

2- Se le añaden 200 μ L de Buffer de Lisis incluido en el Kit y se incuba a 56° C durante 10 minutos.

3- La mezcla se pipetea sobre la columna *DNeasy mini spin* facilitada por el fabricante y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto.

4- Se descarta el contenido del tubo dado que el ADN queda adherido a la membrana de la columna.

5- Se añaden a la columna 500 μ L del primer buffer de lavado, *AW1*, y se centrifuga 1 minuto a 8000 rpm.

6- Se cambia el tubo y se añaden 500 μ L del buffer de lavado *AW2*. Se centrifuga a 14.000 rpm durante 3 minutos.

7- Finalmente se añaden a la columna 200 μ L del buffer de elución *AE* y se centrifuga 1 min a 8.000 rpm quedando el ADN en la fase líquida recogida en el tubo.

Esta metodología permite obtener 200 μ L con unas concentraciones de ADN que oscilan entre 50 y 250 ng/ μ L.

3. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS.

3.1. POLIMORFISMO rs4680 EN EL GEN COMT.

La determinación del polimorfismo rs4680 del gen COMT se realizó mediante técnica de discriminación alélica por sondas *Taqman* (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). Los primers y las sondas fueron diseñadas a partir de la secuencia consenso obtenida de las bases de datos de *NCBI gene*. Posteriormente se encargó su producción a la empresa Sigma-Aldrich.

Para la reacción de PCR se utilizó ADN de partida a una dilución de 50 ng/ μ L. Los primers utilizados estaban a una concentración 1,5 μ M y las sondas a 2,5 μ M.

Mezcla utilizada para la reacción:

Componente	Cantidad (µL)
Supermix	10,000
Sonda A	2,000
Sonda B	2,000
Oligo A	2,000
Oligo B	2,000
ADN	2,000
Volumen Total	20,000 µL

La Supermix comercial utilizada contiene: dNTPs, 50 U/mL iTaq™ ADN polimerasa, 6 mM MgCl₂ (Bio-Rad iQ™ Supermix).

Primers y sondas para el polimorfismo:

PRIMERS:

A: 5' ACTGTGGCTACTCAGCTGTGA 3'

B: 5' CCTTTTCCAGGTCTGACAAC 3'

SONDAS:

A: [TxRd] 5' ATTTGCTGGC **G** TGAAGGACAAG 3' [BHQ2]

B: [6FAM] 5' ATTTGCTGGC **A** TGAAGGACAAG 3' [BHQ1]

Programa de PCR del iCycler:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	3' 00''	95° C
2 x 40	30''	95° C Desnaturalización
	30''	56° C Anillamiento Primers
	30''	63° C Anillamiento Sondas
	30''	65° C Anillamiento Sondas
3	∞	4° C

La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de la empresa Bio-Rad (*iQ™ 96-Well PCR Plates*).

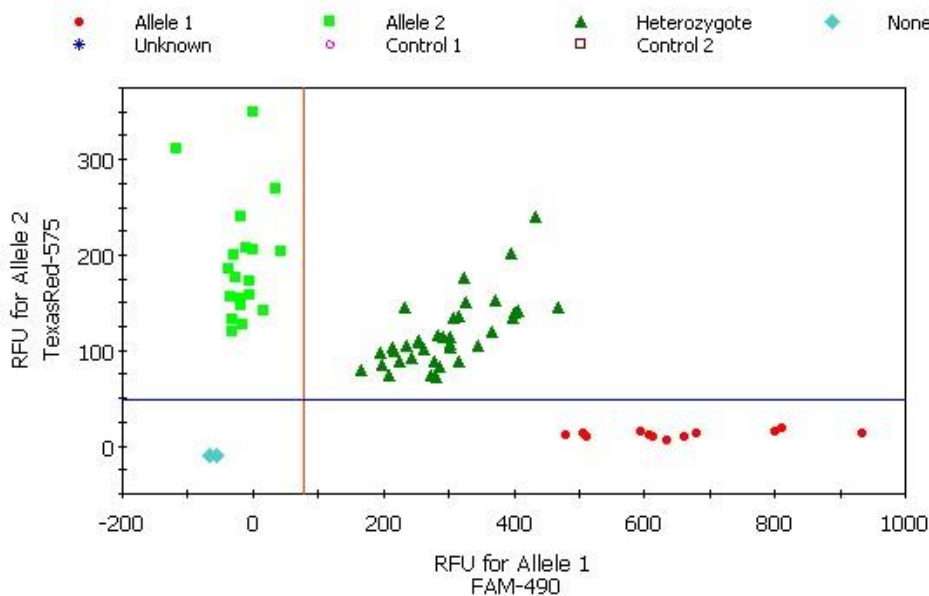


Figura 27. Ejemplo de resultados del polimorfismo rs4680 de COMT. La nube de puntos rojos indica las muestras con señal positiva para la sonda marcada con el fluoróforo FAM-490, equivalente a los individuos homocigotos para el alelo A. La nube de cuadrados verde claro indica las muestras homocigotas para el alelo G. La nube de triángulos verde oscuro son aquellas muestras heterocigotas que dan señal para ambos fluoróforos.

De las primeras placas se seleccionaron al azar entre 10 y 15 individuos para cada uno de los genotipos encontrados. Dichas muestras fueron secuenciadas para confirmar el genotipo. En las sucesivas placas, los genotipos confirmados sirvieron como muestras de control, incluyendo en cada una de ellas entre 3 y 6 controles por genotipo.

3.2. POLIMORFISMO rs6323 EN EL GEN MAO-A.

Para la determinación de este polimorfismo por sondas *Taqman* (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995) se debe tener en cuenta que el gen se encuentra en el cromosoma X, de tal modo que en el caso de los hombres se da una situación de hemicigosis. Por lo tanto, las muestras darán señal en un fluoróforo u otro pero nunca en ambos. En mujeres aparecen los resultados estándares, es decir, dos nubes de puntos correspondientes a los dos tipos de homocigosis y la nube correspondientes a las muestras de genotipo heterocigoto.

Material y métodos.

Tanto las concentraciones de los reactivos como las proporciones y condiciones de la mezcla, fueron las mismas que las utilizadas en el polimorfismo anterior.

Sondas y primers utilizados:

PRIMERS:

A: 5' ATGCGATCCCTCCGACCTTG 3'

B: 5' TTCTTCTTCCAGAAGGCCTCC 3'

SONDAS:

A: [TxRd] 5' GTTAATTCAGCG G CTTCCAATGGG 3' [BHQ2]

B: [6FAM] 5' GTTAATTCAGCG I CTTCCAATGGG 3' [BHQ1]

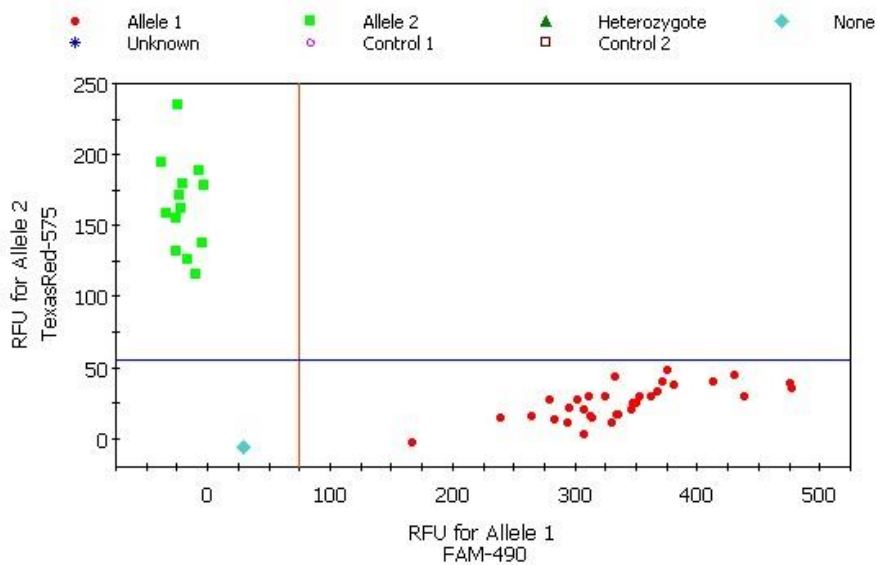


Figura 28. Placa realizada con población de varones para el polimorfismo rs6323. Puede observarse la ausencia de puntos en la zona de muestras de genotipos heterocigotos.

Programa del iCycler:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	3' 00''	95° C
2 x 40	30''	95° C Desnaturalización
	45''	64° C Anillamiento Primers
	45''	68° C Anillamiento Sondas
3	∞	4° C

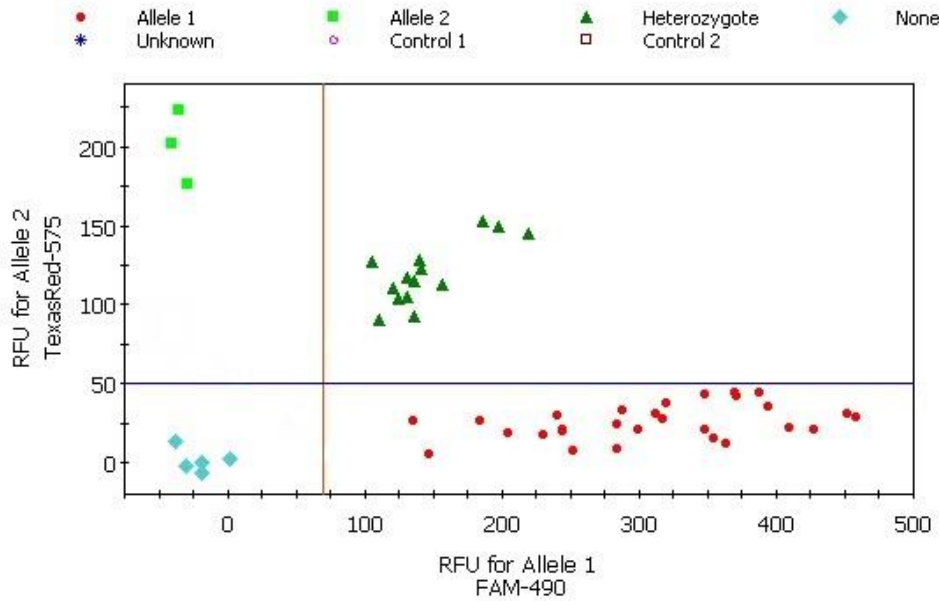


Figura 29. Ejemplo de resultados del polimorfismo rs6323 en población de mujeres. Aparecen las tres nubes estándares para esta técnica. Los puntos rojos equivalen a muestras homocigotas de genotipo TT.

3.3. POLIMORFISMO rs1799836 EN EL GEN MAO-B.

El polimorfismo de este gen se ha analizado mediante discriminación alélica utilizando sondas *Taqman* (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). Al igual que en el caso anterior este gen también se localiza en el cromosoma X por lo que deben tenerse en cuenta las mismas consideraciones, es decir, que en la población masculina no deben aparecer muestras heterocigotas.

La mezcla y reactivos utilizados fueron iguales a los polimorfismos anteriores.

Primers y sondas utilizados:

PRIMERS:

A: 5' TTCTGGCCTTTACCTTGGTG 3'

B: 5' GGTCTGACTGCCAGATTTTC 3'

SONDAS:

A: [TxRd] 5' AAGATGGTGTC A CTTTTGCTATTTG 3' [BHQ2]

B [6FAM] 5' AAGATGGTGTC G CTTTTGCTATTTG 3' [BHQ1]

El programa utilizado para la amplificación y detección alélica fue:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	3' 00''	95° C
2 x 40	30''	95° C Desnaturalización
	45''	61° C Anillamiento Primers
	45''	64° C Anillamiento Sondas
3	∞	4° C

En los resultados de esta técnica, como en el caso anterior, dado que el gen MAO-B está en el cromosoma X los hombres son hemicigotos, de tal modo que sólo pueden dar señal en uno u otro alelo mientras que en las mujeres encontraremos homocigotos para cada uno de los alelos además de individuos heterocigotos.

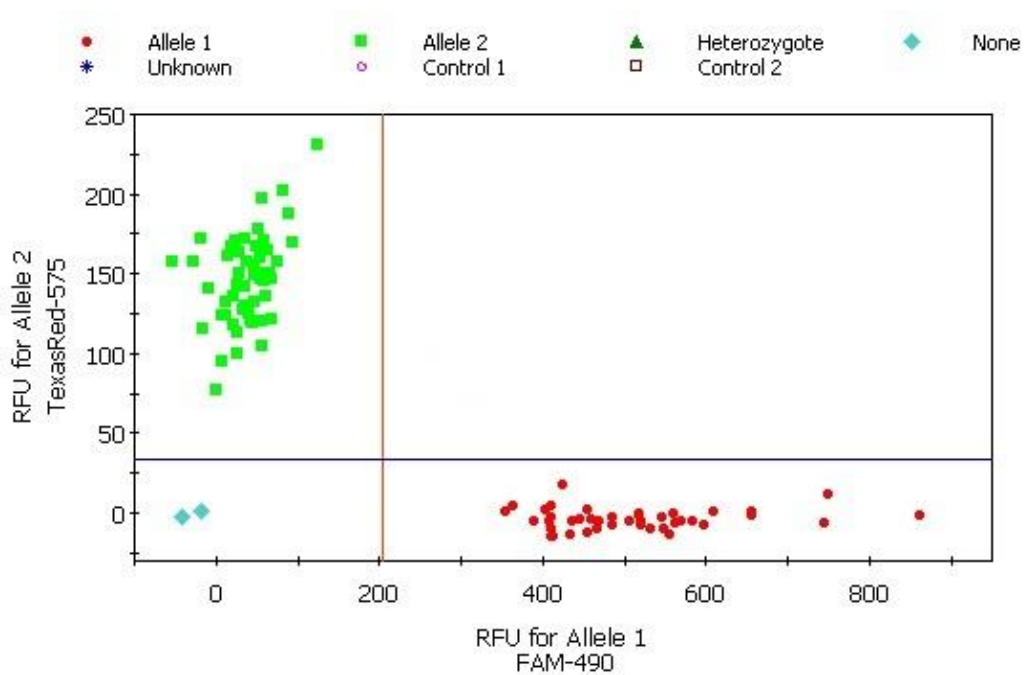


Figura 30. Ejemplo de resultados del polimorfismo rs1799836 del gen MAO-B en población de varones. Se observa la ausencia de muestras con genotipo heterocigoto.

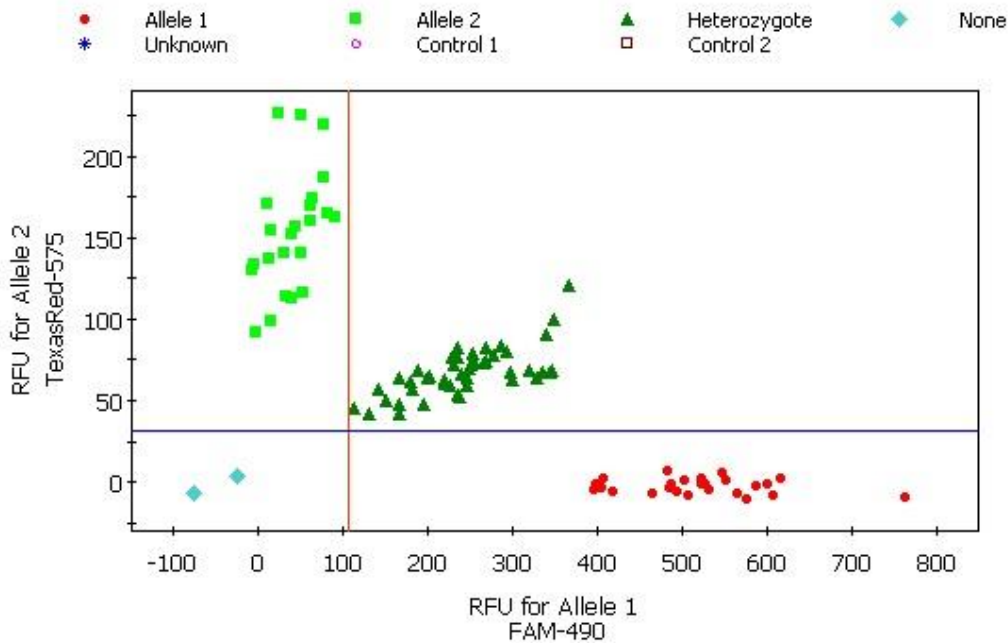


Figura 31. Ejemplo de resultados para el polimorfismo rs1799836 del gen MAO-B en población femenina.

3.4. POLIMORFISMO (AAT)_n EN EL GEN CNR1.

Se han utilizado dos técnicas para la determinación de este polimorfismo. En la primera de ellas se utilizó un gel de acrilamida-bisacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes (Sambroock et al., 1993). Esta técnica permitió seleccionar a los individuos homocigotos. Dichas muestras fueron secuenciadas para determinar con exactitud el número de repeticiones del triplete AAT que correspondía a cada alelo. La segunda técnica utilizada para determinar el genotipo del resto de la población del estudio fue el análisis de fragmentos (Mansfield et al., 2001).

GÉLES DE ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA.

Para la amplificación de la región del ADN que contiene el microsatélite se realizó la PCR en placas de 96 pocillos (Cutlek) partiendo de ADN genómico total a una concentración de 100 µM.

Los reactivos de partida tenían las condiciones siguientes: el volumen final de 10 µL quedaba ajustado a una cantidad de 80 ng de ADN. El buffer de partida 1X contiene: 10mM de Tris-HCl (pH=8,3) y 50mM de KCl. El MgCl₂ es de 2,5mM. La Taq utilizada para la reacción presenta 0,025 U/µL (Taq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). El DMSO tiene una concentración del 4%.

Los dNTPs son GeneAmp dNTPs de la empresa Applied Biosystems con una concentración de partida de 10 mM. Con ellos se preparó una mezcla que posteriormente se utiliza en la reacción de PCR. Dicha mezcla contiene 60,00 μL dATP, 60,00 μL dGTP, 60,00 μL dTTP, 0,75 μL de dCTP y 119,25 μL de H_2O .

El nucleótido marcado $\alpha\text{-dCTP}^{32\text{p}}$ (3000 Ci/mmol, Amershan Pharmacia Biotech) utilizado tiene una concentración inicial de 2,5 mM.

Mezcla utilizada para la PCR:

Componente	Cantidad (μL)
H_2O	1,496
BUFFER	2,000
MgCl_2	2,000
dNTPs	2,000
$\alpha\text{-dCTP}^{32\text{p}}$	0,140
Oligo A	0,566
Oligo B	0,566
DMSO	0,400
Taq Gold	0,100
ADN	0,800
Volumen Total	10,000 μL

Primers:

A: 5' GCTGCTTCTGTAAACCCTGC 3'

B: 5' ATTCCCACCTATGAGTGAGAAC 3'

El programa utilizado para realizar la PCR fue el siguiente:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	10'	94° C
2 x 35	1'	94° C Desnaturalización
	40"	58° C Anillamiento
	35"	72° C Elongación
3	6'	72° C
4	∞	4° C

RESOLUCIÓN DEL MICROSATÉLITE.

El producto obtenido de la PCR se desarrolla en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida al 6%. A los productos se les añade tampón de formamida en relación 1:1 y se desnaturaliza a 94°C durante 5 minutos. Tras la electroforesis los geles se dejan secar y se exponen sobre una película Kodak X-OMAT.

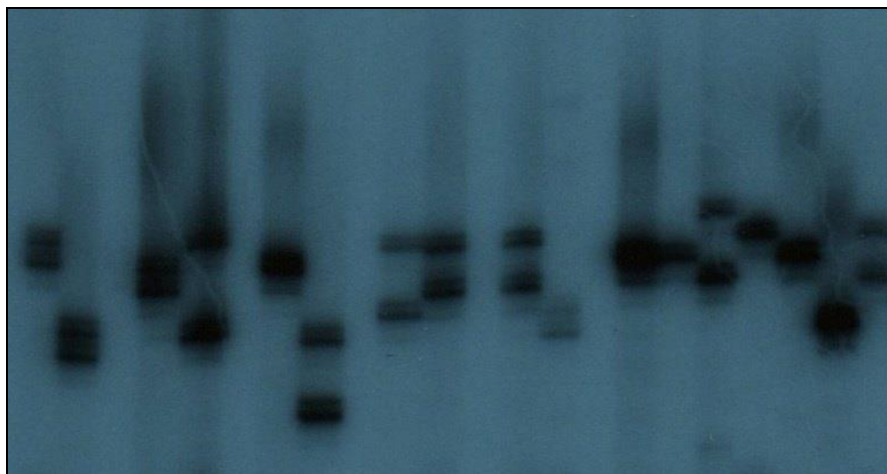


Figura 32. Autorradiografía; pueden distinguirse los diferentes alelos así como discriminar entre individuos homocigotos y heterocigotos.

SECUENCIACIÓN DEL MICROSATÉLITE.

Se seleccionaron aquellos individuos que eran homocigotos para proceder a la secuenciación y determinar las repeticiones correspondientes a cada uno de los alelos. Deben secuenciarse muestras homocigotas dado que las muestras heterocigotas para un polimorfismo de tipo microsatélite en un amplificado generan una secuencia con superposición de picos en desfase que impide su lectura. La secuenciación permite así determinar con total precisión el número de repeticiones del triplete. Estas muestras han servido como controles para la posterior técnica de análisis de fragmentos con la que se genotipó a toda la población del estudio.

ANÁLISIS DE FRAGMENTOS.

Para el análisis de fragmentos (Mansfield et al., 2001) se parte de ADN genómico a una concentración de 50 ng/ μ L.

La región que contiene el polimorfismo fue amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De los dos cebadores, o primers, necesarios para la reacción, el cebador antisentido (B) estaba marcado con la molécula fluorófora HEX.

Primers:

A: 5' GCTGCTTCTGTAAACCCTGC 3'

B: 5' ATTCCCACCTATGAGTGAGAAC 3' * HEX

Mezcla de reacción para el uso de Taq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA):

Componente	Cantidad (µL)
H ₂ O	9,875
BUFFER	2,500
MgCl ₂	2,000
dNTPs	2,000
Oligo A	2,500
Oligo B*	2,500
Taq Gold	0,125
ADN	2,500
Volumen Total	25 µL

Programa utilizado para la PCR:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	6'	94° C
2 x 38	45''	94° C Desnaturalización
	1'	55° C Anillamiento
	1'	72° C Elongación
3	10'	72° C
4	∞	4° C

El ajuste de la reacción se realizó para 25 µL de volumen final. Las especificaciones de los reactivos incluidos en la reacción son: H₂O Millipore; Gold buffer (15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl); (1.5 mM) MgCl₂; 200 µM dNTPs.

La Taq usada es *Taq Gold polymerase* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El producto amplificado es diluido en una proporción entre 1:1 a 1:4 en función del rendimiento obtenido en la reacción de amplificación. Para valorar dicho rendimiento se realiza una valoración semicuantitativa mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. En el gel se comparan las densidades ópticas de las bandas obtenidas.

Posteriormente se realiza una mezcla de carga:

- 1 μ L del producto amplificado ya diluido, 1 μ L de marcador de pesos (GeneScan-500 LIZ Size Estándar- Applied Biosystems) y 10 μ L de formamida.

La mezcla de carga se desnaturaliza durante 2 minutos a 90° C y es mantenida a 4° C al menos durante 5 minutos antes de su carga.

Para el análisis de fragmentos se utilizó un secuenciador (ABI Prism 310 Genetic Analyzer - Applied Biosystems) utilizando como polímero POP-4 (Applied Biosystems). Los resultados de la electroforesis fueron analizados finalmente utilizando el software comercial GeneMapper.4.0

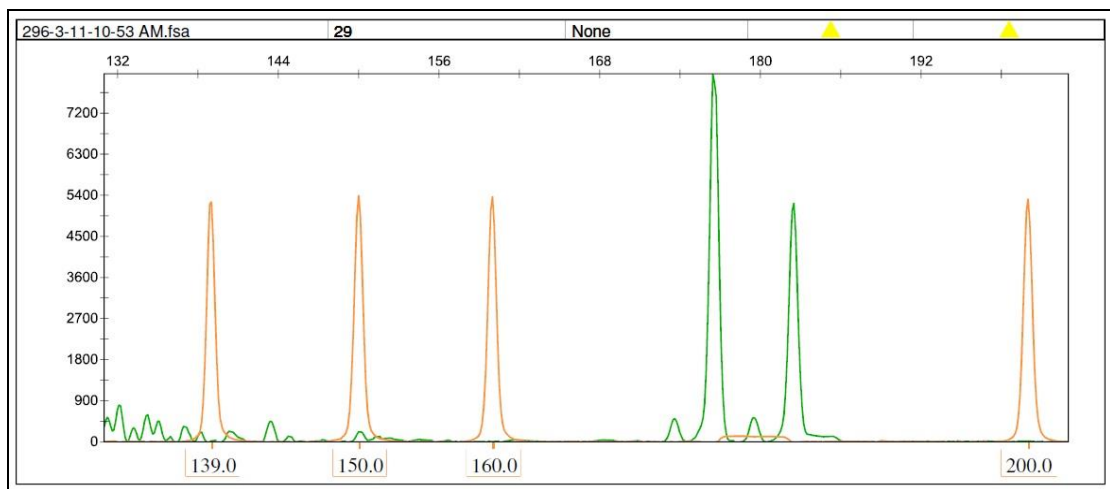


Figura 33. Análisis de fragmentos. Muestra de individuo heterocigoto, alelos 4 y 6, equivalentes a 10 y 12 repeticiones.

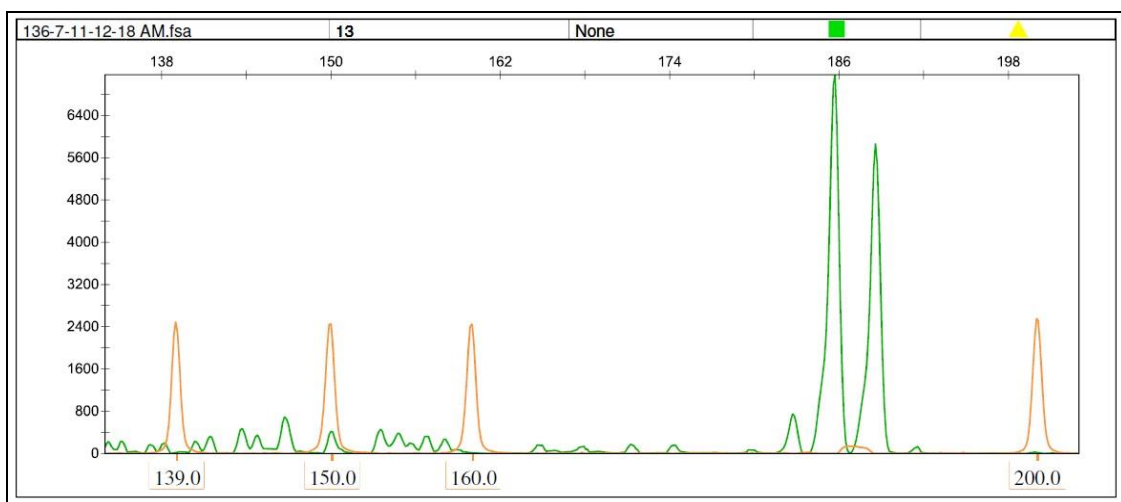


Figura 34. Análisis de fragmentos. Muestra de individuo heterocigoto, alelos 7 y 8, equivalentes a 13 y 14 repeticiones.

3.5. POLIMORFISMO rs35761398 EN EL GEN CNR2.

La determinación del polimorfismo rs35761398 del gen CNR2 se realizó mediante técnica de discriminación alélica por sondas *Taqman* (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). Los primers y las sondas fueron diseñadas a partir de la secuencia consenso obtenida de las bases de datos de *NCBI gene* y producidas por la empresa Sigma-Aldrich.

Los primers utilizados fueron:

PRIMERS:
A: 5' AAGACCACACTGGCCAGGAAG 3'
B: 5' CACTCTTCTGGGCCTGCTAAG 3'
SONDAS:
A: [TxRd] 5' TCCGGCGGAG <u>TT</u> GGTGGGAGGAC 3' [BHQ2]
B: [6FAM] 5' TCCGGCGGAG <u>CC</u> GGTGGGAGGAC 3' [BHQ1]

Para la amplificación y discriminación alélica se utilizó un termociclador iCycler de la empresa Bio-Rad, con sistema de detección MyiQ.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos Bio-Rad (*iQ™ 96-Well PCR Plates*). Para la mezcla de reacción se utiliza supermix comercial Bio-Rad (*iQ™ Supermix*) y se ajustó a un volumen de reacción de 20 µL por pocillo.

La mezcla utilizada fue:

Componente	Cantidad (µL)
Mastermix	10,000
Sonda A	2,000
Sonda B	2,000
Oligo A	2,000
Oligo B	2,000
ADN	2,000
Volumen Total	20,000 µL

El programa de amplificación fue el siguiente:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	3' 00''	95° C
2 x 40	30''	95° C Desnaturalización
	30''	55° C Anillamiento Primers
	30''	72° C Anillamiento Sondas
3	∞	4° C

La señal en uno de los fluoróforos indica la presencia del alelo correspondiente a la sonda, de este modo las muestras que dan señal en uno de ellos son consideradas homocigotas para el alelo equivalente y aquellas que dan señal en ambas sondas se consideran heterocigotas.

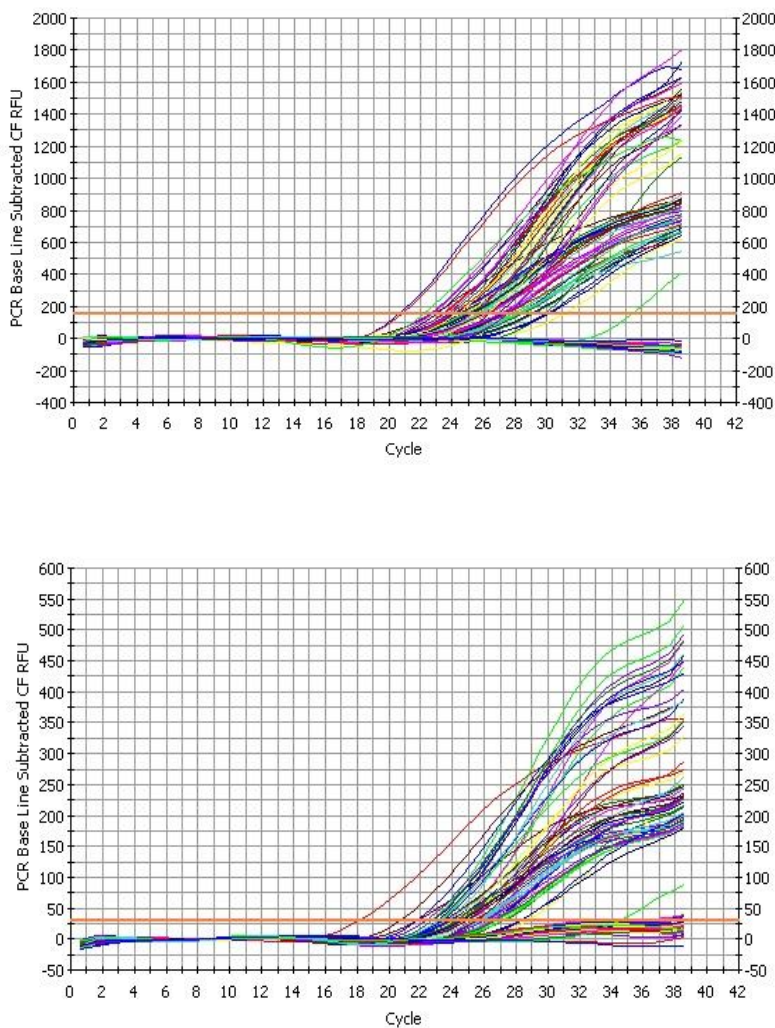


Figura 35. Gráficas de la señal ya procesada para cada una de las sondas.

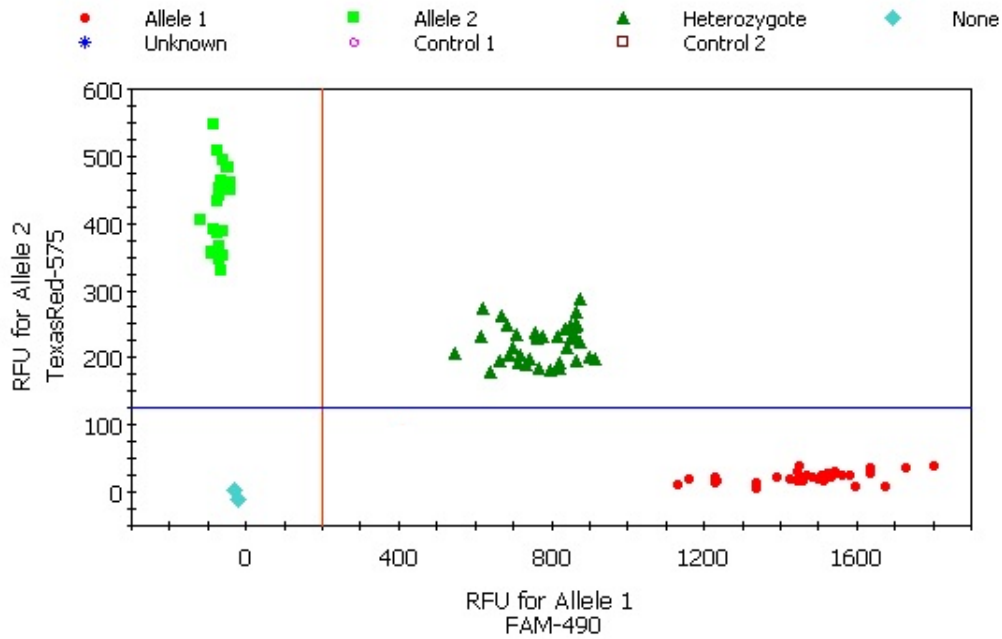


Figura 36. Ejemplo de resultados del polimorfismo rs35761398 del gen CNR2. Las nubes correspondientes a los distintos genotipos se separan con mayor nitidez que en otros polimorfismos dado que la sonda posee las dos bases de especificidad del dinucleótido.

De las primeras placas obtenidas se tomaron entre 10 y 15 muestras de cada uno de los tres genotipos posibles y se realizó secuenciación directa para comprobar la correcta correspondencia entre los resultados y el genotipo esperado. Dichas muestras confirmaron las determinaciones realizadas y sirvieron como muestras de control en las placas posteriores.

GELES SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

No obstante, dado que este polimorfismo es de tipo dinucleótido, podría esperarse que aparecieran alelos CT o TC. Estos alelos si bien aparecen en muy baja frecuencia han sido descritos en la bibliografía. Esto hace necesario el uso de una técnica complementaria. Para ello se realizó una técnica de tipo *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) (Orita et al., 1989). En las técnicas basadas en SSCP, los fragmentos de cadena sencilla migran en función de la conformación tridimensional que adoptan en las condiciones desnaturalizantes utilizadas, siendo diferente la conformación para cada alelo de cada polimorfismo.

Se realizó por lo tanto un cribado (*screening*) aleatorio entre todas las poblaciones del estudio para determinar si aparecían los alelos CT o TC.

Material y métodos.

Con vistas a realizar esta técnica se utiliza una nueva PCR. Los primers a utilizar son los utilizados en la discriminación alélica pero a diferente concentración, en este caso los primers se preparan a una concentración de 10 μM .

La mezcla de reacción utilizada es:

Componente	Cantidad (μL)
H ₂ O	7,375
BUFFER	2,500
MgCl ₂	2,000
dNTPs	0,500
Oligo A	2,500
Oligo B	2,500
Solución Q	1,000
Hot Star	0,125
ADN	2,500
Volumen Total	25 μL

El programa de amplificación fue:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	15'	95° C
2 x 40	1'	94° C Desnaturalización
	1'	61° C Anillamiento
	45"	72° C Elongación
3	10'	72° C
4	∞	4° C

Una vez obtenido el producto de PCR se toman 5 μL del amplificado y se mezclan con 5 μL de azul de formamida.

Preparación de 25 mL de azul de formamida:

- 23,75 mL de formamida al 99%.
- 1,25 mL de Cianol de xileno en dilución al 1%.
- 10 mg de Azul de bromofenol.

Material y métodos.

Una vez realizada la mezcla se desnaturaliza durante 6 minutos a 94°C y posteriormente se mantiene a 4°C hasta el momento de la carga del gel.

Los geles utilizados son GeneGel Excel 12.5/24 (GE Healthcare) y la electroforesis se realiza en la unidad GenePhor™ DNA Separation System (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) GenePhor Electrophoresis Unit.

La temperatura del proceso fue de 5° C para la correcta separación de las bandas de interés.

El revelado del gel se realiza una vez realizada la electroforesis utilizando los reactivos comerciales de la empresa GE Healthcare.

1- Fijación. Se utilizan 25 mL de la solución de Fijación comercial diluida en 76 mL de H₂O y 24 mL de etanol absoluto. El gel se mantiene en este baño al menos 30 minutos.

2- Se realiza la tinción con la solución de plata comercial realizando una dilución de 25 mL de dicha solución en 100 mL de H₂O. En este paso permanece 30 minutos.

3- Se realiza un lavado con agua bidestilada durante 1 minuto.

4- El líquido de revelado se diluye en la misma proporción que en el paso 2 y se mantiene el gel el tiempo necesario hasta la aparición de las bandas, aproximadamente de 6 a 10 minutos.

5- Finalmente se utiliza una dilución de 25 mL en 100 mL de la solución facilitada para parar la reacción y conservar el gel.

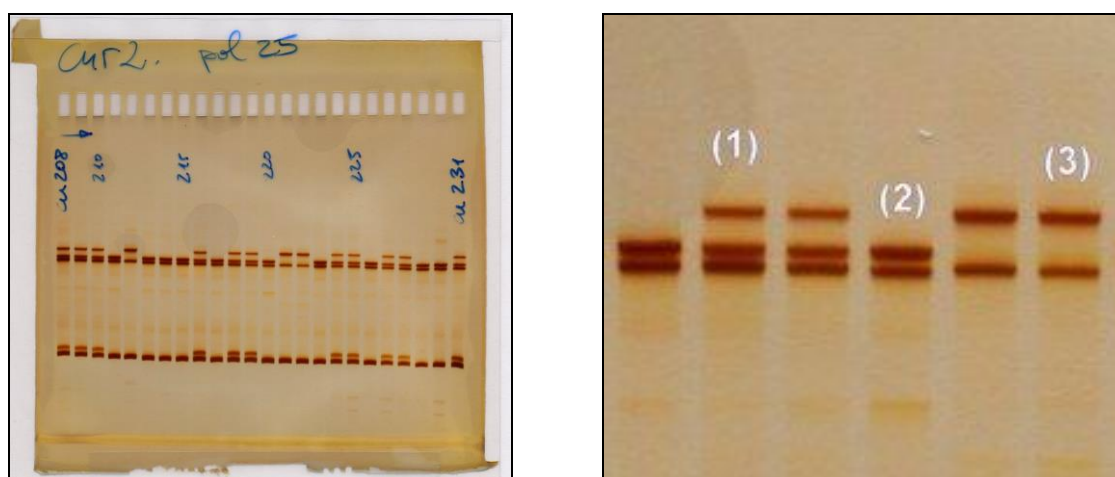


Figura 37. Patrones de bandas en geles de SSCP para el polimorfismo rs35761398. Pueden distinguirse las bandas correspondientes a los individuos homocigotos y el patrón heterocigoto como suma de los otros dos. (1) Genotipo heterocigoto (CC/TT). (2) Genotipo homocigoto (TT/TT). (3) Genotipo homocigoto (CC/CC)

3.6. POLIMORFISMO rs324420 EN EL GEN FAAH.

La determinación del genotipo para el polimorfismo rs324420 del gen FAAH se realizó mediante amplificación por PCR de la región en la que aparece el SNP y posterior desarrollo y análisis del producto amplificado en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes SSCP (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). Las condiciones generales son las descritas anteriormente.

Los primers utilizados fueron los siguientes:

A: 5' GGCCAGCCTCCTTTTATCTTATG 3'

B: 5' GACGATGGAGGCCTGGCGA 3'

La mezcla de reactivos para la PCR fue la siguiente:

Componente	Cantidad (μ L)
H ₂ O	10,375
BUFFER	2,500
MgCl ₂	1,500
dNTPs	2,000
Oligo A	2,500
Oligo B	2,500
DMSO	1,000
Taq Gold	0,125
ADN	2,500
Volumen Total	25 μ L

Gold buffer (15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl), MgCl₂ 1,5 mM, primers preparados a una concentración 10 μ M, Taq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El programa utilizado en el termociclador fue:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	10'	94° C
2 x 35	1'	94° C Desnaturalización
	35"	61° C Anillamiento
	40"	72° C Elongación
3	10'	72° C
4	∞	4° C

La mezcla de 5 μ L de amplificado y 5 μ L de azul de formamida se desnaturaliza a una temperatura de 94° C durante 6 minutos y se mantiene a 4° C hasta la carga en el gel.

La electroforesis se realiza en GenePhor™ DNA Separation System (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a 15°C.

Finalmente se realiza el revelado del gel, en el que se distinguen 3 patrones diferentes de acuerdo a lo esperado. Se eligieron 10 muestras de cada tipo de patrón para su secuenciación de tal manera que pudo determinarse la correspondencia entre el patrón y el genotipo. Una vez establecido el patrón para los dos tipos de homocigoto y del heterocigoto se realizó el resto de las valoraciones en sucesivos geles.

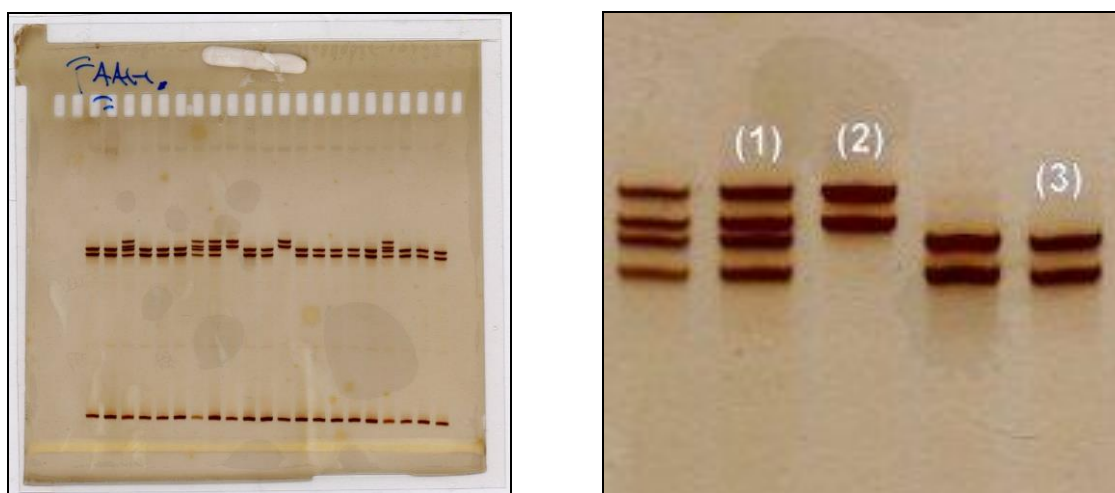


Figura 38. Patrones de bandas en geles de SSCP para el polimorfismo rs324420. Pueden distinguirse las bandas correspondientes a los individuos homocigotos y el patrón heterocigoto como suma de los otros dos. (1) Genotipo heterocigoto (CA). (2) Genotipo homocigoto (AA). (3) Genotipo homocigoto (CC)

3.7. POLIMORFISMO rs1468412 EN EL GEN GRM3.

Para el genotipado del polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 utilizando una técnica de discriminación alélica por sondas *Taqman*. Los primers y las sondas se diseñaron a partir de la secuencia consenso consultadas en las bases de datos de *NCBI gene* y producidas por la empresa Sigma-Aldrich.

La mezcla y las condiciones de los reactivos fueron las mismas que las utilizadas para otros polimorfismos en los que se usó la misma técnica.

Primers y sondas utilizadas:

PRIMERS:

A: 5' CCTGGAGTAGAATTCACATTC 3'

B: 5' CAAGAATCTCCAGTGACAATC 3'

SONDAS:

A: [TxRd] 5' ATAGGCAGTA I AATGATTGTTATCTC 3' [BHQ2]

B: [6FAM] 5' ATAGGCAGTA A AATGATTGTTATCTC 3' [BHQ1]

Programa del iCycler utilizado:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	3' 00"	95° C
2 x 40	30"	95° C Desnaturalización
	45"	56° C Anillamiento Primers
	30"	63° C Anillamiento Sondas
3	∞	4° C

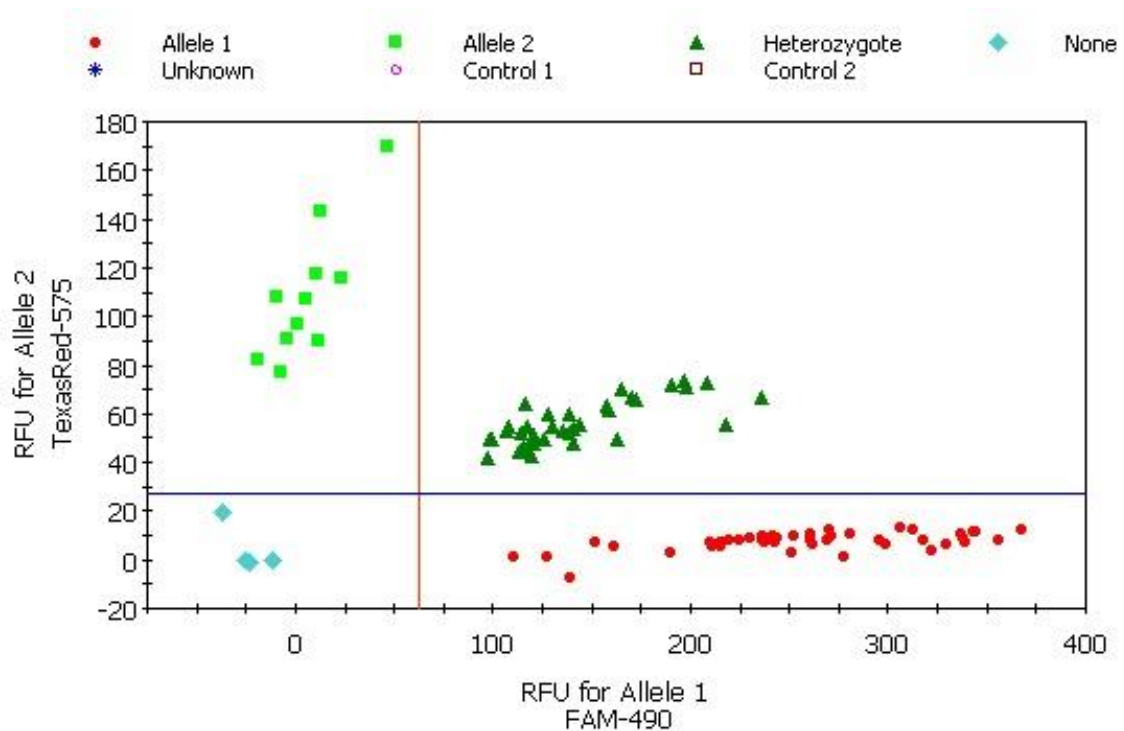


Figura 39. Ejemplo de resultados para el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 en el que se observan los tres genotipos posibles.

4. SECUENCIACIÓN.

4.1. LAVADO DEL PRODUCTO DE PCR.

Partiendo del producto obtenido de la PCR correspondiente a cada uno de los polimorfismos que se van a amplificar, hay que eliminar los restos de ADN genómico, reactivos y primers del fragmento de interés amplificado.

En este caso se han utilizado columnas comerciales *Speedtools PCR Clean-up Kit* de la empresa *Biotoools B&M Laba S.A.*

Los pasos a seguir son los siguientes:

- 1- Se mezcla el volumen de muestra con 2 volúmenes del Buffer de lavado.
- 2- La mezcla se carga sobre la columna montada sobre un tubo colector de 2 mL. Una vez preparado se centrifuga a 14.000 rpm durante 1 minuto.
- 3- El filtrado del tubo colector se desecha quedando el fragmento amplificado en el filtro de la columna.
- 4- Se realiza un segundo lavado de la membrana con 600 µL de un segundo buffer centrifugando a 14.000 rpm durante 1 minuto.
- 5- Para secar la membrana y eliminar restos del buffer anterior se vuelve a centrifugar durante 2 minutos a 14.000 rpm.
- 6- Finalmente se utiliza un buffer de elución en una cantidad de 15 a 50 µL. En este paso se centrifuga a 14.000 rpm quedando el producto de PCR en el eluido.

4.2. REALIZACIÓN DE PCR CON dNTPs TERMINADORES.

A partir del producto amplificado ya lavado se realiza una segunda PCR con dNTPs terminadores. En este caso se utiliza BigDye Terminator V.3.1. (*Applied Biosystems*) Se hace una dilución de los primers a utilizar a una concentración de 5 µM. Para cada muestra utilizamos uno de los primers, a diferencia de las PCRs estándar en las que se utilizan un primer y el reverso. En este caso se utiliza el primer de la cadena que quiera secuenciar.

La mezcla utilizada fue la siguiente:

Componente	Cantidad (µL)
H2O	11,50
Buffer	2,00
BigDye	2,50
Oligo	2,00
ADN	2,00
Volumen Total	20,00 µL

Programa de secuenciación:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	1' 00"	96° C
2 x 25	10"	96° C Desnaturalización
	10"	51° C Anillamiento
	1'30"	60° C Elongación
3	∞	4° C

Una vez terminado el programa anterior se realiza un lavado con detergente SDS al 2,2 % para mejorar la calidad de señal durante la secuenciación. Este paso se realiza en los mismos microtubos utilizados en la PCR de amplificación.

Programa de lavado SDS:

Ciclo	Tiempo	Temperatura
1	7'	98° C
2	10'	25° C
3	∞	4° C

4.3 LAVADO DE LOS RESTOS DE LOS TERMINADORES Y CARGA.

Para realizar la limpieza de los terminadores se ha seguido el siguiente protocolo:

- 1- Se toman 10 μ L de la reacción anterior y se le añaden:
 - 1,50 μ L Acetato sódico 3M, pH (4,6 – 5,2)
 - 31,25 μ L Etanol al 95 %
 - 7,50 μ L H₂O Millipore.
- 2- Se realiza la mezcla y se deja reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3- Se centrifuga 20 minutos a 12.000 g con precaución de tomar referencia de dónde queda el pellet.
- 4- Se retira el líquido sobrenadante y se añaden 250,00 μ L de etanol al 70 % y se mezcla por vórtex para resuspender el pellet.
- 5- Se centrifuga a 12.000 g durante 5 minutos.
- 6- El sobrenadante se retira y se deja secar el pellet por completo comprobando que no queden restos de etanol.
- 7- Se resuspende el pellet con 10 a 15 μ L de H₂O.

Una vez resuspendido el pellet, se mezclan 10 µL del producto ya limpio con 10 µL de formamida para realizar la carga.

El secuenciador utilizado fue un ABI Prism 310- Genetic Analyzer y el polímero para la secuenciación POP-6 (*Applied Biosystems*) sobre un capilar de 30 cm.

Posteriormente los datos obtenidos son analizados utilizando el software Sequence Scan 4.0. (*Applied Biosystems*).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y HERRAMIENTAS INFORMATICAS.

5.1. ANALISIS ESTADISTICO.

Siguiendo una metodología de estudio genético de asociación por genes candidato en poblaciones no emparentadas de casos y controles, se configuraron diversos test. El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones fue conformado utilizando las especificaciones enunciadas por Falconer & Mackay (1996), Laird & Lange (2011), Khoury & Beaty (1994) y Gambaro et al. (2000). Se configuraron diversos tipos de test: χ^2 de Pearson y de Cochran-Armitage para las variables cualitativas; t de Student, análisis de varianza y ANOVA para las variables cuantitativas con distribución normal; prueba U de Mann-Whitney para las variables cuantitativas sin distribución normal. Se consideraron valores significativos de (p) los inferiores a 0,05. No obstante se realizaron las correcciones necesarias para cada análisis.

Se ha dado prioridad al test χ^2 de Pearson y, en los casos necesarios, a la corrección de Yates y a la corrección de Bonferroni por ser considerados como los parámetros que ofrecen resultados más robustos dado que son los más restrictivos.

Con objeto de valorar que el test de contraste de hipótesis tuviera suficiente poder estadístico para detectar el efecto a observar, se estimó el número necesario de pacientes utilizando la fórmula:

$$n = \left[\frac{z_{(\alpha/2)}\sqrt{2p(1-p)} + z_{(1-\beta)}\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right]^2$$

Donde $Z_{(\alpha/2)} = 1,96$ para un intervalo de confianza del 95% y $Z_{(1-\beta)} = 0,842$ para una potencia estadística del 80%. Se realizaron los cálculos *a priori* para valorar el tamaño de muestra necesario y *a posteriori* para valorar la reproducibilidad del estudio. Se replicaron los cálculos con el software estadístico referido en el siguiente apartado.

5.2. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.

Se utilizaron las siguientes herramientas informáticas como soporte para el cálculo, análisis estadístico, análisis de resultados y desarrollo específico de diversas aplicaciones

- Haploview 4.2.
- Cn3D versión 4.3.
- Sequencing Analysis. Software v5.2.
- GeneMapper. Software v3.0.
- SSPS versión 19.0.
- OpenEpi versión 3.01.
- EpiCalc2000 versión 1.02.
- Quanto versión 1.2.4.
- Aplicaciones Microsoft Office Excel 2007.
- Genepop versión 4.2.

Se destacan también las siguientes direcciones web de especial interés en el desarrollo del presente estudio.

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
Herramienta de análisis de alineamiento de secuencias.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
Base de datos para consulta de polimorfismos SNP y SNV.
- <https://roslab.org/services/snap/>
- <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
Aplicaciones para predecir posible impacto en la sustitución de bases.
- <http://www.socscistatistics.com/>
Aplicaciones estadísticas.

Resultados.

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DEL ESTUDIO.

En la Tabla 1 se muestran las características demográficas correspondientes a las poblaciones que se incluyeron en el presente trabajo. Los porcentajes de género en esquizofrenia y trastorno bipolar en la población reclutada son similares a los reportados por otros estudios (Regier et al., 1990; Messias et al., 2007; Power et al., 2013) y en ellos cabe destacar el marcado componente de género en la esquizofrenia y especialmente en la patología dual (psicosis dual), con un 87,90% de varones frente a un 12,10% de mujeres, para una población de 124 individuos reclutados.

		Controles N=316	Esquizofrenia N=379	Psicosis Dual N=124	Trastorno Bipolar N=120	TUS N=71
	% Varones	42,72	60,16	87,90	43,33	70,12
Edad	\bar{x} (S_x):	41,23 (15,78)	39,22 (10,54)	32,72 (8,54)	41,90 (11,77)	28,74 (6,29)
	M_e (P_{25} - P_{75}):	41 (27 – 65)	39 (32 – 45)	30 (27 – 39)	42 (34 – 52)	28 (25 – 34)
Edad de inicio	\bar{x} (S_x):		24,09 (6,61)	23,17 (5,45)	26,24 (9,84)	
	M_e (P_{25} - P_{75}):		23 (19 – 28)	22 (19 – 26)	24 (18 – 32)	
Edad de inicio del consumo	\bar{x} (S_x):			17,76 (4,09)		16,83 (4,41)
	M_e (P_{25} - P_{75}):			17 (15 – 18)		16 (15 – 17)
PANSS-Positivo, \bar{x} (95% CI) :			22,6 (20,7-24,5)	21,5 (18,8-24,1)		
PANSS-Negativo, \bar{x} (95% CI) :			23,8 (22,0-25,6)	20,1 (17,0-23,2)		
PANSS-Global, \bar{x} (95% CI) :			36,3 (34,2-38,3)	33,5 (31,0-35,9)		

Tabla 1. Descripción general de las diferentes poblaciones incluidas en el presente estudio. PANSS: Positive and Negative Syndrome Scale (Kay et al., 1987). Se muestran las puntuaciones medias y los intervalos de confianza correspondientes al 95%.

\bar{x} : media. S_x : Desviación estándar. M_e : mediana. (P_{25} - P_{75}): percentiles 25 y 75 de la muestra.

Esta vinculación de la situación de psicosis dual (esquizofrenia y trastorno por uso de sustancias) con la población masculina resulta altamente significativa, obteniéndose un $\chi^2 = 32,53$ y un valor de significación $p < 10^{-7}$, OR: 4,81, IC: 95% [2,70-8,58]. En el caso de la población con trastorno bipolar, de los 120 individuos que componen la población, únicamente 12 presentaban una situación comórbida con TUS. De los 12, el 83,33% eran hombres. Se observa también que en la población de consumidores sin síntomas psiquiátricos el porcentaje de hombres supera al de mujeres. Sin embargo, se muestra más cercano al porcentaje presente en la población

de pacientes con esquizofrenia. Por lo tanto, la población de pacientes reclutada muestra una distribución de prevalencias para las distintas situaciones patológicas que concuerda con los datos epidemiológicos conocidos y por ello se considera a la muestra como representativa. No obstante, no es el objetivo del presente trabajo valorar las diferencias de prevalencia que puedan existir entre las poblaciones. Pueden consultarse datos adicionales de edad, consumo y tratamiento en las tablas incluidas en el apartado de Anexos.

2. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN LA POBLACIÓN CONTROL.

Se genotipó a los individuos pertenecientes a la población control y se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas de los 7 polimorfismos principales elegidos para el estudio. Los resultados se presentan en las tablas 2, 3 y 4.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs4680 (COMT)	Mujeres	GG	54 (29,83)	G	189 (52,21)
		GA	81 (44,75)	A	173 (47,79)
		AA	46 (25,41)		
	Hombres	GG	48 (35,56)	G	165 (61,11)
		GA	69 (51,11)	A	105 (38,89)
		AA	18 (13,33)		
rs6323 (MAO-A)	Mujeres	TT	101 (55,80)	T	271 (74,86)
		TG	69 (38,12)	G	91 (25,14)
		GG	11 (6,08)		
	Hombres (*)	T	105 (77,78)	T	105 (77,78)
		G	30 (22,22)	G	30 (22,22)
	rs1799836 (MAO-B)	Mujeres	TT	53 (29,28)	T
TC			84 (46,41)	C	172 (47,51)
CC			44 (24,31)		
Hombres (*)		T	78 (57,78)	T	78 (57,78)
		C	57 (42,22)	C	57 (42,22)

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos pertenecientes a genes del sistema dopaminérgico en población control. (*) Los genes MAO-A y MAO-B están en el cromosoma X, por ello los hombres son hemicigóticos y las frecuencias genotípicas coinciden con las alélicas.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
(AAT)n (CNR1) (1)	Mujeres	LL	93 (51,38)	L	258 (71,27)
		LC	72 (39,78)	C	104 (28,73)
		CC	16 (8,84)		
	Hombres	LL	78 (57,78)	L	200 (74,07)
		LC	44 (32,59)	C	70 (25,93)
		CC	13 (9,63)		
	Combinada	LL	171 (54,11)	L	458 (72,47)
		LC	116 (36,71)	C	174 (27,53)
		CC	29 (9,18)		
rs35761398 (CNR2) (2)	Mujeres	CC/CC	57 (31,49)	CC	202 (55,80)
		CC/TT	88 (48,62)	TT	160 (44,20)
		TT/TT	36 (19,89)		
	Hombres	CC/CC	44 (32,59)	CC	152 (56,30)
		CC/TT	64 (47,41)	TT	118 (43,70)
		TT/TT	27 (20,00)		
	Combinada	CC/CC	101 (31,96)	CC	354 (56,01)
		CC/TT	152 (48,10)	TT	278 (43,99)
		TT/TT	63 (19,94)		
rs324420 (FAAH)	Mujeres	CC	116 (64,09)	C	293 (80,94)
		CA	61 (33,70)	A	69 (19,06)
		AA	4 (2,21)		
	Hombres	CC	86 (63,70)	C	215 (79,63)
		CA	43 (31,85)	A	55 (20,37)
		AA	6 (4,44)		
	Combinada	CC	202 (63,92)	C	508 (80,38)
		CA	104 (32,91)	A	124 (19,62)
		AA	10 (3,16)		

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos pertenecientes a genes del sistema endocannabinoide en población control. (1) En el polimorfismo (AAT)n se ha utilizado la notación (L) para los alelos largos, 11 repeticiones o más, y (C) para los alelos cortos, 10 repeticiones o menos. (2) El polimorfismo rs35761398 es un dinucleótido.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs1468412 (GRM3)	Mujeres	AA	105 (58,01)	A	275 (75,97)
		AT	65 (35,91)	T	87 (24,03)
		TT	11 (6,08)		
	Hombres	AA	70 (51,85)	A	194 (71,85)
		AT	54 (40,00)	T	76 (28,15)
		TT	11 (8,15)		
	Combinada	AA	175 (55,38)	A	469 (74,21)
		AT	119 (37,66)	T	163 (25,79)
		TT	22 (6,96)		

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 en la población control.

Con las frecuencias alélicas se han calculado los valores de las frecuencias genotípicas esperadas en un equilibrio Hardy-Weinberg. No aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias esperadas y las observadas, a excepción de un valor de significación en la distribución de frecuencias de la población femenina para el polimorfismo rs4680.

GEN	POLIMORFISMO	GÉNERO	χ^2	Valor p
COMT	rs4680	Mujeres	5,6133	0,0178
		Hombres	2,6369	0,1044
MAO-A	rs6323	Mujeres	0,4479	0,5033
		Hombres	0,6099	0,4348
MAO-B	rs1799836	Mujeres	2,0677	0,1504
		Hombres	1,5158	0,2182
CNR1	(AAT)n	Mujeres	0,5389	0,4628
		Hombres	3,2414	0,0717
CNR2	rs35761398	Mujeres	0,0467	0,8289
		Hombres	0,1874	0,6650
FAAH	rs324420	Mujeres	1,5451	0,2138
		Hombres	0,1229	0,7259
GRM3	rs1468412	Mujeres	0,8676	0,3516
		Hombres	0,6299	0,4274

Tabla 5. Valores del test de χ^2 en el contraste de las frecuencias obtenidas respecto a las esperadas en el equilibrio Hardy-Weinberg. Valores (p) calculados para 1 grado de libertad.

2.1. DIFERENCIAS EN LAS FRECUENCIAS DEL POLIMORFISMO rs4680 ENTRE LA POBLACIÓN CONTROL MASCULINA Y FEMENINA.

Han podido observarse diferencias destacables entre las poblaciones masculina y femenina en las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4680 perteneciente al gen COMT. Estas diferencias no aparecen en ninguno de los otros polimorfismos, para los cuales, la misma población control, conforma una muestra homogénea entre hombres y mujeres.

Estas diferencias resultan estadísticamente significativas (ver Tabla 6), por lo que se ha excluido la población combinada o unificada (hombres y mujeres en un solo grupo) del análisis de asociación de este polimorfismo con las distintas patologías, manteniendo únicamente el análisis independiente y separado para cada género.

rs4680 (COMT)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
Codominante	7,0154	0,0300	
Alelos	4,9732	0,0257	0,70 [0,50-0,96]
Modelo Recesivo	6,9876	0,0082	0,45 [0,25-0,82]

Tabla 6. Diferencias significativas en la comparación entre el grupo de hombres y de mujeres en la población control.

Estas diferencias en las frecuencias del polimorfismo rs4680 (ver tablas 1 y 6) en la población control se observan tanto en la distribución de genotipos como en la de alelos. Además, el ajuste a los posibles modelos ofrece como resultado un modelo de acción recesivo para el alelo A. Por consiguiente, es el genotipo homocigoto AA el que presenta una gran diferencia en su porcentaje de aparición: 25,41% en mujeres, frente a un 13,33% en hombres.

Dadas estas diferencias en las frecuencias del polimorfismo rs4680 entre la muestra poblacional de hombres y de mujeres, se han utilizado variables de genética de poblaciones para valorar la implicación de este hallazgo en la población control (Falconer y Mackay, 1996). Así pues, se calculó el valor de fitness correspondiente a los distintos genotipos, considerando así la posible existencia de un conflicto sexual intralocus (IASC) específico de este polimorfismo (ver tablas 7 y 8).

El cálculo del fitness se ha realizado en base al criterio de normalización o estandarización que toma el mayor ratio observado/esperado como valor de referencia igual a 1,00. De esta manera se obtienen valores de fitness para el resto de los genotipos inferiores a la unidad.

GENOTIPO	RATIO (OBS/ESP)	RATIO (OBS/ESP)
GG	0,935	1,114
GA	0,904	1,032
AA	1,367	0,717
	MUJERES	HOMBRES

Tabla 7. Ratios de las frecuencias genotípicas. El valor se obtiene mediante la fracción: frecuencia observada (OBS) partido de la frecuencia esperada (ESP) en un equilibrio Hardy-Weinberg.

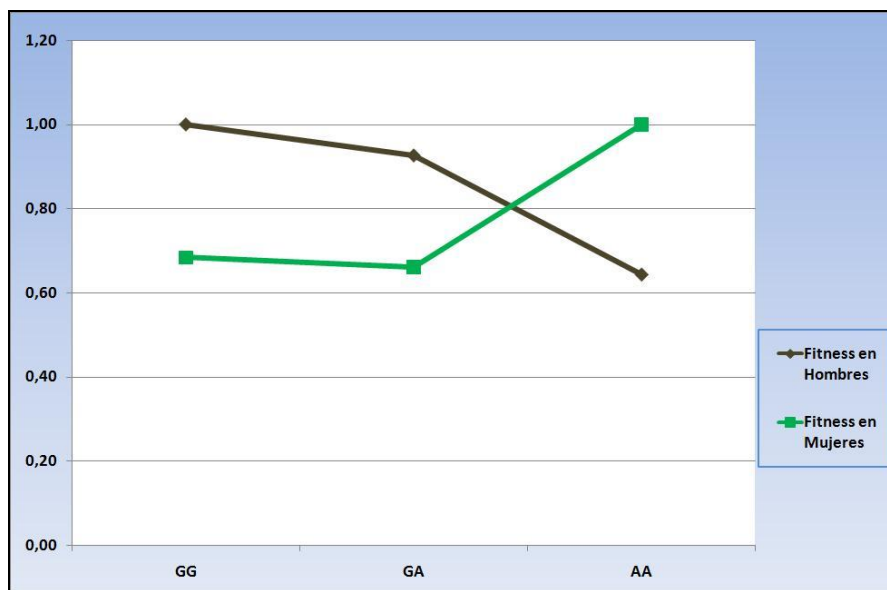
Puede observarse en la Tabla 7 que los ratios para los genotipos GG y GA son muy similares dentro del mismo género, mientras que ambos difieren respecto al ratio del genotipo AA. Esta situación es la misma que la encontrada en la valoración del modelo de herencia para las diferencias obtenidas entre géneros por el test de χ^2 . Por tanto, ambas aproximaciones son coherentes entre sí e indican un valor selectivo opuesto entre hombres y mujeres.

	MUJERES	HOMBRES
GG	0,684	1,000
GA	0,661	0,926
AA	1,000	0,644
	Valores de fitness.	

Tabla 8. Cálculo de los valores de fitness para los diferentes genotipos. Se toma como valor de normalización el valor de mayor ratio.

En la Tabla 8 se muestra que los genotipos GG y GA conservan valores de fitness similares dentro de cada género, siendo el valor correspondiente al genotipo AA el discrepante, análogamente a lo que sucede con el ratio y en coherencia a los resultados obtenidos anteriormente en el cálculo de los valores de χ^2 .

Esta situación, en la cual aparecen diferentes valores de fitness para un alelo o un genotipo concreto en función del género en el que se presenta, describe un modelo denominado "conflicto sexual intralocus" (IAS) para los alelos G y A del polimorfismo rs4680 en la población control no psiquiátrica, considerada como representativa de la población general de la cual se ha reclutado.



Gráfica 2. Representación gráfica de los valores de fitness en población control.

Por tanto, el alelo A tendría una acción recesiva, es decir, la influencia sobre el valor de fitness se produce cuando este alelo está presente en homocigosis. Esta homocigosis actúa de manera contrapuesta para cada uno de los géneros. Así pues, el genotipo AA supone una ventaja en el valor de fitness de la población femenina, mientras que el mismo genotipo produce una desventaja en la población masculina.

3. RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN PACIENTES.

3.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.

Se genotiparon los polimorfismos rs4680, rs6323 y rs1799836 en la población de pacientes con esquizofrenia sin trastorno por uso de sustancias y se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas. Para la valoración de diferencias que implicaran asociación entre los polimorfismos y la situación patológica se realizaron test de χ^2 para contraste de hipótesis (prueba χ^2 de Pearson). Se tuvieron en cuenta análisis multivariantes con diferentes variables de confusión demográfica.

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para la distribución de frecuencias. En la Tabla 10 se exponen los resultados de asociación para el análisis básico del modelo codominante (valoración independiente de los genotipos) y para la acción alélica.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs4680 (COMT)	Mujeres	GG	48 (31,79)	G	180 (59,60)
		GA	84 (55,63)	A	122 (40,40)
		AA	19 (12,58)		
	Hombres	GG	58 (25,44)	G	225 (49,34)
		GA	109 (47,81)	A	231 (50,66)
		AA	61 (26,75)		
rs6323 (MAO-A)	Mujeres	TT	88 (58,28)	T	228 (75,50)
		TG	52 (34,44)	G	74 (24,50)
		GG	11 (7,28)		
	Hombres (*)	T	169 (74,12)	T	169 (74,12)
		G	59 (25,88)	G	59 (25,88)
rs1799836 (MAO-B)	Mujeres	TT	46 (30,46)	T	161 (53,31)
		TC	69 (45,70)	C	141 (46,69)
		CC	36 (23,84)		
	Hombres (*)	T	123 (53,95)	T	123 (53,95)
		C	105 (46,05)	C	105 (46,05)

Tabla 9. Frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos pertenecientes a genes del sistema dopaminérgico en población de pacientes con esquizofrenia sin consumo. (*) Los genes MAO-A y MAO-B están en el cromosoma X, por ello los hombres son hemigigóticos y las frecuencias genotípicas coinciden con las alélicas.

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs4680 (COMT)	Mujeres	Codominante	8,9854	2	0,0112	
		Alelos	3,6445	1	0,0563	0,74 [0,54 ; 1,01]
	Hombres	Codominante	10,1789	2	0,0062	
		Alelos	9,4480	1	0,0021	1,61 [1,19 ; 2,19]
rs6323 (MAO-A)	Mujeres	Codominante	0,5765	2	0,7496	
		Alelos	0,0355	1	0,8505	0,97 [0,68 ; 1,38]
	Hombres	Codominante /Alelos	0,6121	1	0,4340	1,22 [0,74 ; 2,02]
rs1799836 (MAO-B)	Mujeres	Codominante	0,0551	2	0,9728	
		Alelos	0,0450	1	0,8320	0,97 [0,71 ; 1,31]
	Hombres	Codominante/Alelos	0,5035	1	0,4780	1,17 [0,76 ; 1,79]

Tabla 10. Resultados de asociación en los polimorfismos de genes pertenecientes al sistema dopaminérgico.

Para el SNP rs4680 se contrastaron los diversos modelos de herencia posibles, encontrando que los resultados se ajustaban óptimamente a un modelo de herencia recesivo para el alelo A (ver Tabla 11).

rs4680 (COMT)	GENERO	GENOTIPO	CNTR, N (%)	ESQZ, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
	Mujeres	GG+GA	135 (74,59)	132 (87,42)	8,6085	0,0034	0,42 [0,24 ; 0,76]
		AA	46 (25,41)	19 (12,58)			
	Hombres	GG+GA	117 (86,67)	167 (73,25)	8,9702	0,0027	2,37 [1,33 ; 4,22]
		AA	18 (13,33)	61 (26,75)			

Tabla 11. Ajuste de resultados a un modelo de herencia recesivo para el alelo A del polimorfismo rs4680 y valores de asociación para dicho modelo.

Los cálculos *a priori* del número necesario de pacientes para obtener una potencia estadística del 80% indicaban valores de 134 mujeres y 187 hombres. Superadas estas cifras en la muestra reclutada, las potencias estadísticas obtenidas finalmente *a posteriori* son de un 84,4% para la muestra de mujeres y de un 86,86% para la muestra de hombres.

Por lo tanto, se estima que los resultados son consistentes para aceptar la asociación del polimorfismo rs4680 con la situación patológica de esquizofrenia.

De manera similar a lo que sucedía en la población control, también se comprueba que existe una marcada diferencia de distribución en las frecuencias del polimorfismo rs4680 dentro de la propia población de pacientes. En esta población la frecuencia del genotipo AA presenta un valor contrapuesto. Así pues, en población con esquizofrenia, la frecuencia del genotipo AA es mayor en hombres que en mujeres. Estas diferencias son estadísticamente significativas y permiten sacar, de manera independiente incluso en ausencia de la población control, las mismas conclusiones respecto al genotipo AA que las enunciadas en el apartado anterior.

rs4680 (COMT)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
Codominante	11,0438	0,0040	
Alelos	7,6869	0,0056	1,51 [1,13 - 2,03]
Modelo Recesivo	10,9554	0,0009	2,54 [1,44 - 4,46]

Tabla 12. Diferencias significativas en la comparación entre el grupo de hombres y el de mujeres en la población de pacientes con esquizofrenia sin consumo. En este caso el cálculo de potencia estadística es del 92,65%.

Por consiguiente, los resultados muestran una asociación tanto en la población masculina como en la femenina, pero se evidencia una diferencia de sentido en las dos poblaciones. En la población masculina, al comparar las frecuencias entre controles y pacientes, aparece un aumento muy marcado del genotipo AA, que pasa de un 13,33% a un 26,75%. Esto indica que el genotipo AA se muestra como un genotipo de riesgo vinculado a la patología. El ajuste de las frecuencias ofrece como resultado un modelo de herencia recesivo para el alelo A (ver Tabla 11).

En la población femenina se observa el proceso contrario, una reducción en la frecuencia del genotipo AA en el grupo de pacientes con respecto a la población control, de modo que se pasa de un 25,41% de individuos AA a un 12,58%. De igual modo, el modelo de herencia que mejor se ajusta a los resultados es el de herencia recesiva para el alelo A, interpretándose en consecuencia que el genotipo AA es protector (riesgo reducido) o que los genotipos G_{portador} son de riesgo.

En cuanto a los polimorfismos rs6323 y rs1799836 de los genes MAO-A y MAO-B, respectivamente, no muestran desviaciones en sus frecuencias alélicas o genotípicas, evidenciando distribuciones similares entre la muestra de población control y la muestra de pacientes con esquizofrenia. Así pues, no se obtuvieron resultados de asociación positivos ni en el grupo masculino ni en el femenino.

3.2. POBLACIÓN CON PSICOSIS DUAL.

En la Tabla13 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en la población con psicosis dual para el polimorfismo rs4680 del gen COMT.

La menor incidencia de psicosis dual en la población femenina no ha permitido reclutar un número de participantes suficiente que posibilite obtener diferencias estadísticamente significativas cuando existen desviaciones de la distribución de frecuencias. No se han obtenido, por lo tanto, resultados positivos de asociación. No obstante, aunque el número poblacional es pequeño, se muestra homogéneo respecto a la población femenina de esquizofrenia sin consumo.

En la población masculina se observa que la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas es similar a la de la población masculina con esquizofrenia sin TUS. Consecuentemente, se encuentra una asociación positiva respecto a la población control que se ajusta también a un modelo recesivo de herencia para el alelo

A, siendo por lo tanto el genotipo AA el vinculado a la situación patológica y el que se configura como un genotipo de riesgo.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs4680 (COMT)	Mujeres	GG	7 (46,67)	G	19 (63,33)
		GA	5 (33,33)	A	11 (36,67)
		AA	3 (20,00)		
	Hombres	GG	27 (24,77)	G	110 (50,46)
		GA	56 (51,38)	A	108 (49,54)
		AA	26 (23,85)		

Tabla 13. Resultados en el polimorfismo rs4680 del gen COMT en población de pacientes con psicosis dual.

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs4680 (COMT)	Mujeres	Codominante	1,8351	2	0,3995	
		Alelos	1,3763	1	0,2407	0,63 [0,30 ; 1,37]
	Hombres	Codominante	5,9840	2	0,0502	
		Alelos	5,5645	1	0,0183	1,54 [1,08 ; 2,21]

Tabla 14. Resultados de asociación en el polimorfismo rs4680 del gen COMT.

El contraste entre la población con esquizofrenia y la población con psicosis dual muestra que son poblaciones homogéneas. Esto indica una asociación del genotipo AA con la esquizofrenia independientemente de que esté o no presente el trastorno por uso de sustancias.

rs4680 (COMT)	GENERO	GENOTIPO	CNTR, N (%)	DUAL, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
	Hombres	GG+GA	117 (86,67)	93 (73,25)	4,5153	0,0336	2,04 [1,05 ; 3,95]
		AA	18 (13,33)	28 (23,14)			

Tabla 15. Asociación del polimorfismo rs4680 siguiendo un modelo de herencia recesivo para el alelo A en población con psicosis dual.

3.3. POBLACIÓN CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.

Se genotipó a los pacientes incluidos en la muestra de trastorno bipolar obteniendo la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4680. Estos resultados aparecen en la Tabla 16.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs4680 (COMT)	Mujeres	GG	18 (27,27)	G	72 (54,55)
		GA	36 (54,55)	A	60 (45,45)
		AA	12 (18,18)		
	Hombres	GG	11 (26,19)	G	46 (54,76)
		GA	24 (57,14)	A	38 (45,24)
		AA	7 (16,67)		

Tabla 16. Resultados en el polimorfismo rs4680 del gen COMT en población de pacientes con trastorno bipolar.

En esta población se observa una similitud de frecuencias entre el grupo de pacientes femenino y el masculino, a diferencia de las poblaciones control y de pacientes con esquizofrenia.

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs4680 (COMT)	Mujeres	Codominante	1,7270	2	0,4217	
		Alelos	0,0908	1	0,7632	0,94 [0,63 ; 1,40]
	Hombres	Codominante	1,0816	2	0,5823	
		Alelos	0,6584	1	0,4171	1,23 [0,75 ; 2,03]

Tabla 17. Resultados de asociación para el polimorfismo rs4680. Comparación entre población control y población de pacientes con trastorno bipolar sin consumo.

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs4680 (COMT)	Mujeres	Codominante	1,8724	2	0,3921	
		Alelos	1,3117	1	0,2521	1,27 [0,84 ; 1,91]
	Hombres	Codominante	2,8849	2	0,2363	
		Alelos	1,2688	1	0,2600	0,76 [0,47 ; 1,22]

Tabla 18. Resultados de contraste de frecuencias para el polimorfismo rs4680. Comparación entre población con esquizofrenia y población con trastorno bipolar.

El contraste de hipótesis de estas poblaciones no indica diferencias estadísticamente significativas ni al comparar con la población control ni en el contraste con la población de pacientes con esquizofrenia.

Podría esperarse, dadas las diferencias entre la población con esquizofrenia y la población control, que la población con trastorno bipolar fuera similar a una u otra, sin embargo se encuentra que no presenta diferencias significativas respecto a ninguna de las otras dos.

3.4. COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS EN EL POLIMORFISMO rs4680 ENTRE LAS POBLACIONES DEL ESTUDIO.

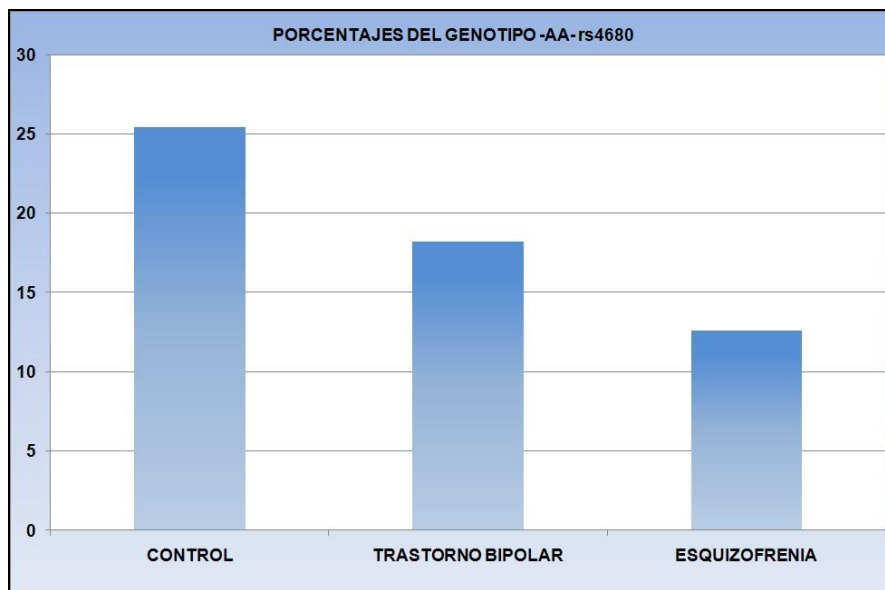
Las frecuencias genotípicas de la población con trastorno bipolar son muy similares entre los dos sexos, lo cual diferencia a esta población tanto del grupo control como de la muestra de pacientes con esquizofrenia.

Valorando independientemente cada género, puede observarse que la población con trastorno bipolar presenta unas frecuencias intermedias entre la población control y la población con esquizofrenia (ver gráficas 3 y 4) generando una tendencia.

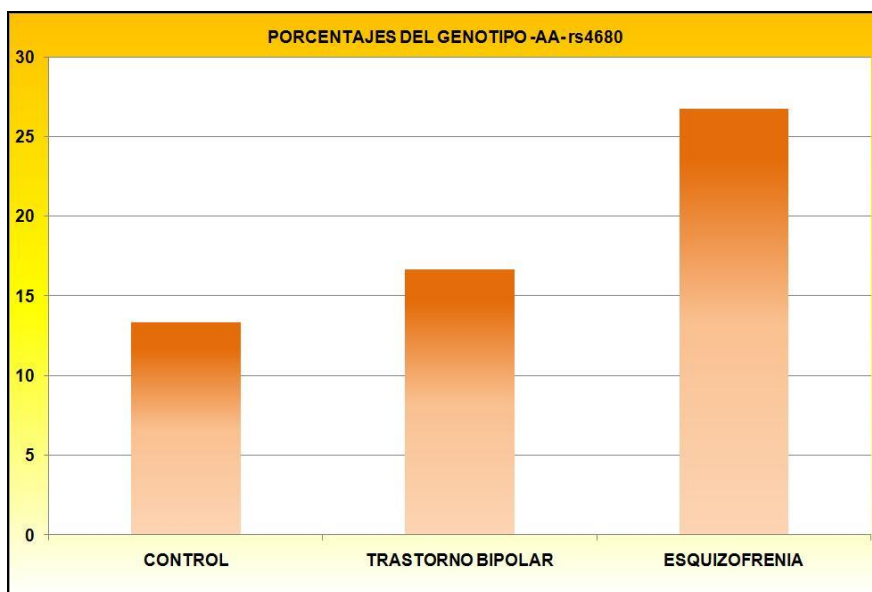
Se observa, por lo tanto, variaciones en la muestra de pacientes con trastorno bipolar que están en consonancia con lo observado en esquizofrenia. De este modo, en población masculina hay un aumento de la frecuencia del genotipo AA con respecto a los controles, el cual es menos marcado que en esquizofrenia, no apareciendo consecuentemente un valor significativo. A su vez, en población femenina de pacientes se observa un descenso de la frecuencia del genotipo AA con respecto a los controles pero en menor medida que en esquizofrenia. Son este aumento y esta disminución los que sitúan a la población de pacientes con trastorno bipolar en unas frecuencias intermedias entre la población control y la población con esquizofrenia, quedando igualadas entre ambos géneros.

Al representar estos resultados (ver gráficas 3 y 4) y ajustarlos a una correlación lineal, se obtiene una fuerte asociación. En el caso de la correlación de la población femenina se encuentra un valor $r = -0,994$, es decir, una correlación negativa, mientras que en población masculina el valor de correlación es de $r = 0,922$.

Aparece, por lo tanto, un modelo coherente en los resultados obtenidos en las poblaciones de pacientes, si bien no debe considerarse al trastorno bipolar como un fenotipo intermedio.



Gráfica 3. Porcentajes del genotipo AA en rs4680 en las 3 poblaciones sin consumo dentro de la muestra femenina. Coeficiente de correlación negativo, $r = - 0,994$.



Gráfica 4. Porcentajes del genotipo AA en rs4680 en las 3 poblaciones sin consumo dentro de la muestra masculina. Coeficiente de correlación positivo, $r = 0,922$.

3.5. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

Los polimorfismos en los genes MAO-A y MAO-B no presentaban asociación con la aparición de la esquizofrenia, tal y como ha sido expuesto. No obstante, esto no descarta que pudiera existir una influencia de pequeño peso sobre la patología que no

se estuviera detectando estadísticamente, la cual sí podría manifestarse a través de epistasias genéticas. Estas epistasias pueden valorarse mediante el análisis de las correlaciones entre los genotipos de distintos genes, es decir, a través de la comparación de las frecuencias de los genotipos combinados formados por dos o más polimorfismos.

GENOTIPO rs4680 – rs6323	CTR N (%)	ESQ N (%)	RATIO (%ESQ / %CTR)	χ^2	Valor <i>p</i>	ODDS-R (95% CI)
G portador – T	89 (65,93)	126 (55,26)	0,8383	3,9922	0,0457	0,64 [0,41 ; 0,99]
G portador – G	28 (20,74)	41 (17,98)	0,8670	0,4190	0,5174	0,84 [0,49 ; 1,43]
AA – T	16 (11,85)	43 (18,86)	1,5913	3,0592	0,0803	1,73 [0,93 ; 3,21]
AA – G	2 (1,48)	18 (7,89)	5,3289	6,6990	0,0096 (1)	5,70 [1,30 ; 24,9]
				10,860	0,0125 (*)	

Tabla 19. Análisis de asociación en COMT y MAO-A en población masculina. CTR: controles. ESQ: esquizofrenia. (1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (*p*) inferior a 0,0125.

(*) $\chi^2 = 10,860$; *p* = 0,01251 ; GL = 3.

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos para los genotipos formados por el polimorfismo rs4680 y rs6323. Aunque pueden probarse los diferentes modelos de herencia en el estudio de la posible epistasia, en este caso, se utiliza el modelo obtenido para rs4680 en el análisis de asociación independiente, es decir, un modelo recesivo. Se establecen, por lo tanto, dos categorías; la primera (G_{portador}) sería la formada por el conjunto de los genotipos GG y GA, la segunda sería la formada por el genotipo homocigoto AA. En el caso del polimorfismo rs6323, dado que el gen está en el cromosoma X, los hombres son hemocigotos y por ello sólo existen dos genotipos posibles, T o G.

GENOTIPO rs4680 – rs1799836	CTR N (%)	ESQ N (%)	RATIO (%ESQ / %CTR)	χ^2	Valor <i>p</i>	ODDS-R (95% CI)
G portador – T	67 (49,63)	97 (42,54)	0,8572	1,7189	0,1898	0,75 [0,49 ; 1,15]
G portador – C	50 (37,04)	70 (30,70)	0,8289	1,5379	0,2149	0,75 [0,48 ; 1,18]
AA – T	11 (8,15)	26 (11,40)	1,3995	0,9816	0,3218	1,45 [0,69 ; 3,04]
AA – C	7 (5,19)	35 (15,35)	2,9605	8,5644	0,0034 (1)	3,32 [1,43 ; 7,69]
				10,430	0,0153 (*)	

Tabla 20. Análisis de asociación en COMT y MAO-B en población masculina. CTR: controles. ESQ: esquizofrenia. (1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (*p*) inferior a 0,0125.

(*) $\chi^2 = 10,430$; *p* = 0,0153 ; GL = 3.

Resultados similares pueden observarse en la Tabla 20. En ella se muestran las distribuciones de las frecuencias en la población control y en la de pacientes con esquizofrenia para el genotipo combinado de rs4680 y rs1799836.

En estas distribuciones de frecuencias aparecen valores (p) que entran en el rango de significación y, por lo tanto, podría considerarse que estos polimorfismos están asociados. Sin embargo, deben aplicarse determinados criterios para evaluar estos resultados.

En primer lugar estos valores de significación no son mayores que los que se han obtenido para el genotipo individual del polimorfismo rs4680 en el gen COMT, por lo que parte de la desviación en la distribución general de frecuencias, y por tanto la significación, se debe a la propia variación de frecuencias que existe en el SNP rs4680. El segundo criterio sería considerar que si bien el segundo polimorfismo no tiene asociación en sí mismo, y por tanto desviación de las frecuencias en el conjunto completo, sí podrían aparecer desviaciones de dichas frecuencias internamente en una de las dos categorías de rs4680, es decir, en el subgrupo de genotipo AA o en el de genotipo G_{portador}. Aparecerían así diferencias con respecto a las frecuencias de los SNP rs6323 y rs1799836 en uno de los genotipos rs4680 pero no en el otro, o incluso podrían aparecer desviaciones contrapuestas. Siguiendo este criterio tampoco se encuentran valores de asociación reseñables. El tercer criterio, y de sentido más estricto para una epistasia, establecería que el genotipo del segundo polimorfismo podría modificar la expresión del primero. En este caso significaría que en función del genotipo presente en el segundo polimorfismo se podría modificar la direccionalidad del OR, esto es, que la vinculación de riesgo o protección se alterara. Esta posibilidad no se observa en las distribuciones de frecuencias mostradas.

En la población femenina se realizaron análisis similares. En este caso se utiliza el mismo modelo de herencia recesiva para el polimorfismo rs4680 del gen COMT descrito anteriormente. Por otra parte, teniendo en cuenta que los resultados independientes de los SNP rs6323 y rs1799836 no mostraban una asociación positiva, o una tendencia destacable, no se ha asumido un modelo de herencia *a priori* y se valoran los genotipos por separado (modelo codominante).

GENOTIPO rs4680 – rs6323	CTR N (%)	ESQ N (%)	RATIO (%ESQ / %CTR)	χ^2	Valor p	ODDS-R (95% CI)
G portador – TT	79 (43,65)	75 (49,67)	1,1380	1,2006	0,2732	1,27 [0,83 ; 1,97]
G portador – TG	48 (26,52)	48 (31,79)	1,1987	1,1118	0,2917	1,29 [0,80 ; 2,08]
G portador – GG	8 (4,42)	9(5,96)	1,3485	0,4021	0,5260	1,37 [0,52 ; 3,64]
AA – TT	22 (12,150)	13 (8,61)	0,7083	1,0973	0,2949	0,68 [0,33 ; 1,40]
AA – TG	21 (11,60)	4 (2,65)	0,2283	9,4770	0,0021 (1)	0,21 [0,07 ; 0,62]
AA – GG	3 (1,66)	2 (1,32)	0,7991	0,0615	0,8041	0,80 [0,13 ; 4,83]
				11,620	0,0404 (*)	

Tabla 21. Análisis de asociación en COMT y MAO-A en población femenina. CTR: controles. ESQ: esquizofrenia. (1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (p) inferior a 0,0083.

(*) $\chi^2 = 11,620$; GL = 5 ; $p = 0,0404$.

En la Tabla 21 se presentan los datos correspondientes a la correlación entre los polimorfismos rs4680 y rs6323 en población femenina, y en la Tabla 22 aparecen los resultados obtenidos para la correlación entre rs4680 y rs1799836.

GENOTIPO rs4680 – rs1799836	CTR N (%)	ESQ N (%)	RATIO (%ESQ / %CTR)	χ^2	Valor p	ODDS-R (95% CI)
G portador – TT	37 (20,44)	44 (29,14)	1,4255	3,3758	0,0662	1,60 [0,97 ; 2,65]
G portador – TC	65 (35,91)	59 (39,07)	1,0880	0,3516	0,5532	1,14 [0,73 ; 1,79]
G portador – CC	33 (18,23)	29(19,21)	1,0534	0,0513	0,8207	1,07 [0,61 ; 1,85]
AA – TT	16 (8,84)	2 (1,32)	0,1498	9,0674	0,0026 (1)	0,14 [0,03 ; 0,61]
AA – TC	19 (10,50)	10 (6,62)	0,6309	1,5504	0,2131	0,60 [0,27 ; 1,34]
AA – CC	11 (6,08)	7 (4,64)	0,7628	0,3336	0,5635	0,75 [0,28 ; 1,99]
				13,120	0,0223 (*)	

Tabla 22. Análisis de asociación en COMT y MAO-B en población femenina. CTR: controles. ESQ: esquizofrenia. (1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (p) inferior a 0,0083.

(*) $\chi^2 = 13,12$; GL = 5 ; $p = 0,0223$.

En la población femenina los valores obtenidos para los genotipos combinados de los dos genes son menores, por tanto más significativos, que los que aparecían en el genotipo independiente de rs4680 (COMT). Por tanto, podría considerarse que existe una correlación entre los loci de los dos genes en la población de mujeres, dado que se cumple el primero de los criterios utilizados para evaluar si existe una correlación entre los genotipos de los diferentes polimorfismos. Sin embargo las diferencias en la distribución de frecuencias de los SNP rs6323 y rs1799836 en el subgrupo de mujeres con genotipo AA en rs4680 no muestra diferencias significativas ($\chi^2 = 3,46$; valor (p)=0,177; g.l.=2 para rs6323. $\chi^2 = 4,06$; (p)=0,132; g.l.=2 para rs1799836). Tampoco aparecen diferencias en el grupo de genotipo G_{portador} .

Asumir los diferentes modelos de herencia para agrupar los distintos genotipos y ganar poder estadístico no ha marcado grandes diferencias en los resultados y a su vez no existe una clara determinación del modelo a seguir que justifique la asunción del mismo. En cuanto al tercer criterio, tampoco se observa un cambio en la direccionalidad del riesgo del genotipo en rs4680 en función del segundo polimorfismo.

Por todo ello, puede determinarse que no aparece una correlación entre los polimorfismos del sistema dopaminérgico ni en la muestra poblacional masculina ni en la muestra poblacional femenina. En consecuencia, no puede afirmarse que exista epistasia entre estos polimorfismos genéticos.

4. RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN PACIENTES.

Las diversas poblaciones de pacientes fueron genotipadas obteniendo con ello las frecuencias alélicas y genotípicas. En los 3 polimorfismos del sistema endocannabinoide las poblaciones masculina y femenina eran homogéneas en su distribución de frecuencias y no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí.

4.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.

El contraste de frecuencias entre la población control y la población de esquizofrenia sin consumo de sustancias no ofrece valores significativos para ninguno de los polimorfismos pertenecientes al sistema endocannabinoide, tanto para las frecuencias alélicas como para los diferentes modelos de herencia evaluados.

No se encuentra, por lo tanto, una asociación de estos polimorfismos con la esquizofrenia sin consumo.

En las tablas 24a y 24b se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas en esta población. En las tablas 25 y 26 se muestran los valores obtenidos para un test χ^2 de asociación entre los polimorfismos y la patología.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
(AAT)n (CNR1) (1)	Mujeres	LL	82 (54,30)	L	217 (71,85)
		LC	53 (35,10)	C	85 (28,15)
		CC	16 (10,60)		
	Hombres	LL	108 (47,37)	L	308 (67,54)
		LC	92 (40,35)	C	148 (32,46)
		CC	28 (12,28)		
	Combinada	LL	190 (50,13)	L	525 (69,26)
		LC	145 (38,26)	C	233 (30,74)
		CC	44 (11,61)		

Tabla 24a. Frecuencias alélicas y genotípicas en el polimorfismo (AAT)n. (1) Se ha utilizado la notación (L) para los alelos largos, 11 repeticiones o más, y (C) para los alelos cortos, 10 repeticiones o menos.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs35761398 (CNR2) (1)	Mujeres	CC/CC	50 (33,11)	CC	169 (55,96)
		CC/TT	69 (45,70)	TT	133 (44,04)
		TT/TT	32 (21,19)		
	Hombres	CC/CC	66 (28,95)	CC	244 (53,51)
		CC/TT	112 (49,12)	TT	212 (46,49)
		TT/TT	50 (21,93)		
	Combinada	CC/CC	116 (30,61)	CC	413 (54,49)
		CC/TT	181 (47,76)	TT	345 (45,51)
		TT/TT	82 (21,64)		
rs324420 (FAAH)	Mujeres	CC	95 (62,91)	C	238 (78,81)
		CA	48 (31,79)	A	64 (21,19)
		AA	8 (5,30)		
	Hombres	CC	159 (69,74)	C	377 (82,68)
		CA	59 (25,88)	A	79 (17,32)
		AA	10 (4,39)		
	Combinada	CC	254 (67,02)	C	615 (81,13)
		CA	107 (28,23)	A	143 (18,87)
		AA	18 (4,75)		

Tabla 24b. Frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos rs35761398 y rs324420. (1) El polimorfismo rs35761398 es un dinucleótido.

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
(AAT)n (CNR1)	Mujeres	Codominante	0,8757	2	0,6454	
		Alelos	0,0275	1	0,8682	0,97 [0,69 ; 1,36]
	Hombres	Codominante	3,6830	2	0,1586	
		Alelos	3,4419	1	0,0635	1,37 [0,99 ; 1,92]
	Combinada	Codominante	1,6068	2	0,4478	
		Alelos	1,712	1	0,1907	1,17 [0,93 ; 1,48]

Tabla 25. Valores de asociación en el polimorfismo (AAT)n del gen CNR1.

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs35761398 (CNR2)	Mujeres	Codominante	0,2841	2	0,8676	
		Alelos	0,0017	1	0,9672	0,99 [0,73 ; 1,35]
	Hombres	Codominante	0,5722	2	0,7512	
		Alelos	0,5315	1	0,4660	1,12 [0,83 ; 1,52]
	Combinada	Codominante	0,3441	2	0,8419	
		Alelos	0,3250	1	0,5686	1,06 [0,86 ; 1,31]
rs324420 (FAAH)	Mujeres	Codominante	2,2816	2	0,3196	
		Alelos	0,4669	1	0,4944	1,14 [0,78 ; 1,67]
	Hombres	Codominante	1,5351	2	0,4641	
		Alelos	1,0453	1	0,3066	0,81 [0,56 ; 1,20]
	Combinada	Codominante	2,5685	2	0,2769	
		Alelos	0,1265	1	0,7221	0,95 [0,73 ; 1,24]

Tabla 26. Resultados de asociación en los polimorfismos de genes CNR2 y FAAH, pertenecientes al sistema endocannabinoide. Población con esquizofrenia sin TUS.

4.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON PSICOSIS DUAL.

La población de pacientes con psicosis dual se constituyó como una población independiente obtenida por segregación a partir de la población general de pacientes con esquizofrenia. En este contexto, resulta de especial interés el grupo de pacientes que presenta un trastorno por uso de sustancias con un consumo principal de cannabis y, por ello, se estableció como criterio para la selección de los individuos de este grupo. Dentro de esta muestra existe a su vez un grupo de consumidores que presentan policonsumo (48%), es decir, cannabis y otras sustancias. Sus frecuencias alélicas y genotípicas eran homogéneas con el grupo de consumo exclusivo de cannabis. En concordancia con todo ello, los pacientes con consumo principal de alcohol o cocaína fueron excluidos del estudio. En la Tabla 27 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos pertenecientes a genes del sistema endocannabinoide. Pueden observarse en los resultados del polimorfismo rs35761398 diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas cuando se comparan la población control con el grupo de psicosis dual (ver Tabla 28). Estas diferencias se deben al aumento en la frecuencia de individuos de genotipo heterocigoto (CC/TT) y de genotipo homocigoto para el alelo menos frecuente (TT/TT) en la población de pacientes. Esto indica una acción dominante del alelo TT en su vinculación con el fenotipo patológico.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
(AAT)n (CNR1) (1)	Mujeres	LL	8 (53,33)	L	20 (66,67)
		LC	4 (26,67)	C	10 (33,33)
		CC	3 (20,00)		
	Hombres	LL	50 (45,87)	L	148 (67,89)
		LC	48 (44,04)	C	70 (32,11)
		CC	11 (10,09)		
	Combinada	LL	58 (46,77)	L	168 (67,74)
		LC	52 (41,94)	C	80 (32,26)
		CC	14 (11,29)		
rs35761398 (CNR2) (2)	Mujeres	CC/CC	1 (6,67)	CC	12 (40,00)
		CC/TT	10 (66,67)	TT	18 (60,00)
		TT/TT	4 (26,67)		
	Hombres	CC/CC	23 (21,10)	CC	106 (48,62)
		CC/TT	60 (55,05)	TT	112 (51,38)
		TT/TT	26 (23,85)		
	Combinada	CC/CC	24 (19,35)	CC	118 (47,58)
		CC/TT	70 (56,45)	TT	130 (52,42)
		TT/TT	30 (24,19)		
rs324420 (FAAH)	Mujeres	CC	10 (66,67)	C	25 (83,33)
		CA	5 (33,33)	A	5 (16,67)
		AA	0 (00,00)		
	Hombres	CC	80 (73,39)	C	186 (85,32)
		CA	26 (23,85)	A	32 (14,68)
		AA	3 (2,75)		
	Combinada	CC	90 (72,58)	C	211 (85,08)
		CA	31 (25,00)	A	37 (14,92)
		AA	3 (2,42)		

Tabla 27. Frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos pertenecientes a genes del sistema endocannabinoide en la población de pacientes con psicosis dual. (1) En el polimorfismo (AAT)n se ha utilizado la notación (L) para los alelos largos, 11 repeticiones o más, y (C) para los alelos cortos, 10 repeticiones o menos. (2) El polimorfismo rs35761398 es un dinucleótido.

rs35761398 (CNR2)	GENOTIPO	CTR, N (%)	DUAL, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
	CC/CC	101 (31,96)	24 (19,35)	6,9595	0,0083	1,96 [1,18 ; 3,24]
	CC/TT+TT/TT	215 (68,04)	100 (80,65)			

Tabla 28. Ajuste de los resultados del polimorfismo rs35761398 a un modelo de herencia dominante para el alelo TT. Potencia del 76,89%.

En esta asociación la potencia estadística es del 76,89%. Aunque no alcanza el 80% con el que se diseña idealmente el test, puede considerarse un valor óptimo.

Se consideró importante el hecho de que en la bibliografía referente a este polimorfismo se muestra que está en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo dentro de este gen (Ishiguro et al., 2009). Este polimorfismo es el rs12744386. La implicación funcional conjunta de los polimorfismos en la acción del receptor y la descripción de haplotipos poco frecuentes en otras poblaciones ha motivado que se genotipara este segundo polimorfismo de CNR2 en vistas a determinar si aparecían o no dichos haplotipos en la población del presente estudio.

Se genotiparon tanto la población control como la población de patología dual determinándose que la correspondencia de haplotipo entre los polimorfismos rs12744386 y rs35761398 en la población estudiada era del 100%, siendo los haplotipos presentes: C - CC y T - TT.

Los haplotipos alternativos de estos, es decir, T - CC y C - TT, no han sido encontrados en la población estudiada.

En consonancia con estos resultados, el contraste de frecuencias entre la población con esquizofrenia sin TUS y la población con psicosis dual (planteamiento case-only), ofrece resultados estadísticamente significativos (ver Tabla 29). Esto indica una vinculación del polimorfismo rs356761398 específica a la población de psicosis dual, es decir, a la situación comórbida de esquizofrenia y trastorno por uso de sustancias con consumo principal de cannabis.

rs35761398 (CNR2)	GENOTIPO	ESQ, N (%)	DUAL, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
	CC/CC	116 (30,61)	24 (19,35)	5,8892	0,0152	1,84 [1,12 ; 3,02]
	CC/TT+TT/TT	263 (69,39)	100 (80,65)			

Tabla 29. Ajuste de los resultados del polimorfismo rs35761398 a un modelo de herencia dominante para el alelo TT. Potencia del 69,48%.

4.3. POBLACIÓN DE CONSUMIDORES CON TRASTORNO POR USO DE SUSTANCIAS.

La interpretación del resultado obtenido para CNR2 implicaba la necesidad de contrastar los valores de asociación con una población de consumidores que cumpliera criterios de trastorno por uso de sustancias pero que no presentara patologías del espectro psiquiátrico.

El número reclutado se consideró bajo para un contraste suficientemente consistente y no pudo genotiparse a la población en todos los polimorfismos que conforman el presente estudio. Por tanto, los resultados ofrecidos se muestran como preliminares y como indicación de líneas de trabajo a seguir en futuras investigaciones. No obstante, sí pudieron realizarse las determinaciones de los polimorfismos más informativos para este hallazgo, es decir, los polimorfismos en genes del sistema endocannabinoide, cuyos resultados se muestran en la Tabla 30.

POLIMORFISMO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
(AAT)n (CNR1) (1)	LL	33 (57,89)	L	86 (75,44)
	LC	20 (35,09)	C	28 (24,56)
	CC	4 (7,02)		
rs35761398 (CNR2) (2)	CC/CC	21 (29,58)	CC	76 (53,52)
	CC/TT	34 (47,89)	TT	66 (46,48)
	TT/TT	16 (22,54)		
rs324420 (FAAH)	CC	53 (75,71)	C	117 (83,57)
	CA	11 (15,71)	A	23 (16,43)
	AA	6 (8,57)		

Tabla 30. Frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos pertenecientes a genes del sistema endocannabinoide. (1) En el polimorfismo (AAT)n se ha utilizado la notación (L) para los alelos largos, 11 repeticiones o más, y (C) para los alelos cortos, 10 repeticiones o menos. (2) El polimorfismo rs35761398 es un dinucleótido.

La distribución de frecuencias alélicas y genotípicas es homogénea entre hombres y mujeres, siendo además el ratio entre sexos dentro de la población de consumidores sin síntomas psiquiátricos muy similar al de la población con psicosis dual. Por consiguiente, el contraste de hipótesis se ha realizado utilizando las poblaciones conjuntas sin segregación por géneros.

En la Tabla 31 se muestran los valores de asociación cuando se contrastan las frecuencias entre controles y consumidores (TUS).

POLIMORFISMO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
(AAT)n (CNR1)	Codominante	0,3618	2	0,8345	
	Alelos	0,3177	1	0,5730	0,88 [0,56 ; 1,38]
rs35761398 (CNR2)	Codominante	0,4757	2	0,7883	
	Alelos	0,4793	1	0,4887	1,14 [0,79 ; 1,64]
	Dominante	0,1527	1	0,696	1,12 [0,64 ; 1,96]
rs324420 (FAAH)	Codominante	10,9360	2	0,0042	
	Alelos	0,7574	1	0,3842	0,81 [0,49 ; 1,31]
	Sobredominancia	8,1024	1	0,0044	2,63 [1,33 ; 5,22]

Tabla 31. Resultados de asociación en los polimorfismos de genes pertenecientes al sistema endocannabinoide para el contraste de frecuencias entre la población control y la población con trastorno por uso de sustancias.

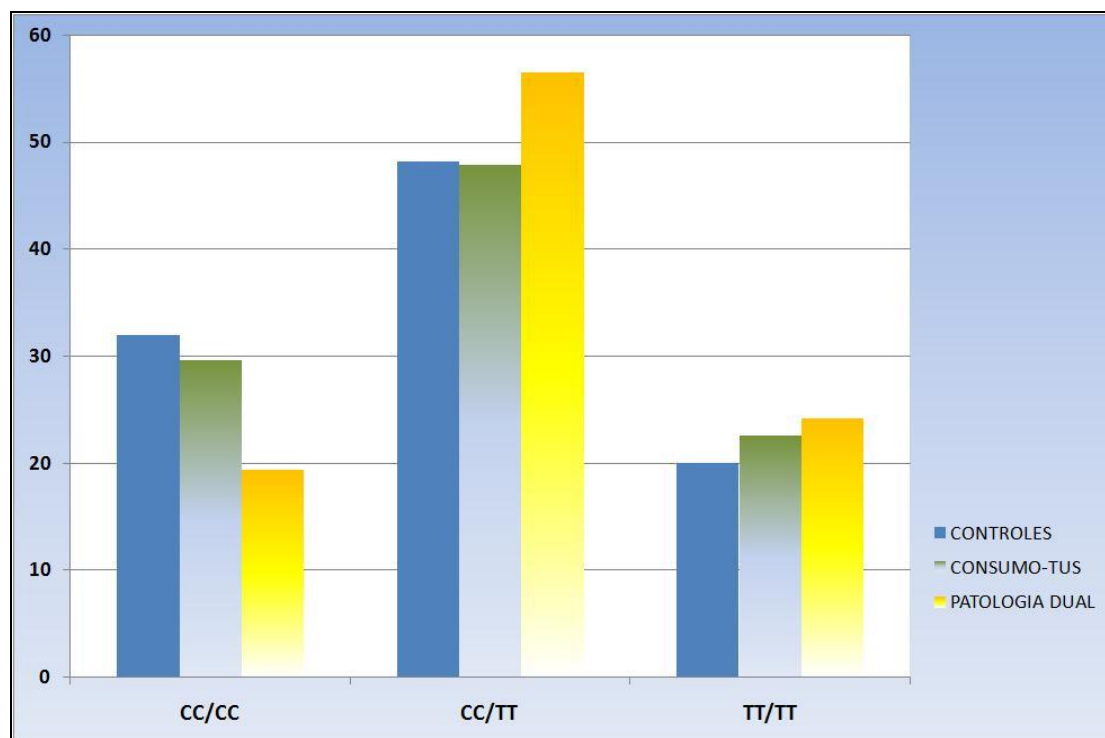
Como puede observarse, tanto en los resultados de asociación como en la tabla de frecuencias, no existen diferencias entre la población control y las población con TUS en la distribución de frecuencias alélicas o genotípicas para el polimorfismo rs35761398. Esto indicaría que no existe una asociación entre el polimorfismo de CNR2 y la situación de consumo cuando no aparece como un trastorno comórbido a la esquizofrenia.

Por otra parte, es destacable la aparición de una asociación del polimorfismo rs324420 del gen FAAH con la situación de consumo. Esta asociación no se muestra vinculada a un alelo concreto, sino al genotipo. Los valores de significación del modelo codominante y de sobredominancia (heterocigosis o ventaja del heterocigoto) resultan muy similares, si bien el del modelo codominante es ligeramente más significativo.

En cuanto a las frecuencias del polimorfismo de CNR2, al encontrar que la población de consumidores no muestra diferencias respecto a dos poblaciones que a su vez son diferentes entre sí (control y psicosis dual), se valora resaltar al menos la tendencia que puedan presentar las frecuencias en las 3 poblaciones para facilitar así la posterior discusión y las conclusiones. Estas tendencias se muestran en la Tabla 32 y en la Gráfica 5.

GENOTIPO	CONTROLES (%)	CONSUMO-TUS (%)	PSICOSIS DUAL (%)
CC/CC	31,96	29,58	19,35
CC/TT	48,10	47,89	56,45
TT/TT	19,94	22,54	24,19

Tabla 32. Comparación de los porcentajes en los genotipos del polimorfismo rs35761398.



Gráfica 5. Comparación de los porcentajes en los genotipos de rs35761398.

4.4. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.

El contraste de frecuencias entre la población control y la población con trastorno bipolar sin TUS no ofrece valores significativos para ninguno de los polimorfismos del estudio dentro del sistema endocannabinoide, tanto para las frecuencias alélicas como para los diferentes modelos de herencia evaluados.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs324420 (FAAH)	Mujeres	CC	49 (74,24)	C	113 (85,61)
		CA	15 (22,73)	A	19 (14,39)
		AA	2 (3,03)		
	Hombres	CC	27 (64,29)	C	67 (79,76)
		CA	13 (30,95)	A	17 (20,24)
		AA	2 (4,76)		
	Combinada	CC	76 (70,37)	C	180 (83,33)
		CA	28 (25,93)	A	36 (16,67)
		AA	4 (3,70)		

Tabla 33. Frecuencias alélicas y genotípicas en el polimorfismo rs324420 en la población con trastorno bipolar sin TUS.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
(AAT)n (CNR1) (1)	Mujeres	LL	34 (51,52)	L	94 (71,21)
		LC	26 (39,39)	C	38 (28,79)
		CC	6 (9,09)		
	Hombres	LL	21 (50,00)	L	58 (69,05)
		LC	16 (38,10)	C	26 (30,95)
		CC	5 (11,90)		
	Combinada	LL	55 (50,93)	L	152 (70,37)
		LC	42 (38,89)	C	64 (29,63)
		CC	11 (10,19)		
rs35761398 (CNR2) (2)	Mujeres	CC/CC	24 (36,36)	CC	77 (58,33)
		CC/TT	29 (43,94)	TT	55 (41,67)
		TT/TT	13 (19,70)		
	Hombres	CC/CC	20 (47,62)	CC	54 (64,29)
		CC/TT	14 (33,33)	TT	30 (35,71)
		TT/TT	8 (19,05)		
	Combinada	CC/CC	44 (40,74)	CC	131 (60,65)
		CC/TT	43 (39,81)	TT	85 (39,35)
		TT/TT	21 (19,44)		

Tabla 34. Frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos (AAT)n y rs35761398 del sistema endocannabinoide. (1) En el polimorfismo (AAT)n se ha utilizado la notación (L) para los alelos largos, 11 repeticiones o más, y (C) para los alelos cortos, 10 repeticiones o menos. (2) El polimorfismo rs35761398 es un dinucleótido.

Se han comparado también las diferencias que pudieran existir en la población de pacientes con trastorno bipolar respecto a la población con esquizofrenia y con psicosis dual, encontrando una diferencia muy marcada con respecto a la población de pacientes con patología dual (ver Tabla 35). Estos resultados muestran, por lo tanto, coherencia al asociar el genotipo del polimorfismo rs35761398 a la situación de trastorno por uso de sustancias siempre desde la perspectiva de una patología psiquiátrica comórbida. Sin embargo, el reducido número de pacientes con trastorno bipolar que presentaban además un trastorno por uso de sustancias (12 individuos), impide determinar resultados consistentes que posibiliten observar tendencias que puedan ser interpretadas, ni obtener valores con diferencias significativas. En

cualquier caso, las frecuencias son similares a las de la población control (33'33% CC/CC y 66'66% TT_{portador}).

rs35761398 (CNR2)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
Codominante	12,8797	0,0016	
Alelos	7,9281	0,0049	0,59 [0,41-0,85]
Modelo Dominante	12,7419	0,0004	0,35 [0,19-0,63]

Tabla 35. Diferencias significativas en la comparación de población de pacientes con trastorno bipolar frente a población de pacientes con patología dual.

4.5. COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL POLIMORFISMO DE TIPO MICROSATÉLITE (AAT)_n EN EL GEN CNR1.

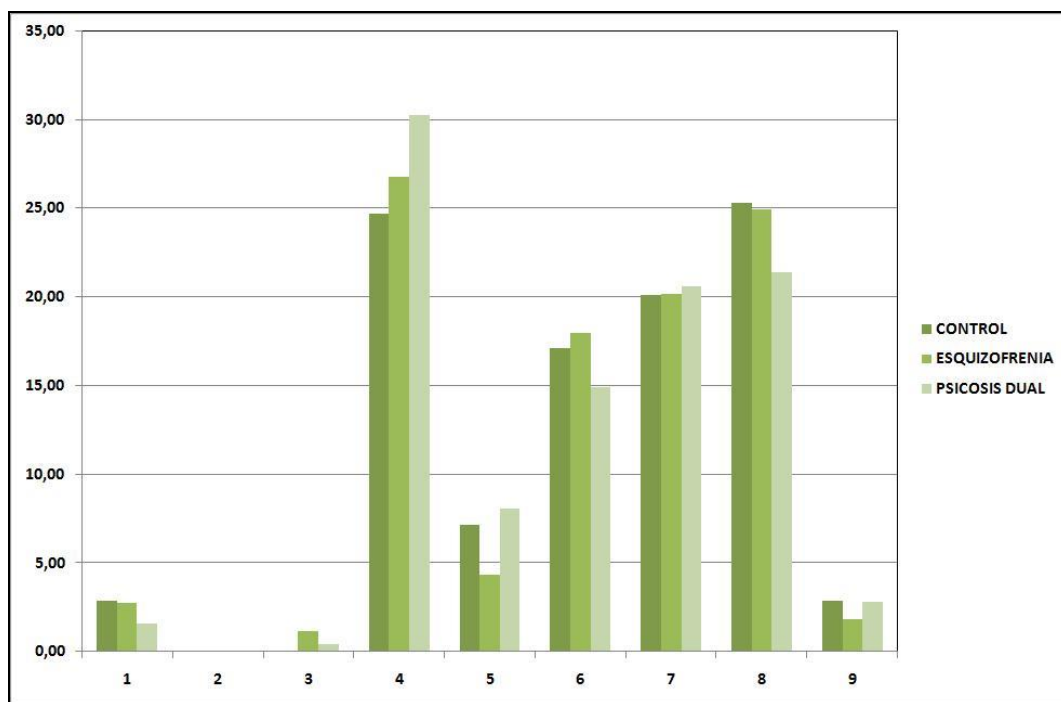
El genotipado por análisis de fragmentos para el polimorfismo de tipo microsatélite (AAT)_n del gen CNR1 permitió determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones reclutadas. Habitualmente, debido a que este polimorfismo presenta 9 alelos posibles, suelen agruparse en 2 categorías diferentes: alelos cortos y alelos largos, con el fin de aumentar la potencia estadística. El alelo que separa una categoría de otra es el alelo 5, pues a partir de las 11 repeticiones del triplete AAT correspondientes a este alelo, parece existir una acción diferencial sobre la transcripción del gen CNR1. Se ha realizado un análisis siguiendo dicho criterio, cuyos resultados ya han sido mostrados. Por otra parte, dado el elevado número de individuos genotipados para este polimorfismo en el presente trabajo, también se han contrastado los resultados por alelos individuales, sin realizar dicha agrupación. Las frecuencias halladas se muestran en la Tabla 36.

Resaltan dos cuestiones en el estudio de este polimorfismo. En primer lugar, puede observarse, tanto en la Tabla 36 como en la Gráfica 7, que existe una diferencia en la frecuencia del alelo 4, equivalente a 10 repeticiones del triplete AAT. Este aumento de frecuencia del alelo 4 aparece en población con esquizofrenia, pero es más acusada en población con psicosis dual. No obstante, estas diferencias no resultaron significativas. En segundo lugar puede observarse que el alelo 3, correspondiente a 9 repeticiones, únicamente aparece en las poblaciones con patología, ya sea esquizofrenia, psicosis dual, trastorno bipolar o trastorno por uso de sustancias.

POBLACIÓN		Alelos (AAT)n en CNR1								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONTROL	MUJERES (N)	9	0	0	95	23	64	70	90	11
	%	2,49	0,00	0,00	26,24	6,35	17,68	19,34	24,86	3,04
	HOMBRES (N)	9	0	0	61	22	44	57	70	7
	%	3,33	0,00	0,00	22,59	8,15	16,30	21,11	25,93	2,59
	COMBINADA (N)	18	0	0	156	45	108	127	160	18
	%	2,85	0,00	0,00	24,68	7,12	17,09	20,09	25,32	2,85
ESQUIZOFRENIA	MUJERES (N)	11	0	1	73	16	67	61	70	3
	%	3,64	0,00	0,33	24,17	5,30	22,19	20,20	23,18	0,99
	HOMBRES (N)	10	0	8	130	17	69	92	119	11
	%	2,19	0,00	1,75	28,51	3,73	15,13	20,18	26,10	2,41
	COMBINADA (N)	21	0	9	203	33	136	153	189	14
	%	2,77	0,00	1,19	26,78	4,35	17,94	20,18	24,93	1,85
PATOLOGÍA DUAL (SQZ+TUS)	MUJERES (N)	1	0	0	9	3	4	9	2	2
	%	3,33	0,00	0,00	30,00	10,00	13,33	30,00	6,67	6,67
	HOMBRES (N)	3	0	1	66	17	33	42	51	5
	%	1,38	0,00	0,46	30,28	7,80	15,14	19,27	23,39	2,29
	COMBINADA (N)	4	0	1	75	20	37	51	53	7
	%	1,61	0,00	0,40	30,24	8,06	14,92	20,56	21,37	2,82
TRASTORNO BIPOLAR	MUJERES (N)	3	0	2	33	10	21	22	41	0
	%	2,27	0,00	1,52	25,00	7,58	15,91	16,67	31,06	0,00
	HOMBRES (N)	2	0	0	24	9	11	18	17	3
	%	2,38	0,00	0,00	28,57	10,71	13,10	21,43	20,24	3,57
	COMBINADA (N)	5	0	2	57	19	32	40	58	3
	%	2,31	0,00	0,93	26,39	8,80	14,81	18,52	26,85	1,39
PATOLOGÍA DUAL (TB + TUS)	MUJERES (N)	0	0	0	2	0	1	0	1	0
	%	0,00	0,00	0,00	50,00	0,00	25,00	0,00	25,00	0,00
	HOMBRES (N)	0	0	0	6	2	4	4	4	0
	%	0,00	0,00	0,00	30,00	10,00	20,00	20,00	20,00	0,00
	COMBINADA (N)	0	0	0	8	2	5	4	5	0
	%	0,00	0,00	0,00	33,33	8,33	20,83	16,67	20,83	0,00
TUS	MUJERES (N)	1	0	1	11	2	3	8	8	1
	%	2,86	0,00	2,86	31,43	5,71	8,57	22,86	22,86	2,86
	HOMBRES (N)	1	0	0	27	4	8	18	20	1
	%	1,27	0,00	0,00	34,18	5,06	10,13	22,78	25,32	1,27
	COMBINADA (N)	2	0	1	38	6	11	26	28	2
	%	1,75	0,00	0,88	33,33	5,26	9,65	22,81	24,56	1,75

Tabla 36. Resultados obtenidos para los 9 alelos de (AAT)n del gen CNR1 en las poblaciones de estudio. SQZ (Esquizofrenia). TB (Trastorno Bipolar). TUS (Trastorno por uso sustancias).

Ninguno de los 316 individuos control portaba el alelo 3. El contraste de hipótesis entre la población control y la población con esquizofrenia arroja un resultado significativo ($p = 0,0060$). Sin embargo, dado que se trata de 9 alelos diferentes y que las comparaciones para la presencia de cada alelo son equivalentes, se hace preciso la aplicación de la corrección de Bonferroni que ajuste el nivel de significación a las comparaciones realizadas. Aplicada la corrección de Bonferroni, este valor de (p) quedaría fuera del límite de significación, por lo que no puede establecerse un resultado de asociación de este alelo con la psicosis dual ni con la esquizofrenia sin consumo. Debe añadirse, por último, que ha sido referenciada en la bibliografía la presencia de un alelo 10 equivalente a 16 repeticiones del triplete AAT (Ponce et al., 2003). En el presente trabajo no se encontró ningún portador de este alelo en ninguno de los 1006 individuos genotipados y distribuidos entre las diferentes poblaciones.



Gráfica 7. Comparación de porcentajes para los diferentes alelos entre las poblaciones control, esquizofrenia y psicosis dual.

4.6. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN POBLACIÓN CON PSICOSIS DUAL.

Los polimorfismos pertenecientes a genes del sistema endocannabinoide estudiados en el presente trabajo han sido descritos como polimorfismos funcionales. Por lo tanto, todos ellos están vinculados al equilibrio del tono endocannabinoide, lo que a su vez podría tener un papel importante en la regulación de la señalización de

este sistema. Consecuentemente, sería de esperar que aparecieran correlaciones estadísticas que pusieran de manifiesto interacciones entre los diferentes loci en forma de epistasias.

En el caso de los genes del sistema endocannabinoide, los resultados de asociación positiva presentados anteriormente se encuentran en el polimorfismo rs35761398 del gen CNR2 vinculados a la población con psicosis dual. En esta población el número de mujeres reclutadas para el estudio fue reducido, lo cual no permite hacer los análisis con suficiente potencia estadística. Sin embargo, sí puede comprobarse que las distribuciones de frecuencias internamente para cada uno de los grupos que conforman el estudio son homogéneas y no muestran diferencias de género, ni en la población control ni en las distintas poblaciones de pacientes, por lo que permite realizar el contraste de frecuencias unificadamente.

GENOTIPO rs35761398 – rs324420	CTR N (%)	PD N (%)	RATIO (%PD /%CTR)	χ^2	Valor p	ODDS-R (95% CI)
CC/CC – CC	51 (16,14)	16 (12,90)	0,7995	0,4935	0,4824	0,77 [0,42 ; 1,41]
CC/CC – CA	45 (14,24)	7 (5,65)	0,3964	5,5154	0,0188 (1)	0,36 [0,16 ; 0,82]
CC/CC – AA	5 (1,58)	1 (0,81)	0,5097	0,0304	0,8615	0,51 [0,06 ; 4,37]
TT portador – CC	151 (47,78)	74 (59,68)	1,2489	4,5760	0,0324 (1)	1,62 [1,06 ; 2,46]
TT portador – CA	59 (18,67)	24 (19,35)	1,0366	0,0009	0,9764	1,05 [0,62 ; 1,77]
TT portador – AA	5 (1,58)	2 (1,61)	1,0194	0,1603	0,6889	1,02 [0,20 ; 5,33]
				9,058	0,1068 (*)	

Tabla 37. Análisis de asociación en CNR2 y FAAH en población conjunta (hombres y mujeres). Valores de χ^2 aplicando corrección de Yates. CTR: controles. PD: psicosis dual.

(1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (p) inferior a 0,0083.

(*) $\chi^2 = 9,058$; GL= 5 ; p = 0,1068.

En la Tabla 37 se muestran los resultados del análisis de asociación de los genotipos combinados de los polimorfismos rs35761398 (CNR2) y rs324420 (FAAH). Para establecer las categorías genotípicas, en este caso, se utiliza el modelo de herencia encontrado para el polimorfismo rs35761398, es decir, un modelo de herencia dominante que establece dos categorías, los homocigotos CC/CC y los portadores del alelo TT, que engloba tanto a los de genotipo heterocigoto CC/TT como a los homocigotos TT/TT.

Para el polimorfismo rs324420 del gen FAAH no se asume un modelo de herencia concreto por dos motivos fundamentales; en primer lugar, el polimorfismo no muestra una asociación individual para la población de psicosis dual, en segundo lugar, en la población con TUS sin diagnóstico de psicosis la asociación que aparecía respondía a un modelo codominante (cada genotipo tiene un riesgo característico).

En los resultados mostrados en la Tabla 37 se encuentran algunos valores de asociación positivos, sin embargo, estos valores de significación no resistían la corrección de Bonferroni, que debe utilizarse al estar realizando comparaciones equivalentes con 1 grado de libertad de manera sistemática. De este modo, el valor de significación (p) para 6 comparaciones debe ser inferior a 0,0083 para considerarse significativo. Consecuentemente, no puede establecerse una correlación que implique relación de epistasia entre ambos polimorfismos.

Se han establecido también las frecuencias de correlación entre el polimorfismo rs35761398 de CNR2 y el polimorfismo (AAT) n de CNR1. Siguiendo el mismo criterio que en los casos anteriores, dado que no apareció asociación independiente para los alelos de CNR1, se realizó un análisis con los genotipos (AAT) n bajo un modelo codominante. Los resultados se muestran en la Tabla 39.

GENOTIPO rs35761398 – (AAT) n	CTR N (%)	PD N (%)	RATIO (%PD / %CTR)	χ^2	Valor p	ODDS-R (95% CI)
CC/CC – LL	55 (17,41)	10 (8,06)	0,4633	5,4515	0,0196 (1)	0,42 [0,20 ; 0,85]
CC/CC – LC	36 (11,39)	9 (7,26)	0,6371	1,2382	0,2658	0,61 [0,28 ; 1,30]
CC/CC – CC	10 (3,16)	5 (4,03)	1,2742	0,0254	0,8735	1,29 [0,43 ; 3,84]
TT portador – LL	116 (36,71)	48 (38,71)	1,0545	0,0789	0,7788	1,09 [0,71 ; 1,67]
TT portador – LC	80 (25,32)	43 (34,68)	1,3698	3,4238	0,0643	1,57 [1,00 ; 2,45]
TT portador – CC	19 (6,01)	9 (7,26)	1,2071	0,0699	0,7915	1,22 [0,54 ; 2,78]
				10,050	0,0738 (*)	

Tabla 39. Análisis de asociación en CNR2 y CNR1 en población conjunta (hombres y mujeres). Valores de χ^2 aplicando corrección de Yates. CTR: controles. PD: psicosis dual.

(1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (p) inferior a 0,0083.

(*) $\chi^2 = 10,050$; DF= 5 ; $p = 0,0738$.

Los resultados por modelo codominante de CNR1, en correlación con CNR2, no ofrecieron diferencias estadísticamente significativas al aplicar las correcciones correspondientes.

4.7. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES COMT Y CNR2 EN POBLACIÓN CON PSICOSIS DUAL.

Las correlaciones de polimorfismos que impliquen posibles epistasias entre genes no se limitan exclusivamente a genes pertenecientes a un mismo sistema o a una misma ruta metabólica. Entre los diversos aspectos debe considerarse la acción o regulación que pueda presentar un sistema sobre el otro, tal y como ha sido descrito para el sistema endocannabinoide y dopaminérgico.

Por ello, se evaluó la posible correlación que pudiera existir entre los dos genes que ofrecían una asociación positiva con la psicosis dual.

En este caso, dado que el polimorfismo del gen COMT tiene una asociación dependiente de género, el análisis debe hacerse por separado. Por otra parte, el bajo número de mujeres en el grupo de psicosis dual impide el análisis adecuado. En consecuencia con ello, el análisis de correlación que puede realizarse entre los polimorfismos de COMT y de CNR2 se limita a la población masculina.

Los resultados se muestran en la Tabla 40 siguiendo un planteamiento en el cual se han utilizado los modelos de herencia que presentan cada uno de los polimorfismos individualmente.

GENOTIPO rs4680 – rs35761398	CTR, N (%)	PD, N (%)	RATIO (%PD / %CTR)	χ^2	Valor <i>p</i>	ODDS-R (95% CI)
G portador – CC/CC	41 (30,37)	16 (14,68)	0,4833	7,4406	0,0064 (1)	0,39 [0,21 ; 0,75]
G portador – TT portador	76 (56,30)	67 (61,47)	1,0919	0,4688	0,4935	1,24 [0,74 ; 2,07]
AA – CC/CC	3 (2,22)	7 (6,42)	2,8899	1,7433	0,1867	3,02 [0,76 ; 12,0]
AA – TT portador	15 (11,11)	19 (17,43)	1,5688	1,5162	0,2182	1,69 [0,81 ; 3,50]
				10,960	0,0120 (*)	

Tabla 40. Análisis de asociación en COMT y CNR2 en población masculina. El cálculo de χ^2 en cada categoría se ha realizado aplicando corrección de Yates. CTR: controles. PD: psicosis dual. (1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (*p*) inferior a 0,0125.

(*) $\chi^2 = 10,960$; GL = 3 ; *p* = 0,0120.

En estos resultados se constata una reducción muy marcada en la muestra de pacientes respecto a la población control de la frecuencia del genotipo G_{portador}-CC/CC, mostrando un valor estadísticamente significativo, al igual que se muestra significativa la diferencia de distribución globalmente. A su vez, el resto de genotipos aparece aumentado con valores de odds-ratio por encima de la unidad. La interpretación de esta observación debe considerar diferentes hipótesis posibles, dado que el valor (*p*) obtenido para la correlación es más significativo que el que se obtiene para el polimorfismo de CNR2, pero menos que el obtenido para el polimorfismo de COMT, por lo que la interpretación del resultado es compleja respecto al primer criterio establecido.

Para valorar el segundo criterio se estudia la población de individuos con genotipos G_{portador} y la población de individuos con genotipo AA en el polimorfismo rs4680 en análisis independientes. En el primer caso (Tabla 41) se encuentra que el genotipo TT_{portador} presenta un ratio de 2,26 (parecido al esperado (ver Tabla 28) y

descrito para la población en su conjunto) mientras que en la población con genotipo AA en rs4680 no aparece asociado un riesgo para el genotipo TT_{portador} en rs35761398. Esto se debe a que el genotipo AA-CC/CC es más frecuente en la población con esquizofrenia que en la población control, al contrario de lo que sucede con el genotipo AA-TT_{portador}. Por lo tanto, la distribución de rs35761398 no es homogénea para los dos grupos de rs4680 y se podría considerar que se cumple el segundo criterio. No obstante, los grupos AA en rs4680 son muy reducidos, por lo que podría interpretarse erróneamente este resultado.

GENOTIPO	CNTR, N (%)	DUAL, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
G _{portador} - CC/CC	41 (35,04)	16 (19,28)			
G _{portador} -- TT _{portador}	76 (64,96)	67 (80,72)	5,923	0,0150	2,26 [1,16 ; 4,39]

Tabla 41. Diferencias de distribución del polimorfismo rs35761398 en población masculina con genotipo G_{portador} en rs4680. CNTR: Controles. DUAL: Población psicosis dual.

Por último, al valorar el tercer criterio, se aprecia que no se cumple la epistasia en sentido estricto, dado que enfrentados los polimorfismos en sentido inverso se observa que la distribución de frecuencias de rs4680 en función de los grupos de rs35761398 es la misma. En la Tabla 42 puede verse, por ejemplo, que si bien no aparece valor significativo de asociación, el odds-ratio conserva la implicación del genotipo AA como genotipo de riesgo en hombres.

GENOTIPO	CNTR, N (%)	DUAL, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
TT _{portador} - G _{portador}	76 (83,52)	67 (77,91)			
TT _{portador} - AA	15 (14,48)	19 (22,09)	0,8965	0,3437	1,44 [1,67 ; 3,04]

Tabla 42. Diferencias de distribución del polimorfismo rs4680 en población con genotipo TT_{portador} en rs35761398. CNTR: Controles. DUAL: Población psicosis dual.

Así pues, puede determinarse que en la población masculina el genotipo AA en rs4680 es un genotipo de riesgo al igual que el genotipo TT_{portador}. En el estudio de los genotipos conjuntos se encuentra, congruentemente, que el genotipo con el menor riesgo es G_{portador}-CC/CC, por lo que podría tratarse más propiamente de un efecto aditivo. La interpretación completa de los resultados será realizada en la discusión

5. RESULTADOS DEL POLIMORFISMO rs1468412 DEL GEN GRM3.

Se genotipó el polimorfismo rs1468412 perteneciente al gen GRM3 en los individuos incluidos dentro de los distintos grupos de pacientes. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

5.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.

En la Tabla 43 se muestran las frecuencias de los distintos genotipos en la población de pacientes con esquizofrenia sin TUS. Al comparar con las frecuencias en la población control se observan diferencias en el grupo femenino de pacientes.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs1468412 (GRM3)	Mujeres	AA	70 (46,36)	A	208 (68,87)
		AT	68 (45,03)	T	94 (31,13)
		TT	13 (8,61)		
	Hombres	AA	122 (53,51)	A	327 (71,71)
		AT	83 (36,40)	T	129 (28,29)
		TT	23 (10,09)		
	Combinada	AA	192 (50,66)	A	535 (70,58)
		AT	151 (39,84)	T	223 (29,42)
		TT	36 (9,50)		

Tabla 43. Resultados en el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 en la población de pacientes con esquizofrenia sin TUS.

Las pequeñas diferencias observadas ofrecen en el test χ^2 un valor significativo (aunque próximo al límite) en la población femenina pero no en la población masculina ni en la población combinada conjunta (Tabla 44).

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs1468412 (GRM3)	Mujeres	Codominante	4,5607	2	0,1023	
		Alelos	4,1771	1	0,0410	1,43 [1,01 ; 2,01]
	Hombres	Codominante	0,6752	2	0,7135	
		Alelos	0,0017	1	0,9674	1,01 [0,72 ; 1,41]
	Combinada	Codominante	2,2672	2	0,3219	
		Alelos	2,2621	1	0,1326	1,20 [095 ; 1,52]

Tabla 44. Resultados de asociación en el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3.

Estos valores de significación son un poco más bajos (más significativos) cuando se ajustan los resultados a un modelo de herencia dominante en la población femenina (ver Tabla 45), es decir, el alelo T es dominante dado que el riesgo para el genotipo heterocigoto AT y para el genotipo homocigoto TT son similares. Ninguno de los modelos de herencia ofrece resultados significativos en la población masculina, por lo que en dicho grupo no habría una asociación con este polimorfismo.

rs1468412 (GRM3)	GENERO	GENOTIPO	CNTR, N (%)	ESQZ, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
	Mujeres	AA	105 (58,01)	70 (46,36)	4,4850	0,0342	1,60 [1,03 ;2,47]
		AT+TT	76 (41,99)	81 (53,64)			

Tabla 45. Ajuste de resultados a un modelo de herencia dominante para el alelo T del polimorfismo rs1468412.

5.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON PSICOSIS DUAL.

Los resultados obtenidos para el polimorfismo rs1468412 se muestran en la Tabla 46. No se obtuvieron resultados positivos de asociación.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs1468412 (GRM3)	Mujeres	AA	11 (73,33)	A	25 (83,33)
		AT	3 (20,00)	T	5 (16,67)
		TT	1 (6,67)		
	Hombres	AA	58 (53,21)	A	158 (72,48)
		AT	42 (38,53)	T	60 (27,52)
		TT	9 (8,26)		
	Combinada	AA	69 (55,65)	A	183 (73,79)
		AT	45 (36,29)	T	65 (26,21)
		TT	10 (8,06)		

Tabla 46. Resultados en el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 en población de pacientes con psicosis dual.

Dado el bajo número de mujeres reclutadas que presentaba este cuadro clínico, no ha podido confirmarse la desviación de frecuencias observada en el grupo de mujeres con esquizofrenia sin TUS.

5.3. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.

Los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas y genotípicas en la población con trastorno bipolar sin TUS se muestran en la Tabla 47. No se han obtenido valores positivos de asociación entre el trastorno bipolar y este polimorfismo, ni se han observado tendencias destacables para los distintos modelos de herencia.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	N (%)	ALELO	N (%)
rs1468412 (GRM3)	Mujeres	AA	38 (57,58)	A	98 (74,24)
		AT	22 (33,33)	T	34 (25,76)
		TT	6 (9,09)		
	Hombres	AA	24 (57,14)	A	62 (73,81)
		AT	14 (33,33)	T	22 (26,19)
		TT	4 (9,52)		
	Combinada	AA	62 (57,41)	A	160 (74,07)
		AT	36 (33,33)	T	56 (25,93)
		TT	10 (9,26)		

Tabla 47 .Resultados en el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 en población de pacientes con trastorno bipolar sin TUS.

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs1468412 (GRM3)	Mujeres	Codominante	0,7230	2	0,6966	
		Alelos	0,0952	1	0,7577	1,07 [0,68 ; 1,70]
	Hombres	Codominante	0,4816	2	0,7860	
		Alelos	0,0545	1	0,8155	0,94 [0,54 ; 1,63]
	Combinada	Codominante	1,0339	2	0,5964	
		Alelos	0,0015	1	0,9688	1,01 [0,71 ; 1,41]

Tabla 48. Resultados de contraste de frecuencias en el polimorfismo rs1468412 entre la población control y la población con trastorno bipolar.

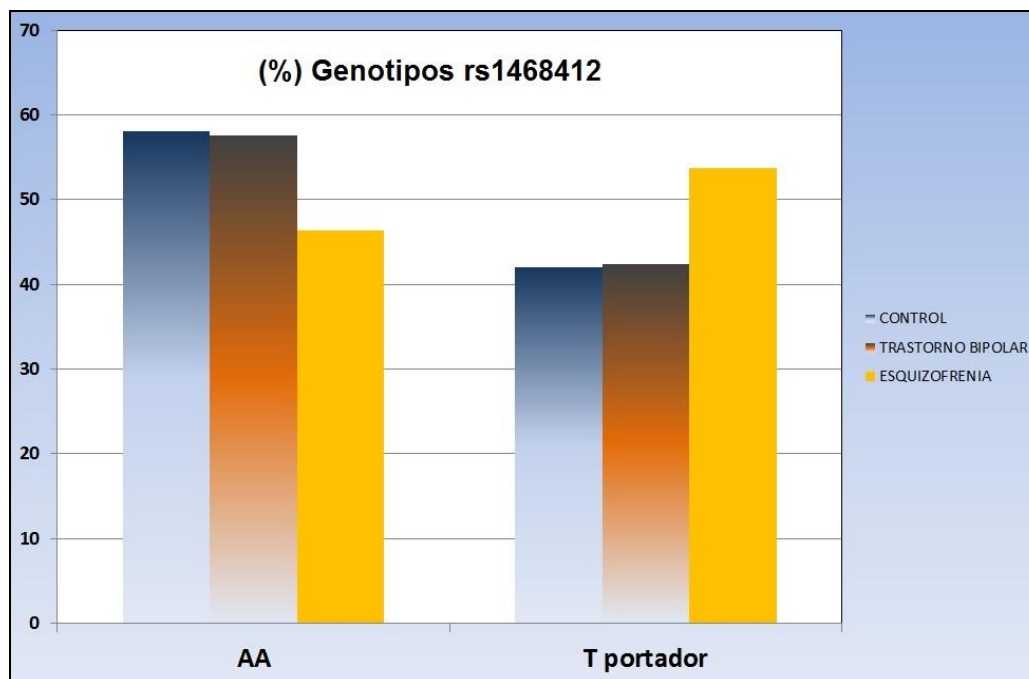
También se han realizado comparaciones entre la población con trastorno bipolar y la población con esquizofrenia, ambas sin consumo, sin que se encontrara en dicha comparación asociaciones positivas entre el genotipo y la patología (Tabla 49).

POLIMORFISMO	GÉNERO	MODELO DE AJUSTE	χ^2	G.L.	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
rs1468412 (GRM3)	Mujeres	Codominante	1,7410	2	0,4188	
		Recesivo	2,312	1	0,1284	1,57 [0,88 ; 2,82]
	Hombres	Codominante	0,9036	2	0,6365	
		Recesivo	0,1886	1	0,6641	1.16 [0,60 ; 2,25]

Tabla 49. Resultados de contraste de frecuencias del polimorfismo rs1468412 entre la población con trastorno bipolar y la población con esquizofrenia, ambas sin TUS.

No obstante, aunque se verifica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la población femenina con trastorno bipolar y la población de pacientes con esquizofrenia, puede observarse que el odds-ratio de esquizofrenia frente a trastorno bipolar es altamente similar al correspondiente odds-ratio de esquizofrenia frente a controles, siendo de 1,57 en el primer caso y de 1,60 en el segundo.

GENOTIPO rs1468412	CONTROLES (%)	TRASTORNO BIPOLAR (%)	ESQUIZOFRENIA (%)
AA	58,01	57,58	46,36
T _{portador}	41,99	42,42	53,64



Gráfica 8. Porcentajes de los genotipos del polimorfismo rs1468412 para las muestras poblacionales de control, pacientes con trastorno bipolar y esquizofrenia. Los tres grupos corresponden a población femenina. El genotipo T_{portador} engloba a los genotipos AT y TT.

De este modo, si se comparan los porcentajes de los genotipos implicados en un modelo de herencia recesivo se ilustra el grado de similitud entre las poblaciones. Por consiguiente, se muestra que la población con trastorno bipolar es similar a la población control y diferente a la población con esquizofrenia. Siendo, por lo tanto, las asociación con el SNP rs1468412 característica de la esquizofrenia pero no del trastorno bipolar en el conjunto femenino de la población reclutada.

5.4. CORRELACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS rs4680 Y rs1468412.

En los resultados mostrados anteriormente se encuentra un pequeño valor de significación del polimorfismo rs1468412 en la población femenina con esquizofrenia sin TUS y valores altamente significativos para el polimorfismo rs4680 en la misma población. Una vez obtenido mediante el análisis de asociación el modelo de herencia para cada uno de estos dos polimorfismos, se asume dicho modelo para evaluar la posible vinculación entre ambos. Los resultados se muestran en la Tabla 50.

GENOTIPO rs4680 – rs1468412	CTR N (%)	ESQ N (%)	RATIO (%ESQ /%CTR)	χ^2	Valor p	ODDS-R (95% CI)
G portador – AA	85 (46,96)	58 (38,41)	0,8179	2,4547	0,1172	0,70 [0,45 ; 1,09]
G portador – T portador	50 (27,62)	74 (49,00)	1,7740	16,0849	0,0001 (1)	2,52 [1,60 ; 3,97]
AA – AA	20 (11,05)	12 (7,95)	0,7192	0,9099	0,3401	0,69 [0,33 ; 1,47]
AA – T portador	26 (14,36)	7 (4,64)	0,3227	8,7043	0,0032	0,29 [0,12 ; 0,69]
				20,140	0,0002 (*)	

Tabla 50. Análisis de asociación en COMT y GRM3 en población femenina. CTR: controles. ESQ: esquizofrenia. (1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (p) inferior a 0,0125.

(*) $\chi^2 = 20,140$; $p = 0,0002$; GL = 3.

Puede apreciarse que los valores de asociación obtenidos marcan al genotipo G portador - T portador como un genotipo de riesgo, dado que su frecuencia está elevada en la población de pacientes. Esta combinación de genotipos en dos loci distintos confirman las observaciones hechas independientemente para cada uno de ellos. Por otra parte, el valor de (p) obtenido para la distribución global muestra una mayor significación para la vinculación del genotipo asociado que para cada uno de ellos por separado, cumpliendo con ello el primero de los criterios.

Posteriormente se analiza la distribución de frecuencias del polimorfismo rs1468412 en la población de genotipo G_{portador} (ver Tabla 51).

GENOTIPO	CNTR, N (%)	SQZ, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
G _{portador} - AA	85 (62,96)	58 (43,94)			
G _{portador} - T _{portador}	50 (37,04)	74 (56,06)	9,711	0,0018	2,17 [1,33 ; 3,54]

Tabla 51. Diferencias de distribución del polimorfismo rs1468412 en población femenina con genotipo G_{portador} en rs4680. CNTR: Controles. SQZ: Esquizofrenia sin TUS.

El resultado obtenido es muy significativo e indica que el genotipo T_{portador} del SNP rs1468412 es de mayor riesgo en la población femenina G_{portador} que en la población femenina en su conjunto. El bajo número de pacientes con genotipo AA en rs4680 limita las conclusiones que pueden sacarse de su análisis, por lo que es el tercer criterio el que puede resultar más esclarecedor.

GENOTIPO	CNTR, N (%)	SQZ, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
AA - AA	20 (19,05)	12 (17,14)			
G _{portador} - AA	85 (80,95)	58 (82,86)	0,102	0,7495	1,14 [0,52 ; 2,50]

Tabla 52. Diferencias de distribución del polimorfismo rs4680 en población femenina con genotipo AA en rs1468412. CNTR: Controles. SQZ: Esquizofrenia sin TUS.

El tercer criterio utilizado para evaluar si existen interacciones de tipo epistático se analiza en la Tabla 52. En esta tabla se muestra a la población femenina con genotipo AA en el polimorfismo rs1468412 y las diferencias de distribución en el polimorfismo rs4680. Al comprobar dichas diferencias se evidencia que el genotipo de riesgo G_{portador} en rs4680 no muestra desviaciones entre la población control y la población con esquizofrenia, señalando así que el genotipo de riesgo en el polimorfismo del gen COMT es condicional al genotipo en el polimorfismo de GRM3 pues las frecuencias son prácticamente idénticas.

En correspondencia con ello se muestran los resultados del subgrupo T_{portador} en el SNP rs1468412 en la Tabla 53.

GENOTIPO	CNTR, N (%)	SQZ, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
AA - T _{portador}	26 (34,21)	7 (8,64)			
G _{portador} - T _{portador}	50 (65,79)	74 (91,36)	13,94	1,9 · 10⁻⁴	5,50 [2,22 ; 13,63]

Tabla 53. Diferencias de distribución del polimorfismo rs4680 en población femenina con genotipo AA en rs1468412. El valor de χ^2 se ha calculado realizando corrección de Yates, valor (p) para 1 g.l. CNTR: Controles. SQZ: Esquizofrenia sin TUS.

Se destaca en este subgrupo poblacional el alto grado de significación así como el marcado odds-ratio que aparece con el genotipo de riesgo G_{portador} en el polimorfismo rs4680.

Estos resultados implican, por lo tanto, una interacción de epistasia, en la cual el alelo recesivo A en el polimorfismo rs1468412 inhibe el fenotipo de riesgo producido por el alelo dominante G en rs4680. De este modo, el genotipo del SNP rs4680 no produce efecto sobre el riesgo en los homocigotos AA (rs1468412) y su efecto se produce únicamente en el grupo de portadores de un alelo T en este polimorfismo.

En cuanto a la población masculina, aunque no se encontraron resultados positivos para el polimorfismo de GRM3, se analizaron los datos de correlación entre ambos genes para valorar si las pequeñas desviaciones pudieran aumentar la asociación. Los resultados se muestran en la Tabla 54.

GENOTIPO rs4680 – rs1468412	CTR N (%)	ESQ N (%)	RATIO (%ESQ / %CTR)	χ^2	Valor p	ODDS-R (95% CI)
G portador – AA	62 (45,93)	84 (36,84)	0,8022	2,9100	0,0880	0,69 [0,45 ; 1,06]
G portador – T portador	55 (40,74)	83 (36,40)	0,8935	0,6769	0,4106	0,83 [0,54 ; 1,29]
AA – AA	8 (5,93)	38 (16,67)	2,8125	8,8395	0,0029 (1)	3,18 [1,43 ; 7,03]
AA – T portador	10 (7,41)	23 (10,09)	1,3618	0,7371	0,3906	1,40 [0,65 ; 3,04]
				10,550	0,0144 (*)	

Tabla 54. Análisis de asociación en COMT y GRM3 en población masculina. CTR: controles. ESQ: esquizofrenia. (1) La corrección de Bonferroni implica que los valores significativos serán aquellos con un valor (p) inferior a 0,0125.

(*) $\chi^2 = 10,550$; $p = 0,0144$; GL = 3.

Puede observarse que en este caso los valores (p) de significación para el genotipo combinado AA – AA es relativamente bajo, es decir, podría considerarse que entra dentro de la significación. Sin embargo, el valor 0,0029 obtenido en esta comparación es casi idéntico al obtenido para la asociación de COMT ($p=0,0027$) por lo que el primer criterio debe ponerse en duda.

GENOTIPO	CNTR, N (%)	SQZ, N (%)	χ^2	Valor p.	ODDS-R (95% IC)
AA - AA	8 (62,96)	38 (43,94)			
AA - T _{portador}	10 (37,04)	23 (56,06)	1,821	0,1774	0,48 [0,17 ; 1,40]

Tabla 55. Diferencias de distribución del polimorfismo rs1468412 en población masculina con genotipo AA en rs4680. CNTR: Controles. SQZ: Esquizofrenia sin TUS.

En la Tabla 55 se comprueba que si bien existen ciertas diferencias en la distribución de rs1468412 en función del genotipo en rs4680, éstas no son significativas. En general, los cruces análogos a los realizados en la población femenina indican que el riesgo debido al genotipo en rs4680 no se ve afectado por el genotipo presente en rs1468412.

Esto estaría indicando, consecuentemente, que no aparece una correlación del polimorfismo de GRM3 con el polimorfismo de COMT en la población masculina y se evidencia con ello un nuevo elemento en el mecanismo diferencial de género que define la presencia de un IASC en la patología.

6. ANALISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y LA EDAD DE INICIO (EDAD DEL DIAGNÓSTICO).

Uno de los fenotipos, dentro de la esquizofrenia y del trastorno bipolar, que resulta de especial interés es la edad de inicio, edad de aparición o edad del primer episodio. Ha sido propuesta la posibilidad de que la edad a la cual comienzan estas patologías esté regulada o influenciada por factores genéticos. Estos factores podrían ser los mismos que generan la propia susceptibilidad a la aparición de la enfermedad, pero también podría tratarse de otros genes y polimorfismos que tuvieran una acción reguladora sobre los primeros. En consecuencia con ello, se han analizado y comparado las distribuciones de edad del diagnóstico en función de los distintos genotipos posibles dentro de las poblaciones reclutadas.

Existe, no obstante, una dificultad intrínseca en valorar la edad de inicio, dado que el desarrollo de la patología previo al primer brote agudo (o aquel por el que se requiera asistencia clínica) puede incluir síntomas que no son diagnosticados durante un periodo de tiempo difícil de determinar y que puede variar en función de múltiples circunstancias. Por lo tanto, existe una discusión que cuestiona si es correcto considerar el inicio de la atención clínica y del tratamiento como un valor exacto de la edad de inicio aunque pueda considerarse un valor orientativo.

En el presente trabajo se ha tomado en todos los casos como valor representativo de la edad de inicio la edad del diagnóstico o del primer brote, coincidente con el momento en el que el paciente recibe asistencia clínica por primera vez, no entrando en consideraciones que implicarían estimar la posible existencia de síntomas prodrómicos que no han recibido tratamiento o que no han sido diagnosticados.

6.1. POBLACIÓN DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA SIN TUS.

En la Tabla 56 se muestran las medias y las medianas de la edad de inicio para la población de pacientes con esquizofrenia sin TUS. Para comparar las muestras se ha utilizado una prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney) dado que las frecuencias de edad no se ajustaban generalmente a una distribución normal.

Se observa una diferencia de 1,31 años en la media de edad y una variación de 3 años en la mediana cuando se comparan el grupo femenino y el masculino de pacientes. No obstante, estas diferencias no resultan estadísticamente significativas. Estos resultados se ajustan a trabajos anteriores que muestran una edad de inicio menor en hombres que en mujeres (Messias et al., 2007).

POBLACIÓN	\bar{x} (S _x)	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	Valor Z	Valor (p)
Combinada	24,09 (6,61)	23 (19 – 28)		
Femenina	24,79 (7,25)	25 (19 - 30)		
Masculina	23,48 (6,12)	22 (20 - 27)	1,6144	0,1074

Tablas 56. Medias y medianas para la edad de inicio en la población de pacientes con esquizofrenia. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney, valor *p* de 2 colas. \bar{X} : media aritmética. S_x: Desviación estándar. Me: Mediana. (P₂₅ –P₇₅): percentiles 25 y 75.

Posteriormente, se segregaron las poblaciones en función de los genotipos siguiendo diversos modelos de herencia, es decir, tanto los obtenidos en los resultados anteriormente mostrados como los restantes, pues la asociación con la edad de inicio no tiene necesariamente que coincidir con la del propio riesgo de aparición de la patología, por lo que no deben establecerse modelos *a priori*. En la Tabla 57 se muestran los resultados obtenidos.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	\bar{x} (S _x)	GENOTIPO	\bar{x} (S _x)
rs4680	Femenino	G portador	25,19 (7,49)	AA	22,42 (5,48)
	Masculino	G portador	23,04 (6,12)	AA	24,51 (6,11)
rs1468412	Femenino	AA	23,83 (6,53)	T portador	25,71 (7,68)
	Masculino	AA	23,99 (6,54)	T portador	22,94 (5,46)

Tabla 57. Medias de edad de inicio en población de pacientes con esquizofrenia sin TUS en función del genotipo presente. \bar{X} : media aritmética. S_x: Desviación estándar.

Inicialmente se comprobó que los modelos de herencia que mejor describían los resultados eran los ya observados en los análisis de asociación, es decir, modelo recesivo para el alelo A del polimorfismo rs4680 y modelo dominante para el alelo T del polimorfismo rs1468412. De este modo, en el caso de rs4680, la media de la edad de inicio para el grupo de mujeres con genotipo GG es de 25,12 años y para el grupo de genotipo GA es de 25,22 años. Ambas son muy similares entre sí y diferentes a la media de edad de inicio del grupo de mujeres con genotipo AA, que presenta una media de 22,41 años. Por lo tanto, se ajustan a un modelo recesivo del mismo modo que en la asociación con el riesgo de aparición de la patología.

Por otra parte, en el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 los resultados responden a un modelo dominante para la edad de inicio al igual que lo hacían en su asociación con el riesgo de aparición. En este sentido puede observarse que la media para el genotipo AA es de 23,83 años, mientras que para el genotipo AT es de 25,72 y de 25,66 para el genotipo TT, lo cual implica un efecto similar entre los dos genotipos que portan el alelo T.

En la Tabla 57 se muestran los resultados obtenidos a partir de la asunción de estos modelos para la población de pacientes con esquizofrenia sin TUS. Las medias de edad de inicio se presentan de manera ilustrativa, dado que se comprueba que las distribuciones de frecuencia no se ajustan a una distribución normal, por lo que las muestras poblacionales se han comparado mediante prueba U no paramétrica de Mann-Whitney. Los valores de asociación resultaron no significativos (Tabla 58).

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	GENOTIPO	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	Valor Z	Valor p.
rs4680	Femenino	G portador	25 (19 - 30)	AA	20 (19 - 26)	1,527	0,126
	Masculino	G portador	21 (19 - 25)	AA	24 (21 - 27)	1,645	0,101
rs1468412	Femenino	AA	23 (18 – 30)	T portador	25 (19 - 30)	0,742	0,459
	Masculino	AA	22 (19 - 28)	T portador	23 (20 - 25)	0,665	0,502

Tabla 58. Valores Z en la prueba Mann-Whitney comparando los grupos genéticos en ambas muestras poblacionales de pacientes con esquizofrenia sin TUS. Me: Mediana. (P₂₅ –P₇₅): percentiles 25 y 75.

Las diferencias observadas se muestran de especial interés pese a que los valores de asociación resultan no significativos. En primer lugar se constata de nuevo la direccionalidad opuesta del genotipo entre el grupo masculino y el femenino en el polimorfismo rs4680. De este modo, la media de edad correspondiente al genotipo AA en mujeres es 2,77 años inferior a la que presenta el grupo G_{portador}. Sin embargo, el

mismo genotipo AA presenta en hombres una media superior, en este caso de 1,47 años. También existe direccionalidad opuesta en función del género en el polimorfismo rs1468412. Finalmente, se observa que los genotipos asociados a un mayor riesgo de aparición de la patología parecen señalar edades de aparición más tardías.

En consonancia a los resultados expuestos en apartados anteriores, en los que se describe la correlación que implicaría una posible interacción de tipo epistasia entre los polimorfismos de COMT y de GRM3, se ha utilizado también en este apartado dicho planteamiento. De este modo, se ha analizado la desviación epistática para caracteres métricos (Falconer & Mackay, 1996). En la Tabla 59 puede observarse que existen diferencias no aditivas. Una interpretación posible implica que el genotipo presente en el SNP rs1468412 es indiferente para el fenotipo del grupo de genotipo AA del SNP rs4680 y solo tiene una cierta influencia en el grupo G_{portador} . La mayor influencia observada, por lo tanto, estaría en el efecto de rs4680 sobre el grupo T_{portador} del SNP rs1468412, dado que dependiendo del genotipo presente en el SNP rs4680, el grupo T_{portador} muestra una diferencia de 3,64 años en la media de la edad de inicio. Esta interpretación, no obstante, no sería única y no distingue entre los componentes de la desviación.

		rs4680			
		G_{portador}	AA	Diferencia	Media de la fila
rs1468412	T_{portador}	25,97	22,33	3,64	25,71
	AA	24,19	22,44	1,75	23,80
Diferencia		1,78	-0,11		
Media de la columna		25,19	22,42		

Tabla 59. Diferencias en las medias de edad de inicio entre los distintos genotipos en el grupo femenino de pacientes de esquizofrenia sin TUS. Las medias de las filas y las columnas corresponden a las medias de los genotipos individuales (Tabla 57). Media poblacional 24,79.

Siguiendo la metodología descrita por Falconer & MacKay (1996), pueden calcularse las desviaciones epistáticas o desviaciones de interacción. Existen dos aproximaciones posibles. En la primera se ha utilizado la fórmula:

$$DE_{ij} = (M_{ij} - M_p) - [(M_i - M_p) + (M_j - M_p)]$$

Donde DE_{ij} es la desviación epistática para cada categoría genotípica, M_{ij} es la media de cada categoría, M_i es la media marginal de la fila, M_j es la media marginal de la columna y M_p es la media poblacional. Las medias marginales M_i y M_j corresponden a las medias para cada genotipo independiente que se muestran en la Tabla 57 para la población femenina y la media M_p es la que se muestra en la Tabla 56. En la segunda aproximación se realiza un cálculo de las desviaciones de las medias observadas en cada genotipo tanto de las observadas como de las esperadas respecto de la media poblacional, de modo que la diferencia entre ambas es el valor de desviación epistática. Los dos métodos ofrecen aproximaciones similares pero ligeramente diferentes. Aquí, se han utilizado ambos y calculado el valor promedio.

GENOTIPO	DES. EPIST. 1	DES. EPIST. 2	DES. EPIST
$G_{\text{portador}} - T_{\text{portador}}$	-0,14	0,11	-0,015
$AA - T_{\text{portador}}$	-1,01	-0,76	-0,885
$G_{\text{portador}} - AA$	-0,01	-0,13	-0,070
$AA - AA$	1,00	0,88	0,940

Tabla 60. Desviaciones epistáticas o de interacción entre los polimorfismos rs1468412 y rs4680. Se considera que no existe interacción epistática cuando el valor de desviación es cero o muy próximo a cero. (DES. EPIST: Desviación epistática.)

En base a los valores de la Tabla 60 puede determinarse que el mayor efecto se produce como interacción del genotipo rs1468412 con el genotipo AA de rs4680, actuando de modo diferencial, es decir, reduciendo o aumentando respecto al valor de la desviación de la media esperado en una interacción aditiva. De este modo, el genotipo T_{portador} posee una media reducida mientras que AA presenta un aumento respecto a la desviación esperada.

6.2. POBLACIÓN DE PACIENTES CON PSICOSIS DUAL.

En la población de pacientes con psicosis dual no aparecieron valores estadísticamente significativos en las diferencias de edad de inicio para los síntomas psicóticos respecto a la población con esquizofrenia sin TUS. En la Tabla 61 se muestran los resultados obtenidos segregando la población por géneros y se observa una marcada diferencia tanto en las medias como en las medianas de la población, siendo la diferencia de 4,18 años para las medias y de 5 años para las medianas. Si se comparan las edades de inicio de hombres con psicosis dual (22,67) y hombres con esquizofrenia sin TUS (23,48) se distingue sin embargo que los valores son altamente

similares (0,81 años de diferencia). Más marcada es la diferencia que existe en la población femenina (1,84 años), siendo mayor en este caso la media para mujeres con psicosis dual (26,85) que para mujeres con esquizofrenia sin consumo (25,01).

Por lo tanto, se aprecia que en la población con psicosis dual las mujeres tienen un inicio de los síntomas más tardío mientras que en los hombres es ligeramente menor. Dado que en su conjunto el 87,90% de la población con psicosis dual es masculina, globalmente, la población tiene una edad de inicio ligeramente más baja.

POBLACIÓN	\bar{x} (S _x)	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	Valor Z	Valor p
Combinada	23,17 (5,45)	22 (19 – 26)		
Femenina	26,85 (6,19)	27 (22 – 32)		
Masculina	22,67 (5,18)	22 (19 - 25)	2,384	0,017

Tablas 61. Medias y medianas para la edad de inicio en la población de pacientes con psicosis dual. Valores Z en la prueba U de Mann-Whitney y valores (*p*) de 2 colas. \bar{X} : media aritmética. S_x: Desviación estándar. Me: Mediana. (P₂₅ –P₇₅): percentiles 25 y 75

En la población de psicosis dual el número de mujeres es reducido, por lo que no se han podido realizar los adecuados sesgos por genotipos con el objetivo de determinar posibles diferencias en la edad de inicio. Así pues, en las tablas 62 y 63 se muestran los resultados obtenidos para la población masculina.

POLIMORFISMO	GENOTIPO	\bar{x} (S _x)	GENOTIPO	\bar{x} (S _x)
rs4680	G portador	22,53 (4,57)	AA	22,65 (7,13)
rs1468412	AA	22,28 (4,23)	T portador	22,74 (6,13)
rs324420	CC	22,47 (5,56)	A portador	22,79 (3,92)
rs35761398	CC/CC	22,19 (3,28)	TT portador	22,64 (5,60)

Tabla 62. Edad de inicio en población de pacientes varones con esquizofrenia sin TUS en función de los genotipos presentes. \bar{X} : media aritmética. SD: Desviación estándar.

En esta población las diferencias entre grupos por genotipos son mínimas en el valor de la media de edad de inicio en la patología psiquiátrica, siendo muy destacable la gran homogeneidad presente. Valoradas las diferencias en las medias de los genotipos combinados rs4680 - rs35761398 (Tabla 64) se determina que las diferencias son mínimas, por lo que se considera que no existe epistasia entre estos polimorfismos para la edad de inicio.

POLIMORFISMO	GENOTIPO	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	GENOTIPO	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	Valor Z	Valor p.
rs4680	G _{portador}	22 (19 - 25)	AA	21 (18 - 26)	0,78	0,44
rs1468412	AA	21 (19 - 24)	T _{portador}	22 (19 - 25)	0,03	0,98
rs324420	CC	21 (19 - 25)	A _{portador}	23 (20 - 25)	0,93	0,35
rs35761398	CC/CC	23 (19 - 24)	TT _{portador}	21 (19 - 25)	0,30	0,77

Tabla 63. Medianas y percentiles para la edad de inicio en la población masculina de pacientes con psicosis dual en función del genotipo. Valores Z en la prueba U de Mann-Whitney y valores (*p*) de 2 colas. \bar{X} : media aritmética. S_x : Desviación estándar. Me: Mediana. (P₂₅–P₇₅): percentiles 25 y 75.

		rs4680		
		G _{portador}	AA	Diferencia
rs35761398	CC/CC	22,53	21,75	0,78
	TT _{portador}	22,19	22,63	-0,44
Diferencia		0,34	-0,88	

Tabla 64. Diferencias en las medias de edad de inicio entre los distintos genotipos en el grupo masculino de psicosis dual.

6.3. POBLACIÓN DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR SIN TUS.

Aunque en la población de pacientes con trastorno bipolar no se han destacado asociaciones positivas para ninguno de los polimorfismos del presente estudio, dada la tendencia aparecida en el polimorfismo rs4680 del gen COMT, se muestran los resultados obtenidos para dicho gen y para el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3, el cual presenta epistasia en población femenina con esquizofrenia.

POBLACIÓN	\bar{X} (S_x)	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	Valor Z	Valor (<i>p</i>)
Combinada	26,31 (10,13)	24 (18 – 32)		
Femenina	24,10 (8,78)	22 (17 - 29)		
Masculina	30,23 (11,34)	26 (22 - 37)	2,2604	0,024

Tablas 65. Medias y medianas para la edad de inicio en la población de pacientes con trastorno bipolar sin TUS. Se muestran los valores de Z en la prueba U de Mann-Whitney y los valores (*p*) de 2 colas. \bar{X} : media aritmética. S_x : Desviación estándar. Me: Mediana (P₂₅–P₇₅): percentiles 25 y 75.

Puede observarse en la Tabla 65 una diferencia significativa que marca un inicio de la patología más tardío en la población masculina reclutada que en la población femenina de la muestra.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	\bar{x} (S _x)	GENOTIPO	\bar{x} (S _x)
rs4680	Femenino	G portador	24,70 (9,39)	AA	20,83 (2,48)
	Masculino	G portador	29,82 (12,43)	AA	31,60 (7,40)
rs1468412	Femenino	AA	25,22 (9,63)	T portador	21,58 (6,05)
	Masculino	AA	32,64 (12,50)	T portador	27,82 (10,06)

Tabla 66. Medias de edad de inicio en población de pacientes con trastorno bipolar sin TUS en función del genotipo presente. \bar{X} : media aritmética. S_x: Desviación estándar.

POLIMORFISMO	GÉNERO	GENOTIPO	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	GENOTIPO	Me (P ₂₅ – P ₇₅)	Valor Z	Valor p.
rs4680	Femenino	G portador	24 (16 - 30)	AA	22 (21 - 22)	0,759	0,448
	Masculino	G portador	24 (22 - 35)	AA	33 (32 - 37)	0,744	0,457
rs1468412	Femenino	AA	23 (16 – 30)	T portador	22 (18 - 24)	0,806	0,420
	Masculino	AA	32 (23 - 36)	T portador	24 (23 - 32)	0,886	0,375

Tabla 67. Valores Z en la prueba Mann-Whitney comparando los grupos genéticos en ambas muestras poblacionales de pacientes con trastorno bipolar sin TUS. Me: Mediana. (P₂₅ –P₇₅): percentiles 25 y 75.

Ninguno de los genes estudiados en el presente trabajo muestra una asociación que lo relacione con la diferencia en la edad de inicio del trastorno bipolar en la población masculina o femenina. Por otra parte, el número de individuos reclutados para este trastorno no permite hacer análisis robustos y adecuados para múltiples categorías, por lo que los valores obtenidos a partir del cálculo de las desviaciones de interacción epistática no mostraron resultados destacables.

Discusión.

Existen evidencias que indican la presencia de un componente genético en el desarrollo de las enfermedades psiquiátricas mayores, entre las que se encuentran la esquizofrenia y el trastorno bipolar, si bien, estos factores genéticos no han sido aún completamente esclarecidos.

1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN GENES DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

Uno de los genes investigados en mayor profundidad en las enfermedades psiquiátricas ha sido el gen COMT (codificante para la enzima catecol-O-metiltransferasa) desde que fuera localizado dentro de la región implicada en el síndrome velocardiofacial o síndrome de DiGeorge (Dunham et al., 1992), una patología en la que se presenta un elevado riesgo de padecer esquizofrenia (Bassett et al., 2003) junto al deterioro cognitivo (Evers et al., 2009).

En el gen COMT existen múltiples polimorfismos, pero es el SNP rs4680, posiblemente, el que posee una bibliografía más extensa, pues se trata de polimorfismo funcional clave en la actividad del enzima (Chen et al., 2004). En consonancia con ello, han sido descritas diversas asociaciones con patologías psiquiátricas, siendo muy diferentes para cada patología los resultados obtenidos (Maria et al., 2012; Voisey et al., 2011; Gupta, 2009; Ira et al., 2013). De este modo, puede encontrarse como alelo de riesgo cualquiera de los dos posibles, es decir, G o A, dependiendo de la enfermedad. También se ha descrito para este SNP el fenómeno genético de sobredominancia o “ventaja del heterocigoto”. En este caso, ambos genotipos homocigotos son de riesgo mientras que el genotipo heterocigoto es protector para la esquizofrenia (Hoenicka et al., 2010; Costas et al., 2011). Las vinculaciones por sexo han sido también halladas, siendo varios los ejemplos en los que el riesgo o protección que presentaba el grupo portador aparecía en uno de los sexos pero no en el otro (Karayiorgou et al., 1999; Lang et al., 2007).

En los resultados aquí presentados ha podido encontrarse una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos masculino y femenino de la población control.

Se han valorado diferentes hipótesis que pudieran explicar estas diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas. Inicialmente, debe estudiarse la posibilidad de una segregación en el reclutamiento de la población control que provocara que la muestra no fuera representativa de la población general. Sin embargo, esta posibilidad

queda descartada al contrastar los datos demográficos de los participantes, en los que se ha tenido en cuenta que no existieran sesgos, especialmente en lo referente a edad, nivel de escolarización, presencia de consumo de sustancias y antecedentes familiares de patologías psiquiátricas. También se ha valorado que no existieran diferencias entre ambos grupos.

Conjuntamente, debe destacarse que esta diferencia en las frecuencias aparece exclusivamente en este polimorfismo y no en otros. A su vez, la comparación con otros estudios en población española indica que la muestra conjunta del presente trabajo (sin diferenciar hombres y mujeres) es similar en frecuencias alélicas y genotípicas a las de dichos estudios, en los cuales no se indicaba que se hubiera hecho distinción de la población por sexos (Costas et al., 2011). Por lo tanto, se considera a la población control obtenida como representativa.

Además de lo mencionado puede establecerse que si bien esta diferencia en controles no aparece explícitamente reflejada en la bibliografía, sí han podido consultarse estudios en los cuales los porcentajes de los distintos genotipos de los dos géneros coinciden con los encontrados en el presente trabajo (Fernández-de-las-Peñas et al., 2012; Karayiorgou et al., 1997). Sin embargo, el número de controles en dichos estudios era relativamente bajo, de modo que las diferencias no resultaban significativas. En un estudio realizado en población noruega femenina (Roten et al., 2011), se mostraba que el porcentaje de mujeres con genotipo AA era superior al del genotipo GG, lo cual es congruente con los resultados aquí presentados en el grupo de mujeres control, pero contrasta con los datos ofrecidos como frecuencias generales de la población (conjunto unificado de hombres y mujeres), en la que se da la situación opuesta (*dbSNP Short Genetic Variation ss76883807; HapMap*). Puede observarse también que en algunos trabajos existe una descompensación evidente en el género de la población control. Así, por ejemplo, en la población presentada por el trabajo de Maria et al. (2012) en población griega, el porcentaje de varones en la muestra de control era del 73,2%. En esta población, las frecuencias eran muy similares a las observadas dentro del grupo de varones en los resultados aquí obtenidos. En la población griega de pacientes con esquizofrenia se encontraba una asociación con el polimorfismo rs4680 por un aumento de la frecuencia del genotipo AA, en congruencia a una población de pacientes en la que también predominaban los varones, siendo un 63,9% del total. En cualquier caso, la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas entre poblaciones de diferentes regiones es compleja, pues se observa una elevada variabilidad entre los trabajos presentes en la bibliografía.

Por lo tanto, puede valorarse que si bien no han sido reportadas como significativas estas diferencias entre géneros, sí pueden encontrarse frecuencias en población control que coinciden con las resultados expuestos anteriormente en el presente estudio.

Establecer una hipótesis que sustente esta diferencia observada requiere valorar e interpretar necesariamente las implicaciones del concepto de equilibrio Hardy-Weinberg. Así pues, debe tenerse en cuenta que cuando se cumplen las condiciones del equilibrio HW no deben existir diferencias en las frecuencias genéticas entre ambos sexos en genes localizados en los autosomas (Falconer & Mackay, 1996), evidencia que sí se ha constatado en los resultados aquí presentados.

En un inicio, la aplicación del equilibrio HW en los estudios genéticos de poblaciones humanas se utilizó como una medida de control sobre las técnicas utilizadas en el genotipado. En este sentido, cuando aparecían diferencias entre las frecuencias esperadas y las observadas la dirección a seguir sugería la revisión de la técnica empleada, pues se presuponía una infravaloración de alguno de los genotipos (Elston et al., 2009). Posteriormente, se ha pasado a considerar que las desviaciones pueden ser debidas a sesgos en el muestreo o simplemente a que existen polimorfismos que no son adecuados para el estudio. Esto implica que se está partiendo de la hipótesis no demostrada que estima que las poblaciones humanas poseen valores estáticos en las frecuencias alélicas y genotípicas, y que no aparecen procesos evolutivos que modifican la estructura del acervo génico, es decir, procesos dinámicos de variación de las frecuencias genéticas.

De este modo, la aplicación de la genética de poblaciones al estudio de la genética clínica podría estar valorando como errores lo que quizás son en sí mismo hallazgos. En sentido estricto, cuando las frecuencias genotípicas en un locus determinado presentan diferencias significativas con respecto a las esperadas en un equilibrio Hardy-Weinberg, existe una evidencia de que alguno de los diversos mecanismos evolutivos está actuando. En la población control reclutada se evaluaron las diferentes posibilidades con objeto de validar los resultados obtenidos.

En primer lugar, se ha descartado la migración como factor de influencia, determinando el origen de los participantes y verificando que se tratara de una población homogénea.

A continuación se valora la posibilidad de un fenómeno de deriva genética, la cual, junto a los procesos estocásticos en general, afecta prioritariamente a grupos pequeños con aislamiento reproductivo. La muestra del estudio provenía en todos los

casos de núcleos poblaciones amplios no aislados genéticamente, de modo que no sería justificable el concepto de deriva en una primera instancia.

La mutación como base para explicar las diferencias observadas, es decir, que uno de los alelos estuviera aumentando de frecuencia relativa por conversión de un alelo en otro, implicaría la existencia de una tasa de mutación muy superior a las tasas de mutación conocidas.

Por lo tanto, debe concluirse que es el cuarto tipo de mecanismo el que produce esta desviación de frecuencias, esto es, que existe un fenómeno de selección con respecto a este polimorfismo, el cual genera una diferencia significativa entre la población femenina y masculina en la distribución de frecuencias genotípicas.

La medida de este proceso selectivo ha sido realizada mediante el cálculo del valor de la eficacia biológica o valor de fitness, correspondiente a cada uno de los genotipos. Puede apreciarse, al compararlos, una ventaja selectiva del genotipo AA en mujeres, mientras que el mismo genotipo tiene un fitness reducido en hombres.

Este fenómeno en genética de poblaciones, o en genética evolutiva, es conocido como *conflicto sexual intralocus* o IASC (por sus siglas en inglés, *intra locus sexual conflict*). Este mecanismo supone que cada alelo y genotipo resulta perjudicial o ventajoso en función del género, es decir, tiene una eficacia biológica diferente según el sexo del portador (Partridge & Hurst, 1998). A su vez, el IASC se engloba dentro de lo que se denomina evolución o selección equilibradora: dado que existe una ventaja para uno de los sexos la frecuencia del alelo tendería a aumentar, pero al presentarse una desventaja para el otro sexo, habría también una tendencia de reducción de la frecuencia. El efecto final es que en la población, tomada como conjunto completo, las frecuencias alélicas tienden a estabilizarse en torno a valores de equilibrio. Por consiguiente, un proceso de tipo IASC actúa manteniendo la diversidad del acervo génico (Rowe & Day, 2006).

Este fenómeno genético y evolutivo ha sido ampliamente estudiado en poblaciones de múltiples especies y ha comenzado a ser valorado en poblaciones humanas (Stearns et al., 2012; Stulp et al., 2012). En este sentido, existen estudios que indican diferentes tasas reproductivas para un valor fisiológico o anatómico concreto en función de que se presente en un sexo o en el otro. Esto indica que existen características biológicas definidas que suponen una ventaja o una desventaja dependiendo del género (Stulp et al., 2012). Dado que gran parte de estas características tienen una base genética, existirá un conflicto entre los diferentes alelos de un locus determinado.

La aportación y ventaja del presente estudio radica en que algunas de las patologías asociadas a los valores de eficacia biológica de los genotipos del polimorfismo rs4680 han sido estudiadas como grupos independientes. Por lo tanto, pueden valorarse los resultados de cada población por separado y posteriormente cruzarse para estimar si dichos resultados son coherentes.

Así pues, tras observar la diferencia de frecuencias entre la población de hombres y mujeres en el grupo de control sin patologías psiquiátricas, se valora la población con esquizofrenia que no presenta trastorno por uso de sustancias. Como resultado, se observa una marcada diferencia entre la población femenina y la masculina en la distribución de frecuencias del polimorfismo rs4680. Esta diferencia está caracterizada por una evidente descompensación de la frecuencia del genotipo AA. En este caso, se encuentra que en hombres la frecuencia del genotipo AA supera a la del genotipo GG, mientras que en mujeres la frecuencia de AA es 2,53 veces menor a la de GG.

Las mismas deducciones hechas para la población control son aquí válidas, de modo que puede afirmarse que existe un componente diferencial en la acción de los alelos y genotipos del polimorfismo rs4680 con respecto a la esquizofrenia en función del género. Incluso sin el contraste respecto a la población control, el establecimiento de una comparación con las frecuencias calculadas para un equilibrio Hardy-Weinberg ofrece la conclusión de que el genotipo AA es un genotipo de riesgo en el grupo de hombres, mientras que para el grupo de mujeres podría interpretarse que el genotipo G_{portador} es de riesgo o que AA es protector frente a la patología; planteamientos que son complementarios y no excluyentes.

Cuando se realizan las correspondientes comparaciones entre la población con esquizofrenia y la población control las conclusiones obtenidas de forma independiente se complementan de manera coherente. Así pues, la comparación en la población femenina indica una disminución de la frecuencia del genotipo AA en la población de pacientes, evidenciando una asociación protectora o ventajosa para dicho genotipo en mujeres, en contraposición al genotipo GG o GA. Por lo tanto, en población femenina, las mujeres portadoras del alelo G tendrían un mayor riesgo de padecer la enfermedad que las no portadoras. También se observa que existe coherencia en cuanto al modelo de herencia, de modo que los resultados obtenidos muestran un modelo recesivo para el alelo A. De manera similar, la comparación en población masculina complementa lo ya expuesto hasta el momento. Se observa un marcado aumento del porcentaje correspondiente al genotipo AA en la población de pacientes, acompañado de una reducción del porcentaje de individuos de genotipo GG y GA. Por tanto, se deduce que

el genotipo de riesgo es AA. Conjuntamente, los resultados de frecuencias responden también a un modelo de herencia recesivo al igual que en la población femenina.

Los resultados ofrecen una pauta coherente en cuanto al modelo de herencia, pero muestran una diferente implicación del genotipo AA en hombres y en mujeres, siendo protector en mujeres y de riesgo en hombres para una patología psiquiátrica grave como es la esquizofrenia.

Las frecuencias observadas y los valores de asociación obtenidos en el grupo formado por pacientes de psicosis dual, es decir, que presentaban un diagnóstico de esquizofrenia y además un trastorno por uso de sustancias (TUS), coinciden con los hallazgos en esquizofrenia sin TUS. En este grupo, sin embargo, es destacable el hecho de que el porcentaje de mujeres es muy reducido. Esta prevalencia de patología dual en población femenina confirma la importancia del componente de género en estas enfermedades. No obstante, el pequeño número de pacientes femeninas con patología dual no ha permitido obtener conclusiones válidas con respecto a dicho grupo en cuanto a las asociaciones genéticas, aunque sí se observan porcentajes en la frecuencias genotípicas similares a los de la población femenina con esquizofrenia sin TUS. El grupo de hombres, por el contrario, era lo suficientemente amplio. De este modo, se constata que es homogéneo con el de esquizofrenia sin TUS, es decir, presenta porcentajes similares en la distribución de sus frecuencias alélicas y genotípicas, dando como resultado en el contraste con las frecuencias de la población control valores de asociación significativos. Por lo tanto, puede considerarse que el polimorfismo está vinculado con el fenotipo de presencia de esquizofrenia, con independencia de que exista o no un trastorno por uso de sustancias.

Respecto a la población con trastorno bipolar, la primera evidencia es la similitud de frecuencias que aparece entre el grupo femenino y el masculino, a diferencia de lo que sucede en las poblaciones control y con esquizofrenia. Al realizar las pruebas de contraste de frecuencias en los test de asociación, se obtienen resultados no significativos respecto a la población control, pero también respecto a la población de pacientes con esquizofrenia, independientemente del género considerado. Esto, inicialmente podría parecer contradictorio: dado que en las frecuencias del polimorfismo rs4680 se observan diferencias significativas entre la población control y la de pacientes con esquizofrenia, cabría esperar entonces que la población con trastorno bipolar fuera similar a una de las dos, mostrando diferencias con la otra. Sin embargo, cuando se comparan las frecuencias correspondientes de la población con trastorno bipolar, no aparecen diferencias estadísticamente significativas ni con respecto a la población control ni con respecto a la población con

esquizofrenia. Sin embargo, la observación de dichas frecuencias muestra que éstas se corresponden en realidad con valores intermedios situados entre los valores extremos de las otras dos, causando, por consiguiente, que no aparezcan valores significativos en ninguna de las comparaciones.

En conclusión, los resultados del trastorno bipolar plantean una tendencia que es similar a la que aparece en la esquizofrenia. La interpretación de una tendencia no significativa siempre resulta controvertida. Aquí se resalta no como un resultado en sí mismo, sino por el valor que aporta a la interpretación del resultado obtenido para la población con esquizofrenia. Así pues, en población femenina, la frecuencia del genotipo AA es menor en trastorno bipolar que en controles, mientras que en población masculina sucede lo contrario, es mayor la frecuencia del genotipo AA en pacientes que en controles. Esta tendencia, aunque no resulte significativa, es la misma que se muestra en la población con esquizofrenia. Es esta subida de la frecuencia en hombres y bajada en mujeres la que sitúa las frecuencias en un valor intermedio igualándolas entre sí. En la representación de las gráficas 3 y 4 se visualiza esta tendencia. No se está indicando con ello que el trastorno bipolar sea un fenotipo intermedio entre la ausencia de trastorno psiquiátrico y la esquizofrenia, dado que dicha discusión queda por completo fuera del objetivo de esta tesis. Pero sí se indica una coherencia entre los resultados de las poblaciones que forman parte del estudio, constatando una diferente vinculación del genotipo AA en función del género. De este modo, aunque no puede afirmarse que exista una asociación entre el polimorfismo rs4680 y el trastorno bipolar, los resultados en esta población consolidan las conclusiones que pueden extraerse para la población con esquizofrenia. Por lo tanto, estudios posteriores podrían incluir la cuestión de los límites entre ambos trastornos a partir de los resultados aquí obtenidos, en consonancia a otros trabajos que también han cuestionado la frontera que los delimita, la denominada “dicotomía Kraepeliana” (Craddock et al, 2009; Craddock & Owen, 2010)

En consecuencia, pueden resumirse estos hallazgos en las siguientes cuestiones fundamentales. Primero, que la población control en sí misma muestra a través del cálculo de los valores de fitness la diferente implicación del genotipo AA en función del género, siendo el fitness una medida de la eficacia biológica de un genotipo en un locus concreto. De este modo se encuentra que la homocigosis AA posee una ventaja en mujeres, mientras que en hombres presenta una reducción del fitness.

Posteriormente, los valores de significación en el contraste de poblaciones indican la existencia de una asociación entre el polimorfismo y la esquizofrenia. Para

valorar la direccionalidad y el peso que supone la influencia del genotipo de este polimorfismo en el desarrollo de la patología deben destacarse los valores de odds-ratio (razón de probabilidades) (Lachenbruch, 1997). De este modo, se observa que la implicación del genotipo AA en el polimorfismo rs4680 se corresponde con un odds-ratio de 2,37 en contraste de frecuencias en hombres y de 0,42 en el contraste de frecuencias en la población de mujeres. En este segundo caso, la interpretación complementaria sería considerar de riesgo el genotipo G_{portador} , que equivale a un valor de odds-ratio de 2,36. Configuran de este modo todos los cruces y contrastes de frecuencia un modelo coherente y consistente que define el grado de contribución del genotipo AA al desarrollo de la esquizofrenia. Hay que puntualizar que cuando se realizan estudios caso-control no debe interpretarse el valor de odds-ratio como una medida del riesgo relativo (Zhang & Yu, 1998). Sin embargo, cuando el rasgo de estudio es relativamente raro, es decir, inferior al 10% ($p < 0,10$), los valores del odds-ratio y del riesgo relativo se aproximan y pueden resultar intercambiables (Altman et al., 1998; Martínez-González et al., 1999; Bland & Altman, 2000). Dado que la prevalencia de la esquizofrenia es aproximadamente de un 1%, se acepta la similitud entre el odds-ratio y la razón de riesgo.

Gracias al estudio de dos patologías concretas relacionadas con el polimorfismo, puede concluirse que el valor de fitness calculado, así como las diferencias entre los distintos genotipos y géneros, está en relación directa con el espectro de las enfermedades psiquiátricas graves. Puede señalarse también la posibilidad de que las dos patologías psiquiátricas aquí estudiadas no sean las únicas vinculadas a este polimorfismo. Lo cual estaría en consonancia con la bibliografía, que muestra múltiples síndromes asociados al SNP rs4680 de una u otra manera (Fernández-de-las-Peñas et al., 2012; Beuten et al., 2006).

Por todo ello, pueden englobarse estos resultados en un modelo de mecanismo evolutivo equilibrador, denominado conflicto sexual intralocus, un proceso que implica que una determinada característica biológica, definida genéticamente, tiene diferente valor selectivo en función del género, produciendo como consecuencia una distribución amplia de ambos alelos (Parker, 1979).

La transcendencia de destacar el papel de los procesos evolutivos en las investigaciones referentes a la genética de la esquizofrenia y el trastorno bipolar ha sido establecida en sí misma como una línea de investigación que progresivamente ha crecido en importancia (Keller et al. 2006; Crow, 2008; Uher, 2009; Keller et al. 2012). La cuestión fundamental, la denominada “paradoja central de la genética de la esquizofrenia” por Doi et al. (2009), es resolver por qué las variaciones genéticas

comunes de susceptibilidad en los trastornos psiquiátricos, las cuales presentan una fuerte selección negativa, se mantienen en la población a lo largo del tiempo evolutivo en frecuencias elevadas. Diversas hipótesis han sido propuestas en respuesta a esta cuestión. Entre ellas se encuentran las siguientes: existencia de mutación-selección equilibradora (balanceada), ventaja del heterocigoto, selección negativa dependiente de la frecuencia y neutralidad ancestral (Crow, 1995; Brüne, 2004; Keller & Miller, 2006). En los resultados obtenidos para el gen COMT en este trabajo, se observa uno de los mecanismos que se engloban dentro de la categoría general de selección equilibradora, tal y como evidencian los cálculos de fitness presentados.

Entre las investigaciones que han abordado más directamente la cuestión y que resultan más completas en su estimación del valor de fitness en las enfermedades psiquiátricas se encuentra el estudio de Power et al. (2013). Este trabajo se centra en la población Sueca nacida entre 1950 y 1970, lo cual ha supuesto el seguimiento de 2.356.598 individuos. En esta población han aparecido 18.890 pacientes de esquizofrenia y 14.439 pacientes de trastorno bipolar, es decir, que las prevalencias obtenidas son de un 0,8% y un 0,61% respectivamente. En la población de pacientes con esquizofrenia el ratio hombre/mujer era de 1,5:1 y el ratio de fertilidad en relación a la población no psiquiátrica presentaba también divergencia en función del género. Así pues, el ratio de fertilidad en hombres afectados era de 0,23 mientras que era de 0,47 en mujeres, remarcando con ello el dimorfismo sexual de la patología y una situación más grave en el género masculino. Resulta muy interesante destacar que en este estudio el ratio de fertilidad estaba también reducido en los hermanos que no presentaban síntomas psicóticos, mientras que estaba aumentado moderadamente en las hermanas sin síntomas. En cuanto al trastorno bipolar, el ratio hombre/mujer era inverso al de la esquizofrenia, es decir, se obtenía un ratio 1:1,5 señalando así que este trastorno es más frecuente en mujeres que en hombres. Estos ratios por género, tanto para esquizofrenia como para trastorno bipolar, son muy similares a los ratios observados en la muestra poblacional reclutada para el presente trabajo. Dentro del trastorno bipolar el ratio de fertilidad también ofrecía diferencias entre población masculina y femenina, aunque las diferencias eran menores que en el caso de la esquizofrenia, siendo de 0,75 y de 0,85 respectivamente. Asimismo, otras cuatro patologías fueron evaluadas por su reducción en la fertilidad: autismo, depresión, anorexia y trastornos por uso de sustancias.

Existen diferentes hipótesis que expliquen la afectación de la tasa reproductiva o del valor de fitness en los pacientes con trastornos psiquiátricos graves (Laursen & Munk-Olsen, 2010; Bundy et al., 2011; Power et al., 2013). Entre las más plausibles se

encuentra la que se fundamenta en la dificultad que presentan estos pacientes para establecer relaciones personales y de pareja. Debe considerarse que en estas patologías el desarrollo y evolución de los síntomas suele interferir con diversos aspectos vitales, entre los que se encuentra el desarrollo psicosocial. Dado que la edad de inicio se sitúa hacia el final de la adolescencia y principio de la edad adulta, siendo generalmente de carácter crónico, el periodo reproductivo se ve afectado casi por completo. Así pues, se explicaría el bajo ratio de descendencia como una consecuencia de la dificultad para desenvolverse en su entorno social. También se ha argumentado que este fenómeno podría deberse al tratamiento, pues entre los efectos secundarios de la medicación se encuentra la disfunción sexual y la infertilidad debido a sus efectos sobre el equilibrio hormonal. No obstante, este hecho podría explicar la afectación únicamente en el periodo histórico en el que ha existido tratamiento farmacológico.

Establecer una hipótesis que explique por qué un alelo con un efecto definido sobre las características bioquímicas de una enzima puede relacionarse a su vez con dos fenotipos contrapuestos que modifican el fitness, es complejo y requiere contemplar diversas posibilidades. Dado que la diferencia de acción está en función del género, se plantea revisar qué relación puede tener la catecol-O-metiltransferasa con dicha diferencia de género y así establecer una base plausible que describa un mecanismo de tipo IASC (*intra locus sexual conflict*). La primera aproximación puede realizarse a partir de la propia ruta de degradación de las monoaminas, de la cual la enzima COMT es clave. La ruta consta de dos pasos, siendo la otra enzima implicada la monoamino oxidasa (MAO), de la cual existen dos posibles, MAO-A y MAO-B. Cada una de ellas está codificada por un gen independiente. Estos dos genes son contiguos y están localizados en el cromosoma X. Ambas enzimas pueden actuar sobre la dopamina y a su vez ser la segunda enzima de la ruta para completar la inactivación, dando como resultado ácido homovalínico. El hecho de que los genes de MAO estén en el cromosoma X implica que las mujeres poseen dos copias de cada uno de ellos, mientras que los hombres sólo portan una. Esto podría producir diferencias de género en la regulación del metabolismo de las monoaminas. A su vez, una diferencia en la regulación podría generar diferencias en el efecto fisiológico final de un determinado polimorfismo funcional como rs4680. Es por ello que se decidió incluir en el presente trabajo el estudio de polimorfismos en estos dos genes, con el fin de evaluar causas genéticas que presentaran diferencias de género en correspondencia con la prevalencia de la enfermedad.

En los resultados aquí obtenidos se ha determinado que el polimorfismo rs6323 en MAO-A y el polimorfismo rs1799836 de MAO-B, están en equilibrio Hardy-Weinberg y que no se presentan diferencias en la distribución de frecuencias entre las poblaciones control y con esquizofrenia, tanto masculina como femenina. Por lo tanto, no pueden establecerse asociaciones individuales entre los polimorfismos y la condición patológica.

Se analizaron, posteriormente, las correlaciones que pudieran existir entre los polimorfismos de los genes MAO-A y MAO-B con el polimorfismo rs4680 del gen COMT, de forma que pudieran ponerse de manifiesto posibles interacciones epistáticas. Estos análisis no arrojaron resultados positivos. En un principio, en la población femenina de pacientes, aparecían en los contrastes de las frecuencias de genotipos combinados valores significativos que podrían indicar un mejor ajuste descriptivo de la población. Sin embargo, analizados los subgrupos en función del genotipo en rs4680 por separado, no se observaban variaciones internas en la distribución de frecuencias del segundo SNP, tanto para rs6323 como para rs1799836. No se cumplía, por lo tanto, el segundo criterio establecido. De manera similar, para cada genotipo posible en rs6323 o en rs1799836, la distribución de los genotipos G_{portador} y AA para rs4680 se ajustaba a lo esperado en la población conjunta, no evidenciando un cambio de tendencia. Por consiguiente, debe deducirse que no aparecen asociaciones entre los polimorfismos del sistema dopaminérgico estudiados en la población femenina. Los mismos criterios permitieron deducir que no aparecen interacciones de tipo epistasia en la población masculina entre los polimorfismos rs4680, rs6323 y rs1799836.

Por lo tanto, en lo que respecta al análisis de las distribuciones de frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos genéticos del sistema dopaminérgico, la asociación con la aparición de esquizofrenia queda limitada al polimorfismo rs4680, no presentando asociaciones entre los SNP que sirvieran para establecer una correlación con la epidemiología de la enfermedad.

El SNP rs4680 presenta dos alelos, el ancestral G y un alelo alternativo A, lo cual corresponde a un cambio de aminoácido en la proteína. Esto a su vez causa un cambio en la actividad del enzima, de modo que en el caso del alelo A, la actividad está reducida cuatro veces respecto al alelo G. Además, el recambio del enzima es más rápido. Ambos aspectos implican, según ha podido estudiarse en modelos *in vitro*, que las células homocigotas AA tienen menor actividad o tasa de degradación de las monoaminas (Chen et al., 2004).

La asociación masculina encontrada en el presente trabajo, vincula el genotipo AA con el fenotipo de esquizofrenia, por lo tanto, los hallazgos estarían en consonancia con la teoría clásica que explica la base bioquímica de la patología como un estado de hiperdopaminergia, ya sea por una elevación propia de la dopamina, por una sensibilización al neurotransmisor o por un menor rango de tolerancia.

Sin embargo, en la población femenina se encuentra justo lo opuesto, es decir, que el genotipo AA tiene un fitness mayor que los otros dos genotipos posibles, GA y GG. Esto implica que el genotipo de baja actividad, que produce elevación del tono dopaminérgico, supone una ventaja que reduce el riesgo general de padecer esta patología. El gen COMT tiene diversas relaciones funcionales que podrían explicar la diferencia de género en la asociación a patologías desde un modelo de conflicto sexual intralocus. En primer lugar, cabe destacar que recientes hallazgos han encontrado que la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT) regulan los niveles de ARNm de los genes COMT, MAO-A y MAO-B en la sustancia nigra de ratas adolescentes macho así como también producía una regulación al alza del receptor de andrógenos (Purves-Tyson et al., 2012). Otros estudios ya han puesto de manifiesto el papel de la testosterona en el mayor riesgo de padecer esquizofrenia que presentan los adolescentes varones, fundamentalmente a través de la influencia que tiene esta hormona en la maduración de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio (Johnson et al., 2010). Existen también trabajos en los que la administración de testosterona producía incrementos de la dopamina estriatal (Dluzen & Ramírez, 1989). Asimismo, ha sido descrito un descenso de la supervivencia neuronal en el cerebro medio de rata como efecto de los andrógenos (Johnson et al., 2010). En cualquier caso, el papel de la testosterona en la regulación del metabolismo de la dopamina no está completamente dilucidado. Otro aspecto a tener en cuenta es la relación de la dopamina y la prolactina. En este sentido, es conocida la capacidad de la dopamina para inhibir la producción de prolactina. Esta inhibición se produce a través de la vía tuberoinfundibular y su acción está bien contrastada, pues dentro de los efectos secundarios de los neurolepticos, bloqueantes de los receptores dopaminérgicos, se encuentran elevaciones de los niveles de esta hormona (Fernández-Ruiz et al., 1997; González-Iglesias et al., 2008). Por último, puede remarcarse que la enzima COMT presenta entre los sustratos sobre los que realiza su acción a los compuestos hormonales derivados del metabolismo del estradiol, los denominados catecol-estrógenos (Guldber & Marsden, 1975), motivo por el cual la acción de COMT y del polimorfismo rs4680 han sido también investigadas en su relación con el riesgo, entre otros, del cáncer de mama (Martínez-Ramírez et al., 2013). Por otra parte, los

estrógenos parecen poseer capacidad neuroprotectora en las células de las vías dopaminérgicas nigroestriatales (Dluzen & Horstink, 2003)

Existen, por consiguiente, evidencias de un equilibrio dopaminérgico diferenciado entre sexos (Dluzen & McDermott, 2008); lo cual, al menos en parte, también ha sido expuesto por los estudios que indican que la respuesta al tratamiento es distinta en función del género (Häfner et al., 1991; Yonkers et al., 1992; Dawkins et al., 1993). Así pues, se ha observado que las mujeres necesitan, en general, menor cantidad de antipsicóticos atípicos para producir la respuesta al tratamiento, aunque posteriormente a la menopausia necesitan unas dosis mayores que los hombres, lo cual puede ser compensado mediante terapia sustitutiva de estrógenos (Häfner, 2003). Asimismo, se estima que la respuesta es más rápida y efectiva, pero también existe mayor sensibilidad a los efectos secundarios (Miller & Jankovic, 1990).

No obstante, pese a las evidencias que se acumulan en relación a las diferencias entre hombres y mujeres en todos los ámbitos de la patología (McGrath et al., 2005), resulta imposible elaborar un modelo global, pues en muchos aspectos los resultados obtenidos por distintos grupos de trabajo son contradictorios.

Finalmente, puede establecerse que una parte muy importante de los resultados de mayor interés, respecto al polimorfismo rs4680, han sido hallados en su relación con el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3, por lo que serán tratados y discutidos en el siguiente apartado.

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN EL GEN GRM3.

Los resultados obtenidos para el polimorfismo rs1468412 en el gen GRM3 han mostrado una asociación condicionada al género, observándose diferencias significativas en la distribución de frecuencias entre el grupo de control y el grupo de pacientes exclusivamente en la población femenina. Estos valores de asociación aunque entran en el rango de significación están, no obstante, cercanos al límite. A su vez, las variaciones en las frecuencias de los distintos genotipos y los ratios correspondientes a estas variaciones indican un modelo de herencia dominante para el alelo T en la población femenina, dado que tanto el genotipo heterocigoto AT como el homocigoto TT presentan una frecuencia aumentada en el grupo de pacientes. Se define, por lo tanto, el alelo T como un alelo de riesgo con un valor de odds-ratio de 1,43 y conforma la categoría de genotipos T_{portador} con un odds-ratio de 1,60.

La localización del polimorfismo rs1468412 dentro del gen en la región central del intrón 3 implicaría, en principio, clasificarlo como un polimorfismo no funcional. Sin embargo, han sido publicados trabajos en los que se muestra que la presencia de uno u otro alelo tiene un efecto molecular y bioquímico. De este modo, el estudio presentado por Xia et al. (2012) indica que los individuos con trastorno por consumo de alcohol y portadores del alelo T poseen un descenso significativo del ratio formado por las concentraciones del N-acetilaspártato y la creatina (NAA/Cr). Este ratio es un indicador de pérdida neuronal, así como de axones y dendritas atrofiados, especialmente en las neuronas piramidales del córtex prefrontal (Simmons et al., 1991; Moffet et al., 2007), de modo que los ratios bajos señalan un peor estado de las conexiones neuronales (Schuff et al., 2006). En el trabajo de Xia et al. (2012) estos ratios NAA/Cr reducidos se presentaban conjuntamente con bajas puntuaciones en los test de función ejecutiva. Los individuos del estudio eran pacientes con trastornos por consumo de alcohol y en todos ellos había un descenso de estos dos indicadores respecto a los individuos control, siendo en los pacientes $T_{\text{portadores}}$ muy marcado y significativo. Esto permitía concluir que el genotipo está señalando una cierta vulnerabilidad a los efectos del alcohol o potenciando los efectos neurotóxicos del mismo, es decir, se trata de un fenotipo condicionado a un trastorno previo, dado que el descenso del ratio indicador no se encuentra en los individuos control que son $T_{\text{portadores}}$ y no consumidores. En este mismo estudio también se encontraba asociación de estos fenotipos con otro polimorfismo situado igualmente en la región intrónica del gen GRM3, el SNP rs6465084, el cual mostraba efectos muy similares.

La asociación funcional del polimorfismo rs1468412 con fenotipos de pérdida de viabilidad neuronal y función ejecutiva en el córtex frontal podría explicar los resultados de asociación encontrados que lo relacionan con la aparición de esquizofrenia (Fujii et al., 2003; Chen et al., 2005), si bien otros estudios no han podido reproducir dichos resultados (Kawakubo et al., 2011; Bishop et al., 2011).

En cualquier caso, los resultados aquí presentados relativos al polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 que muestran una mayor relevancia son los que se ponen de manifiesto en el análisis de la correlación con el polimorfismo rs4680 del gen COMT, los cuales parecen indicar una relación de epistasia entre ambos y en cierta medida podrían explicar la causa por la cual los resultados de asociación del polimorfismo rs1468412 han sido menos consistentes que los del rs4680.

Para determinar los genotipos conjuntos rs4680-rs1468412 se partió de los modelos de herencia obtenidos para cada uno de los SNP independientemente, es decir, un modelo recesivo para el alelo A en el polimorfismo rs4680 (estableciendo así

las categorías G_{portador} y homocigoto AA) y dominante para el alelo T en el polimorfismo rs1468412 (estableciendo las categorías de homocigoto AA y T_{portador}). La combinación de estas categorías ofrece, por lo tanto, cuatro posibles combinaciones genotípicas, las cuales han mostrado también variaciones en la distribución de frecuencias dependientes de género. Así pues, en la población femenina se observa que el genotipo de riesgo, dado que aumenta su frecuencia en el grupo de pacientes, es el genotipo $G_{\text{portador}}-T_{\text{portador}}$. Esto estaría en congruencia con los resultados obtenidos de manera separada para cada polimorfismo. Para interpretar los resultados obtenidos para el genotipo conjunto se considera cumplido el criterio establecido por el cual el valor (p) obtenido en la distribución de frecuencias aporta un nivel de significación mayor que el obtenido independientemente para cada uno de los SNP, indicando con ello un mejor ajuste de los resultados y, por lo tanto, una interpretación del modelo más ajustada a su acción real. De este modo, el valor para la distribución general es de $p=0,0002$ y para la frecuencia del genotipo combinado $G_{\text{portador}}-T_{\text{portador}}$ es $p=0,0001$ con un odds-ratio de 2,52. Este valor implica una mayor acción conjunta de ambos alelos y puede considerarse como una epistasia entre ambos loci.

El segundo criterio, en el análisis de la epistasia, implica valorar si las distribuciones del segundo polimorfismo en cada uno de los grupos formados en función del genotipo del primero son homogéneas. En este sentido se encuentra una clara diferencia, así pues, en el grupo de pacientes, dentro de los $G_{\text{portadores}}$ para rs4680 el 56% son $T_{\text{portadores}}$ en rs1468412, mientras que en el grupo de genotipo AA para rs4680 sólo el 37% son $T_{\text{portadores}}$. Se observa, además, que el valor de significación ofrecido para el riesgo del genotipo T_{portador} se reduce de manera consistente, tomando un valor de 0,0018 a diferencia del valor de 0,0342 que presentaba en la distribución general. Finalmente, es el tercer criterio el que confirma la relación de epistasia entre ambos polimorfismos y establece su definición en sentido estricto. Al separar las poblaciones en dos grupos en función del polimorfismo rs1468412 de GRM3, es decir, genotipo AA (Tabla 52) y genotipo T_{portador} (Tabla 53), se observa una evidencia crucial. Puede comprobarse que en la población de genotipo AA no hay desviaciones del polimorfismo rs4680 entre controles y pacientes, mientras que en la población T_{portador} la desviación es muy elevada, pasando el genotipo de riesgo de un 65,79% a un 91,36% y marcando un odds-ratio de 5,50 [2,2-13,63].

La lectura de este resultado supone que el genotipo de riesgo en rs4680 es únicamente un genotipo de riesgo si aparece un genotipo concreto en el polimorfismo rs1468412. De este modo, el riesgo del genotipo G_{portador} está condicionado a la presencia de T_{portador} , y no sería un genotipo de riesgo para aquellos individuos que

son de genotipo AA en rs1468412. De este modo, puede concluirse que el polimorfismo rs4680 confiere un rasgo y el polimorfismo rs1468412 permite o no que dicho rasgo se exprese.

Para clasificar esta epistasia debe definirse el rasgo o fenotipo. Tal y como ya ha sido tratado, los resultados pueden interpretarse de dos maneras complementarias, esto es, que G_{portador} es de riesgo o que AA es protector. Por consiguiente, si denominamos al fenotipo "riesgo", el genotipo que lo produce sería la presencia de G dominante y T dominante. Se trataría, en conclusión, de una epistasia doble recesiva, dado que una pareja homocigota recesiva en cualquiera de los dos loci inhibiría el fenotipo. A su vez, podría considerarse el fenotipo "protección", en cuyo caso sería necesaria la presencia de dobles alelos recesivos en ambos loci, siendo, por lo tanto, un ejemplo de epistasia doble dominante, pues cualquiera de los alelos dominantes en cualquiera de los loci, inhibe el fenotipo.

La población masculina muestra una acción contrapuesta. En primer lugar se destaca que no se obtuvieron valores de significación para el SNP rs1468412. Tampoco los ratios o pequeñas desviaciones de frecuencia mostraban una tendencia o un modelo de herencia definido. Valorando las diferentes posibilidades se observa que la asunción del mismo modelo de herencia que en la población femenina permite obtener resultados positivos también en la población masculina. De este modo se ha obtenido un valor de asociación significativo para la variación en la frecuencia del genotipo combinado AA-AA. Este valor ($p=0,0029$) es de magnitud similar al obtenido para el genotipo independiente de COMT y dificulta su interpretación, indicando con ello que la variación en el ajuste de los resultados a un modelo no aporta grandes diferencias. Al aplicar el segundo criterio se observa que las dos poblaciones, G_{portador} y AA, son similares en sus distribuciones de frecuencias en los genotipos del polimorfismo rs1468412. Lo mismo sucede en la comparación de las frecuencias segregando en el sentido inverso. Por lo tanto, se concluye que no hay correlación ni epistasia entre ambos polimorfismos en la población masculina.

Estos resultados alcanzan, por consiguiente, un segundo nivel en la diferenciación de la epidemiología genética de la esquizofrenia entre la población masculina y femenina. Por un lado, existe una diferente vinculación de alelos en el polimorfismo de COMT para cada una de las dos poblaciones, por otra parte, la epistasia que se establece con el polimorfismo del gen GRM3 también queda condicionada al género, pues sólo se presenta en población femenina.

La correlación entre los genes COMT y GRM3 ha sido puesta previamente de manifiesto por el estudio de Tan et al. (2007), aunque no se remarcaba una acción

diferencial entre sexos. En este caso, el estudio se centraba en diferencias aparecidas en los test de memoria de trabajo en personas sin síntomas ni patología psiquiátrica y ofrecía como resultado una constatación de la epistasia entre los dos genes. Este estudio utilizaba también el SNP rs4680 para el gen COMT, mientras que para el gen GRM3 el SNP de referencia era el rs6465084 (NM_000840.2:c.468+8546A>G). Este polimorfismo está en el intrón 2 (posición 86.403.475, cromosoma 7, GRCh37.p10) y ha sido asociado a diversos fenotipos relacionados con la esquizofrenia. Estudios previos al publicado por Tan et al. (2007) muestran una asociación de este polimorfismo tanto con los fenotipos de esquizofrenia como con alteraciones del ratio NAA/Cr de manera muy similar a la del polimorfismo rs1468412 (Marenco et al., 2006; Egan et al., 2004) y ha sido confirmado posteriormente (Xia et al., 2012). De ese modo pueden establecerse ciertas analogías entre ambos polimorfismos de GRM3, siendo el genotipo AA de rs6465084 el que presenta fenotipos similares a los genotipos T_{portador} de rs1468412.

Así pues, el genotipo conjunto rs4680-rs6465084 que determinaba peores resultados en los test y parámetros de memoria de trabajo era GG – AA, y sería el equivalente al genotipo $G_{\text{portador}}-T_{\text{portador}}$ (rs4680-rs1468412) determinado como genotipo de riesgo para la población femenina por los resultados aquí presentados. Puede destacarse que, si bien Tan et al. no indican en sus conclusiones una vinculación al género, se observa que el grupo con dicho genotipo está compuesto por dos terceras partes de mujeres (6 de 9). Por su parte, el genotipo que podría suponerse como de riesgo en hombres sólo está representado por dos individuos, por lo que cabe la posibilidad de que el limitado número de sujetos del estudio no permita encontrar las diferencias en función del género, si bien se muestra una coherencia con los resultados aquí expuestos.

Para cerrar los resultados concernientes al polimorfismo rs1468412 del gen GRM3 cabe mencionar que su correlación independiente quedaba vinculada a la población femenina con esquizofrenia, es decir, no aparecía en la muestra poblacional de pacientes con trastorno bipolar del mismo género. Esto es destacable porque, como ya ha sido discutido, en la población de esta enfermedad si bien no se encontraban valores de asociación positivos, sí se podían observar tendencias coherentes con los resultados obtenidos en la población con esquizofrenia en la distribución de frecuencias del SNP rs4680. Sin embargo, en el polimorfismo rs1468412 la similitud con la población control marcaba una gran diferencia respecto a la población con esquizofrenia.

3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN GENES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.

Respecto a los resultados de los polimorfismos en genes del sistema endocannabinoide, el hallazgo principal se centra en la asociación positiva que presenta el polimorfismo rs35761398 del gen CNR2 en la muestra de pacientes con psicosis dual. Así pues, se observó un aumento marcado de las frecuencias de los genotipos CC/TT y TT/TT. Este aumento es independiente del género y los resultados se ajustan a un modelo de herencia dominante para el alelo TT, el cual produce un incremento del riesgo de padecer esta situación comórbida caracterizada por la presencia de esquizofrenia y de un trastorno por uso de sustancias (TUS).

Esta desviación de las frecuencias no aparece ni en la muestra de pacientes con esquizofrenia ni en la de pacientes con trastorno bipolar, ambas, poblaciones constituidas por individuos que no presentan TUS. Por su parte, el reducido número de individuos en la población de patología dual por trastorno bipolar y TUS no permite la obtención de conclusiones consistentes. En consonancia con este resultado la comparación entre las frecuencias de la población con esquizofrenia sin TUS y las de la población con psicosis dual ofrecía una diferencia significativa, indicando, por lo tanto, que las dos poblaciones son diferentes en este aspecto. La comparación de los odds-ratio permite, además, comprobar esta diferencia entre ambas poblaciones. De este modo, entre la población control y la población con psicosis dual, para el genotipo TT_{portador}, el odds-ratio es de 1,96. La comparación entre población con esquizofrenia y con psicosis dual ofrece un valor de 1,84 para este modelo de herencia dominante del alelo TT. Son, por lo tanto, cifras muy semejantes que indican un peso similar de este alelo sobre la aparición del fenotipo de psicosis dual pero no para la esquizofrenia sin TUS.

El concepto de patología dual, actualmente, continúa planteando una discusión abierta, cuestionando si debe o no definirse como una entidad nosológica diferenciada (Mueser et al., 1998). Esto implica que puede considerarse la situación comórbida de trastorno psiquiátrico y TUS como una confluencia de patologías independientes no relacionadas, o por el contrario, como una enfermedad en sí misma más allá de la similitud que pueda presentar con otros cuadros clínicos.

Las diferencias halladas en el presente estudio, para las frecuencias del polimorfismo de CNR2, entre población de esquizofrenia y población con psicosis dual, no han podido ser comparadas con pacientes duales que presentaran como patología

de base el trastorno bipolar, dada la escasa prevalencia de TUS en la población reclutada con dicha patología.

Para solventar esta cuestión se recurrió a una población complementaria al estudio, constituida por individuos con trastornos por uso de sustancias. Este grupo de pacientes ha recibido asistencia en diversos centros de ayuda al drogodependiente (CAD) de la Comunidad de Madrid y de Castilla-La Mancha y en el Servicio de Psiquiatría de la Fundación Hospital de Alcorcón. El número de pacientes reclutado no es elevado y no pudo caracterizarse completamente, lo que dificulta la obtención de conclusiones robustas. No obstante, la importancia de contrastar los resultados anteriormente mencionados causa que se presenten los datos obtenidos para esta población, siempre teniendo en cuenta que son resultados preliminares que deben contrastarse posteriormente. Así pues, se consideró que esta muestra poblacional presentaba un número suficiente como para observar una elevada similitud en la distribución de frecuencias del polimorfismo rs35751398 respecto a la población control y, por lo tanto, diferente a la distribución de frecuencias presentada en la población con patología dual. En los odds-ratio, la relación entre el grupo de control y el grupo con TUS es de 1,12 mientras que al comparar la población de TUS con respecto a la de psicosis dual el valor obtenido es de 1,75.

Consecuentemente, este dato indica que el polimorfismo rs35761398 de CNR2 está asociado al consumo en la población psiquiátrica, no así en la población sin síntomas de esquizofrenia. Este hallazgo debe ser confirmado por posteriores estudios que amplíen el número de individuos consumidores para contrastar las diferencias entre ambos grupos.

Las frecuencias del polimorfismo rs324420 del gen FAAH muestran una asociación que aparece al contrastar la población control y la muestra de pacientes con TUS sin síntomas psicóticos, pero no al comparar controles frente a la población con psicosis dual. En el grupo de pacientes con TUS se observa un aumento de los dos genotipos homocigotos, CC y AA, con una reducción equivalente y marcada del porcentaje del genotipo heterocigoto. Esto implicaría un carácter protector del genotipo CA. El carácter protector frente a una patología, o una ventaja selectiva, para el genotipo heterocigoto ha sido descrito en la bibliografía y se conoce como sobredominancia o “ventaja del heterocigoto” (Falconer & Mackay, 2006). Este modelo de herencia se conceptualiza como una ventaja que posee el individuo que porta alelos diferentes en un locus determinado. Las dos explicaciones que fundamentan este modelo contemplan dos posibilidades: la primera, que el heterocigoto suponga un fenotipo intermedio entre dos extremos de riesgo; la segunda, que cada variedad del

gen sea óptima para una circunstancia o factor ambiental diferente, de modo que poseer ambas variedades supone un mayor rango de respuesta ante los cambios del entorno. En las patologías psiquiátricas han sido publicados algunos hallazgos que implican a este tipo de acción genética (Keller & Miller 2006; Costas et al., 2011). No obstante, en este caso de rs324420 en población con TUS, el ajuste a un modelo codominante resulta ligeramente más significativo aunque prácticamente idéntico al modelo de sobredominancia, por lo que no puede afirmarse cuál de los dos modelos responde mejor a la realidad biológica. Dado el número reducido de la población y su caracterización incompleta, así como el hecho de que este polimorfismo ha mostrado diferente asociación en función del tipo de consumo (Tyndale et al., 2007), no puede alcanzarse una conclusión válida y se hacen necesarios estudios posteriores.

Para contextualizar los resultados de los polimorfismos rs324420 y rs35761398, deben valorarse las hipótesis que se contemplan actualmente para explicar la elevada prevalencia del consumo en la población psiquiátrica y que han sido enunciadas en la introducción. En la hipótesis de la automedicación se afirma que los pacientes experimentan ciertas mejoras con el consumo, o al menos, tienen esa percepción subjetiva (Brady et al., 2005). Polimorfismos funcionales en los genes pertenecientes al sistema endocannabinoide podrían producir entonces que ciertos individuos fueran más sensibles a dichos efectos. En consecuencia, existiría una tendencia mayor hacia el consumo. Dado que dichos efectos son paliativos de un síndrome previo o patología subyacente, dicho polimorfismo no estaría vinculado al consumo o a la tendencia al consumo en sí misma en población no psiquiátrica, sino que estaría relacionada con la diferenciación de distintos fenotipos de la enfermedad de base.

El polimorfismo rs35751398 ha sido descrito como un polimorfismo funcional. El cambio del alelo ancestral CC por el alelo TT, produce una sustitución en el residuo 63, pasando de arginina a glutamina. Los ensayos de actividad (Ishiguro et al., 2009), indican que este cambio supone un aumento de la capacidad del receptor para transducir la señal ante la unión de ligando. Según mostraron, el receptor con glutamina en la cadena es más activo. Dado que CNR2 se une a proteína G inhibidora, esto produce que el descenso de AMPc sea mayor. Este efecto en cultivo *in vitro* producía que ante el estímulo de 2-AG la inhibición de la proliferación fuera más efectiva. No obstante, estos resultados no han sido replicados.

Como se ha tratado en la introducción, la localización de los receptores CB2 en el cerebro es aún objeto de investigación y no está completamente esclarecida (Onaivi, 2006), lo cual, resulta crucial para valorar las posibles implicaciones de la

asociación encontrada. En cualquier caso, su expresión aceptada en microglia y astroglia implicaría que podría participar en los procesos neuroinflamatorios (Ashton et al., 2007; Baker et al., 2007; Benito et al., 2008) y también en el mantenimiento de la homeostasis de la sinapsis neuronal. Esto, a su vez, podría englobarse dentro de los modelos que conceptualizan los trastornos psicóticos como un conjunto de alteraciones de la conectividad al estar afectados los procesos de adhesión celular o la mielinización (Balu & Coyle, 2011; Ayalew et al., 2012). Por otra parte, la hipótesis de la vulnerabilidad común (Extein & Gold, 1993) establece que tanto los trastornos psiquiátricos como los trastornos por uso de sustancias tienen unas bases biológicas comunes que pueden derivar en una patología o en otra, y con cierta frecuencia, en ambas. Esta hipótesis con respecto al caso específico de los polimorfismos rs35761398 y rs324420 no tendría aplicación, dado que si se diera este caso, deberían observarse las mismas desviaciones de frecuencia en los consumidores sin sintomatología psiquiátrica que en los pacientes de patología dual, así como también en la propia población de esquizofrenia sin consumo. Dado que esto no sucede, esta hipótesis, en lo que respecta a factores genéticos, podría descartarse.

El tercer tipo de hipótesis plantea que el consumo está causando o agravando el trastorno psiquiátrico primario (Volkow, 2001; Roncero et al., 2007). Dentro de este modelo podría plantearse que un determinado genotipo de CNR2 pudiera suponer un riesgo de aparición de esquizofrenia cuando hay presente un consumo de sustancias, en este caso un consumo de cannabis, siendo por tanto un factor genético de riesgo condicionado a un factor ambiental. El alelo TT implicaría entonces una vulnerabilidad a la sustancia, es decir, sería un alelo que provocaría que el portador fuera sensible a desarrollar síntomas como consecuencia del consumo. En este sentido, los receptores derivados del gen con el alelo TT potenciarían los cambios neurobiológicos producidos por el consumo, de modo que los desequilibrios producidos serían mayores y generarían la aparición de síntomas psiquiátricos. No obstante, podría suceder que el alelo TT se configurara como un factor de riesgo de presentar una tendencia al consumo cuando se parte de un trastorno psiquiátrico de base. De esta manera, el alelo de riesgo TT, podría facilitar los fenómenos de tolerancia y dependencia, característicos de las adicciones. Podría suceder entonces que ante un consumo ocasional o relativamente moderado, se generarían más rápidamente los esquemas de refuerzo que derivarían hacia un trastorno por uso de sustancias, siempre condicionado a la aparición del trastorno psiquiátrico previo. Esto puede explicarse si se presupone que una situación de patología psiquiátrica implica un desequilibrio neuroquímico que afecta tanto a la transmisión sináptica como a los procesos de

conexión y plasticidad de las vías neuronales (Ayalew et al., 2012; Silverstein et al., 2013). Por ello, un polimorfismo funcional que no afecta ni supone riesgo en un organismo sano, supone un genotipo de riesgo añadido en un tejido que previamente presenta un equilibrio comprometido. Sin embargo, contra esta explicación puede argumentarse que la edad de inicio del consumo suele preceder entre 5 y 10 años a la aparición de la esquizofrenia (van Os et al., 2002). No obstante, también se ha planteado que la fase prodrómica de la esquizofrenia antecede en varios años al tratamiento clínico, de modo que también podrían estarse dando las primeras alteraciones neurobioquímicas endógenas de la patología durante los años de inicio en el consumo.

Se genotipó también el polimorfismo rs12744386 en aquellas poblaciones en las que se obtenían resultados de asociación positivos para el SNP rs35761398 con objeto de descartar o incluir su posible influencia y valorar el haplotipo en su conjunto. El polimorfismo rs12744386, según los resultados obtenidos por Ishiguro et al. (2009) está modificando la expresión del gen, de modo que el alelo T presenta mayores niveles de ARNm. Los haplotipos rs12744386-rs35761398 descritos como frecuentes son dos: C - CC y T - TT. Sin embargo, también han sido referidos haplotipos poco frecuentes, con las combinaciones C - TT y T - CC. Sin embargo, los únicos haplotipos encontrados en la población del presente estudio han sido dos: C - CC y T - TT, siendo por lo tanto la correlación como haplotipo entre los dos polimorfismos del 100%. Así pues, en la población aquí presentada, coincide el alelo de alta expresión del gen con el alelo de mayor transducción de señal del receptor, y se mantiene, por lo tanto, lo enunciado anteriormente.

Por consiguiente, pueden resumirse los resultados para los genes del sistema endocannabinoide en una evidencia fundamental: las dos poblaciones con consumo presentan asociaciones distintas para dos polimorfismos diferentes. Esta diferencia entre las frecuencias de los dos polimorfismos para dos poblaciones que presentan TUS pero que tienen diferentes perfiles psiquiátricos, podría indicar que se trata de dos situaciones fenotípicamente similares pero que son diferentes en cuanto a sus causas.

En los resultados obtenidos para evaluar la correlación de los dos polimorfismos que ofrecen asociación en el grupo masculino de pacientes de patología dual, esto es, rs4680 (COMT) y rs35761398 (CNR2), aparecieron valores de asociación significativos. Este valor correspondía al genotipo G_{portador} - CC/CC, el cual presentaba un ratio reducido en la población de pacientes, indicado así que se trataría de un genotipo protector. Sin embargo, el criterio para aceptar un valor de asociación

significativo en los análisis de correlación es que la distribución de genotipos conjuntos aporte un valor añadido a la significación. En este caso sucede que el valor obtenido para (p) es 0,0064, por tanto inferior al obtenido para el polimorfismo de CNR2, pero no para el polimorfismo de COMT. Esto lleva a la necesidad de plantearse si realmente el valor está indicando un fenómeno de epistasia, dado que el enfoque modificaría la interpretación del resultado. Por el segundo criterio, se observa que la distribución de frecuencias de los genotipos rs35761398 en los dos grupos de rs4680 no es homogénea. De este modo, se confirma que el genotipo TT_{portador} es de riesgo en genotipos G_{portador} pero no en los AA, en este caso el genotipo con el odds-ratio aumentado es CC/CC. El tercer criterio, es decir, la segregación inversa, no se cumpliría, pues se encontrarían las relaciones esperadas, de modo que el genotipo AA en rs4680 es de riesgo tanto para el genotipo TT_{portador} como para el homocigoto CC/CC. El valor diferencial, depende, por consiguiente de una de las comparaciones cuyos valores en números absolutos es bajo y que por lo tanto no resulta consistente.

Por ello, debe estimarse que si bien parece haber una interacción con función protectora o de riesgo reducido en el genotipo G_{portador} - CC/CC, ésta se debe a una interacción de tipo aditivo entre ambos y no a una epistasia.

En lo referente a los resultados del polimorfismo (AAT) $_n$ en el gen CNR1, se observaron ciertas diferencias, algunas de ellas significativas, que no obstante resultan de interpretación incierta. La principal de ellas remarca la presencia del alelo 3 (equivalente a 9 repeticiones del triplete AAT) únicamente en la población de pacientes, independientemente de la patología. Así pues, se comprueba que este alelo aparece en población con esquizofrenia, en patología dual, en trastorno bipolar y también en la población de consumidores con TUS sin síntomas psiquiátricos. Esto es especialmente llamativo en cuanto que la población con TUS reclutada es una población relativamente pequeña, mientras que la población control es de 316 individuos, es decir, que de los 532 cromosomas analizados, ninguno porta el alelo 3. Obviamente, las diferencias que aparecen en las comparaciones de frecuencias ofrecen resultados significativos. No obstante, debe resaltarse que el conjunto de cromosomas analizados para CNR1 suma, entre las distintas patologías, un total de 1362, apareciendo en 14 de ellos el alelo 3. Este resultado, aunque remarcable, debe considerarse como una asociación cuando menos dudosa e incluso descartarse. En primer lugar, la evaluación de 9 alelos diferentes plantea la necesidad de utilizar la corrección de Bonferroni para reducir la probabilidad de asociaciones espurias. Una vez aplicada la corrección, el valor de significación obtenido quedaría fuera del rango significativo. Debe además evaluarse un supuesto de simulación sencilla. De este

modo, la aparición de un único individuo en la población control que portara el alelo 3 modificaría suficientemente las frecuencias como para que éstas dieran resultados no significativos. Siguiendo esta línea de discusión se han consultado estudios anteriores, encontrándose que, si bien el alelo 3 no siempre aparece en la población control, sí existen estudios que detectan el alelo en individuos sanos (Barrero et al., 2005). Es por ello que la asociación del alelo 3 con la población de pacientes debe descartarse, aunque futuras investigaciones deben confirmar este punto aumentando el número de individuos en la población control. En caso de confirmarse la ausencia del alelo 3 en la población sin patología psiquiátrica podría plantearse un estudio de ligamiento o tríos en las familias de estos pacientes, pues podría ocurrir que este alelo poseyera un peso específico elevado en un grupo definido de individuos.

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO Y LA EDAD DE INICIO.

La edad de inicio registrada en la muestra poblacional estudiada está en concordancia con las registradas por otros estudios (Munk-Jorgensen, 1987; McGrath et al., 2004; Aleman et al., 2003), tanto en los valores medios de edad como en las diferencias existentes entre la población masculina y femenina, siendo menor en la primera. No obstante, estas diferencias en la distribución de edades no resultan estadísticamente significativas.

Posteriormente se analizaron las medias y medianas en las edades de inicio en función del genotipo presente en los diferentes polimorfismos genotipados, encontrando resultados destacables.

En primer lugar, se observa que la segregación en función del genotipo del polimorfismo rs4680 produce diferencias más amplias que las producidas únicamente en la segregación por género. De este modo, en la población femenina con esquizofrenia sin TUS hay una diferencia de 2,77 años en la media y de 4 años en la mediana, siendo el genotipo AA el que presenta una edad de inicio menor. En la población masculina la diferencia es más reducida, siendo de 1,47 años menor en la media y de 3 años en la mediana para los individuos G_{portador} . Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Klebe et al. (2013) en población masculina con enfermedad de Parkinson. En dicho trabajo se mostraba que el alelo G era un modificador de la edad de inicio, de modo que los homocigotos GG iniciaban los síntomas a una edad menor.

Las diferencias en el presente estudio no resultaron significativas en la prueba U de Mann-Whitney, aunque resulta interesante señalar que estas diferencias de edad son contrapuestas entre géneros. Así pues, en la población femenina, el genotipo AA corresponde a valores de edad menores mientras que en la población masculina este genotipo presenta una media de edad más elevada. Esto, en principio, podría resultar contradictorio, pues la asociación con el aumento de riesgo de aparición es inversa.

En esta misma población de pacientes, el polimorfismo rs1468412 muestra diferencias de edad menos acusadas. En este caso el genotipo homocigoto del alelo ancestral AA presenta la misma media en hombres y mujeres. Sin embargo, el genotipo T_{portador} indica una direccionalidad opuesta, de modo que es mayor en mujeres que en hombres, marcando una diferencia entre ambos grupos de 2,77 años.

Posteriormente se analizaron las distribuciones de edad en función de los genotipos combinados, de modo que pudieran ponerse de manifiesto interacciones epistáticas. Los diferentes test no arrojan diferencias significativas entre los grupos, es decir, las diferencias observables no muestran diferencias lo suficientemente altas como para que pueda afirmarse que existen dichas diferencias desde un punto de vista puramente estadístico. No obstante, puede considerarse la presencia de una tendencia que necesitaría ser confirmada por estudios posteriores que amplíen la muestra, consolidando las conclusiones que actualmente no pueden darse por válidas.

No obstante, se realizaron los análisis de epistasia, encontrando los resultados más importantes en la muestra poblacional femenina de pacientes con esquizofrenia sin TUS. En esta población ha podido encontrarse una indicación de epistasia entre los polimorfismos rs4680 y rs1468412. De este modo, se encuentran ciertas diferencias reseñables entre los genotipos $G_{\text{portador}}-T_{\text{portador}}$, grupo que presentaría la media de edad más elevada, y el grupo $AA-T_{\text{portador}}$, que presentaría la media más baja, marcando por tanto una diferencia de 3,64 años. Así pues, según lo visto en una primera aproximación (ver Tabla 59), la edad en el genotipo AA en rs4680 no varía en función del genotipo en el SNP rs1468412. Por otra parte, al analizar las desviaciones epistáticas, las cuales miden la diferencia entre la desviación esperada y la observada, lo que puede valorarse es que existe un valor aproximado de desvío de un año. Así pues, el genotipo AA – AA tendría en realidad una media más alta de la esperada y el genotipo AA – T_{portador} una media más baja.

En cualquier caso, la interpretación de estos datos debe valorarse críticamente, pues no puede afirmarse que exista diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, es destacable que el análisis de epistasia sobre la variable cuantitativa de la edad de inicio ofrezca como resultado más destacable los mismos polimorfismos en el

mismo grupo muestral. Por consiguiente, aunque los datos en sí mismos deben ser confirmados y no pueden ofrecer una conclusión propia, remarcan la asociación de estos dos SNP dentro del grupo femenino de pacientes con esquizofrenia, del mismo modo que remarcan la diferente direccionalidad entre géneros.

Por su parte, en las poblaciones de psicosis dual y de trastorno bipolar, no se hallaron diferencias significativas en las edades al segregar en función del genotipo, si bien sí se encontraban diferencias significativas entre géneros en la edad de inicio. En psicosis dual la diferencia en las medias es de 4,19 años y en las medianas de 5 años, siendo la edad de inicio menor en hombres que en mujeres. Lo opuesto sucede en el trastorno bipolar sin TUS, donde la edad de aparición es más elevada en los hombres, siendo las diferencias de 6,13 años en la media y de 4 años en la mediana. En la población con psicosis dual se han mostrado los análisis de la epistasia realizados en población masculina entre los polimorfismos rs4680 del gen COMT y el polimorfismo rs35761398 del gen CNR2. En este caso las diferencias entre los genotipos posibles no ofrecían datos destacables que indicaran ni asociación ni tendencia.

5. CONSIDERACIONES FINALES.

El estudio de los polimorfismos comunes dentro de las enfermedades complejas plantea una cuestión fundamental para la biología evolutiva. Esta cuestión implica responder a la pregunta de por qué se han mantenido en la población estos alelos, ampliamente extendidos, si generan un riesgo considerable de desarrollar patologías graves, altamente incapacitantes, de prevalencia elevada y que tienen asociada una fuerte disminución de la capacidad reproductiva. El planteamiento por el que se considera que un locus determinado presenta un alelo ancestral normal y un alelo alternativo de riesgo, no puede explicar que dicho alelo posea una frecuencia tan alta en la población si, como ha sido expuesto, conlleva un descenso del ratio de descendencia. El curso evolutivo de dicho modelo implica que el alelo debería desaparecer de la población a lo largo de las sucesivas generaciones tanto más rápido cuanto mayor sea el descenso de la descendencia que genera y la penetrancia de la variación genética. En consonancia con esta cuestión se plantea una perspectiva diferente y complementaria que supone valorar el propio origen de un alelo alternativo. Así pues, debe tenerse presente que, cuando un nuevo alelo surge en la población a partir del alelo ancestral por un cambio o mutación, para que dicho alelo se extienda y aumente su frecuencia hasta alcanzar un equilibrio, debe de existir una ventaja

selectiva o adaptativa. Por consiguiente, la propia frecuencia del alelo ya es indicativa de que esa ventaja existe o ha existido.

En concreto, en la esquizofrenia y el trastorno bipolar se ha observado una fuerte presión selectiva de sentido negativo. Además, los factores genéticos de estas dos patologías parecen estar, al menos en parte, compartidos con otras patologías que también evidencian reducciones en su fecundidad, por lo que a efectos de valorar la presión selectiva sobre dichos loci, podrían considerarse como un único vector selectivo. Por lo tanto, estas variantes genéticas tenderían a reducir sus frecuencias en relativamente pocas generaciones. Sin embargo, esto no es lo que se observa, y por ello, se ha enunciado la denominada “paradoja central de la genética de la esquizofrenia” (Brüne, 2004; Doi et al. 2009), para cuya solución se han planteado diversas hipótesis que explican la elevada frecuencia de los polimorfismos de riesgo en la población general (Keller et al., 2006; Crow, 2008; Keller et al., 2012; Power et al., 2013). Entre estas hipótesis se encuentra la de la neutralidad ancestral, la cual estima que los polimorfismos de riesgo son de riesgo en el momento presente debido a factores ambientales, pero que no lo eran en su origen. Por otra parte, se presentan también hipótesis que engloban a los mecanismos selectivos de selección balanceada o equilibradora, es decir, mecanismos por los cuales las diferentes variedades alélicas son preservadas en el acervo génico, dado que cada uno de los alelos y de los genotipos que se forman producen una ventaja para un conjunto de variables ambientales pero no para otras, posiblemente bajo un modelo de efectos pleiotrópicos del gen. De este modo han sido descritas posibles “ventajas del heterocigoto” (Doi et al, 2009) o diferentes presiones selectivas en función del género (Power et al., 2013).

Los resultados aquí presentados responderían a este último supuesto. De este modo, se ha podido constatar la diferente vinculación del polimorfismo rs4680 del gen COMT en la esquizofrenia en función del género, describiendo así un mecanismo de conflicto sexual intralocus.

Conjuntamente, resulta muy importante el hallazgo encontrado en la epistasia entre este polimorfismo y el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3, pues podría explicar parcialmente la habitual inconsistencia de los resultados ofrecidos para estos dos genes (Williams et al., 2007; Bishop et al., 2011). De este modo, el riesgo aportado por el genotipo del primer polimorfismo está regulado por el genotipo del segundo, por lo tanto, si una población estudiada es prioritariamente del genotipo inhibitor ofrecerá como resultado una ausencia de asociación con el primer polimorfismo.

La mayor ventaja aportada por el presente trabajo radica en el análisis de la población control mediante un planteamiento metodológico de genética evolutiva, el cual ha permitido estimar el peso específico que presenta este gen como valor selectivo. Esto a su vez facilita una interpretación coherente con los resultados que posteriormente se encuentran mediante un estudio de asociación en la población de pacientes. Así pues, las conclusiones sacadas independientemente para cada población, al confrontarlas, conforman un modelo consistente.

El tercer hallazgo del estudio, referente al polimorfismo de CNR2, muestra sin embargo mayores limitaciones, fundamentalmente debidas al reclutamiento efectivo de los grupos consumidores. De este modo, el número de mujeres con psicosis dual era muy reducido, aunque ajustado a la epidemiología conocida. También presentó un número muy reducido el número de pacientes duales con trastorno bipolar como trastorno de base, que en este caso sí fue menor del esperado. Esto no ha permitido hacer contrastes suficientemente robustos para interpretar biológicamente los resultados de este gen, aunque no impide enunciar la conclusión básica.

Por consiguiente, los resultados obtenidos para el polimorfismo rs35761398 lo asocian con la situación clínica de psicosis dual, mostrando con ello un ejemplo de polimorfismo de riesgo condicionado a un factor ambiental que en este caso no parecía indicar una diferencia de género.

Conclusiones.

1- No se han encontrado, en el presente estudio, asociaciones del polimorfismo de tipo microsatélite (AAT)_n, perteneciente al gen CNR1, para ninguna de las patologías estudiadas. Tampoco aparecieron asociaciones para el polimorfismo rs6323 en el gen MAO-A ni para en el polimorfismo rs1799836 en el gen MAO-B.

2- No se han obtenido, en la población de pacientes con trastorno bipolar, resultados estadísticamente significativos para ninguno de los polimorfismos que conforman este trabajo.

3- Se ha encontrado una asociación del alelo TT en el polimorfismo rs35761398 del gen CNR2 con la situación comórbida de esquizofrenia y trastorno por uso de sustancias. Esta asociación indica una acción dominante del alelo, configurando un factor de riesgo específico para este cuadro clínico.

4- Se ha encontrado que el polimorfismo rs4680 perteneciente al gen COMT presenta asociación con el riesgo de aparición de esquizofrenia. Dicha asociación describe un mecanismo evolutivo denominado *conflicto sexual intralocus* y, por lo tanto, implica un proceso de selección equilibradora. Así pues, se concluye que el genotipo AA de este polimorfismo es un genotipo protector en población femenina mientras que resulta ser de riesgo en población masculina.

5- Se ha detectado en población femenina una correlación entre el polimorfismo rs4680 del gen COMT y el polimorfismo rs1468412 del gen GRM3, evidenciando la relación entre el sistema dopaminérgico y glutamatérgico a través de interacciones de tipo epistasia genética. Queda definida, por lo tanto, como categoría genotípica de riesgo para la aparición de esquizofrenia, la formada por los genotipos que incluyen simultáneamente los alelos G en COMT y T en GRM3 (G *portador* - T *portador*).

6- La epistasia existente entre los polimorfismos rs4680 y rs1468412 en la población femenina, queda definida como una epistasia de tipo doble recesiva para el fenotipo de “riesgo incrementado”. Esto implica que el genotipo AA, homocigoto para el alelo ancestral, del polimorfismo rs1468412 inhibe el riesgo asociado al genotipo G_{portador} del polimorfismo rs4680.

Abstract.

1. BACKGROUND.

Schizophrenia and bipolar disorder are two of the most severe psychiatric disorders (Jablensky et al., 2010; Goodwin & Jamison, 2007) with a high prevalence in the world population. The genetic researches on these diseases are included primarily within the paradigm which postulates the existence of genetic factors that increase the basal risk. Therefore, these factors cause a genotypic susceptibility but not a determination to develop these diseases, because genes are always in interaction with environmental factors of different nature to cause the phenotype (O'Donovan et al., 2009). Thus, the genetic risk factors for schizophrenia and bipolar disorder will be measured as an increase of the likelihood to developing these disorders. It is also a fact the high prevalence of these disorders, much higher than any disease with Mendelian inheritance. Therefore, the genetic association studies are based on the "common disorder-common alleles" hypothesis, which means that the risk alleles have high frequencies in the global population.

The studies of common polymorphisms in complex diseases present a fundamental question in evolutionary biology. Thus, in schizophrenia and bipolar disorder has been found a strong negative selection pressure with a high reduction of fitness (Crow, 2008; Power et al., 2013), however, is not well understood how risk alleles have been maintained in the gene pool of population (Keller & Miller, 2006). Therefore, it has enunciated the "central paradox of the genetics of schizophrenia" (Brüne, 2004; Doi et al 2009).

In addition, the epidemiology of schizophrenia and bipolar disorder shows clear gender differences in the prevalence, age of onset and severity (Aleman et al., 2003; Viguera et al., 2001) which may suggest the existence of an evolution balancing mechanism. On the other hand, the substance abuse must be considered an important environmental factor in the etiology of these diseases and also shows gender differences (Drapalski et al., 2011).

2. OBJETIVOS.

- To study the distribution of allele and genotype frequencies in a reference control sample for the following genetic polymorphisms: rs4680 (COMT), rs6323 (MAO-A), rs1799836 (MAO-B), (AAT) n (CNR1), rs35761398 (CNR2), rs324420 (FAAH) and rs1468412 (GRM3).

- To study the distribution of allele and genotype frequencies in the polymorphisms listed in the first objective in two samples (patients with schizophrenia and patients with bipolar disorder) and the corresponding comorbid situations with substance use disorder.

- To determine the associations that may exist between the genotypes of each polymorphism and phenotypic differences in the clinical symptoms, evaluating the biological properties of the alleles and genotypes.

- To determine the epistasis between different loci of the study.

- To find differences in genetic epidemiology conform to differences in clinical epidemiology by gender.

3. METHODS AND PARTICIPANTS.

- METHODS.

This research was designed according an approach of case-control study through genetic association of selected candidate genes. The genotyping of the polymorphisms selected was performed by direct sequencing, TaqMan allelic discrimination assay, single strand conformation polymorphism analysis and fragment analysis.

- SUBJECTS.

A total of 1010 unrelated subjects were recruited in this study.

- Control sample.
 - Healthy controls: 316 (181 females, 135 males).
- Patients samples.
 - Patients with schizophrenia no consumers: 379 (151 females, 228 males)
 - Patients with psychosis and substance abuse: 124 (15 females, 109 males)
 - Patients with bipolar disorder: 120 (66 females, 54 males)
 - Patients with substance abuse: 71 (21 females, 50 males)

4. RESULTS AND CONCLUSIONS.

- This study has not found relationships between the polymorphism (AAT)_n into CNR1 gene and the studied pathologies. Neither association was found in rs6323 polymorphism (MAO-A) or rs1799836 polymorphism (MAO-B).

- This study has not found statistically significant differences for any of the polymorphisms studied in the population of patients with bipolar disorder.

- It has been found an association of the TT allele of rs35761398 polymorphism into CNR2 gene with schizophrenia and comorbid status of substance use disorder. This association indicates a dominant allelic action which represents a specific risk factor for this clinical situation. ($\chi^2 = 6,96$; $p = 0,0083$; OR = 1,96 [1,18 - 3,24] CI:95%)

- It has been found that the rs4680 polymorphism belonging to COMT gene has association with risk of schizophrenia. The association describes an evolutionary mechanism called intralocus sexual conflict (IASC) and, therefore, involves a process of balancing selection. Thus, we conclude that the AA genotype of this polymorphism is a protective genotype in female population ($\chi^2 = 8,61$; $p = 0,0034$; OR = 0,42 [0,24 - 0,76] CI:95%) while is a risk genotype in male population ($\chi^2 = 8,97$; $p = 0,0027$; OR=2,37 [1,33 - 4,22] CI:95%).

- In this work has been detected in female population a correlation between COMT gene polymorphism rs4680 and rs1468412 polymorphism of GRM3 gene, showing the relationship between the dopaminergic and glutamatergic system through epistasis interaction. This is defined, therefore, as a genotypic risk category for onset of schizophrenia in female population. This genotypic category is performed for carrying G allele in COMT and T allele in GRM3 ($G_{\text{carrier}} - T_{\text{carrier}}$) ($\chi^2 = 16,08$; $p = 0,0001$; OR=2,52 [1,60 - 3,97] CI:95%). Therefore, this is a duplicate recessive epistasis, where the AA genotype in rs1468412 polymorphism inhibits the risk associated with the genotype G_{carrier} -rs4680 in female population.

Bibliografía.

- Abi-Dargham A & Moore H. (2003) Prefrontal DA transmission at D1 receptors and the pathology of schizophrenia. *Neuroscientist*, 9(5):404-416.

- Agrawal A, Nurnberger JI, & Lynskey; Bipolar Genome Study. (2011) Cannabis involvement in individuals with bipolar disorder. *Psychiatry Res*, 185(3): 459–461.

- Álamo C, López-Muñoz F & Cuenca E. (1999) Fundamentos neurobiológicos del trastorno dual: hipótesis etiopatogénicas. En: *Avances en patología dual. Aspectos diagnósticos, clínicos, terapéuticos y asistenciales*. Madrid. Universidad de Alcalá, Servicio de publicaciones. 143-162.

- Aleman A, Kahn RS & Selten JP. (2003) Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from metaanalysis. *Archives of general psychiatry*, 60(6):565–571.

- Allan CL, Cardno AG, Rijsdijk FV, Kalidindi S, Farmer A, Murray RM & McGuffin P. (2009) Twin study of illness history variables in psychosis. *Schizophr Res*, 115(2-3):237-244.

- Allen AJ, Griss ME, Folley BS, Hawkins KA & Pearlson GD. (2009) Endophenotypes in schizophrenia: a selective review. *Schizophr Res*, 109(1-3): 24–37.

- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JPA, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE & Bertram L (2008) Systematic Meta-Analyses and Field Synopsis of Genetic Association Studies in Schizophrenia: The SzGene Database. *Nat Genet*, 40(7): 827-834.

- Almeida OP & Fenner S. (2002) Bipolar disorder: similarities and differences between patients with illness onset before and after 65 years of age. *Int Psychogeriatr*, 14(3):311-322.

- Alt A, Weiss B, Ogden AM, Knauss JL, Oler J, Ho K, Large TH & Bleakman D. (2004) Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology*, 46(6):793-806.

- Altman DG, Deeks JJ & Sackett DL. (1998) Odds ratios should be avoided when events are common. *BMJ* 317:1318.

- Altshuler LL, Bookheimer SY, Townsend J, Proenza MA, Eisenberger N, Sabb F, Mintz J & Cohen MS. (2005) Blunted activation in orbitofrontal cortex during mania: a functional magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*, 58(10):763-769.

- Amara SG & Kuhar MJ. (1993) Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci*, 16:73-93.

- Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Deary A, Falardeau P, Senogles SE & Caron MG. (1990) Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci*, 11(6):231-236.

- Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Bartlett J, Wright HH, Abramson RK, Cuccaro ML, Gilbert JR, Pericak-Vance MA & Haines JL. (2008) Examination of association to autism of common genetic variation in genes related to dopamine. *Autism Res*, 1(6): 364–369.

- Andersson H, D'antona AM, Kendall DA, von Heijne G & Chin CH. (2003) Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long n-terminal tail. *Mol. Pharmacol*, 64(3): 570–577.

- Andreasen NC, Paradiso S & O'Leary DS. (1998) "Cognitive dysmetria" as an integrative theory of schizophrenia: a dysfunction in cortical-subcortical-cerebellar circuitry. *Yale*, 24(2):203-218.

- Andreasen NC, Wilcox MA, Ho BC, Epping E, Ziebell S, Zeien E, Weiss B & Wassink T. (2012) Statistical epistasis and progressive brain change in schizophrenia: an approach for examining the relationships between multiple genes. *Mol. Psychiatry*, 17(11): 1093–1102.
- Andreasen NC. (2000) Schizophrenia: The fundamental questions. *Brain Research Reviews*, 31:106-112.
- Angrist B, Thompson H, Shopsin B, Gershon S. (1975) Clinical studies with dopamine-receptor stimulants. *Psychopharmacology*, 44(3):273-280.
- Angst J. (1995) Epidemiology of the bipolar spectrum. *Encephale*, 6:37-42.
- Angst J. (2002) Historical aspects of the dichotomy between manic-depressive disorders and schizophrenia. *Schizophr Res*, 57(1):5-13.
- Antochi R, Stavrakaki C & Emery PC. (2003) Psychopharmacological treatments in persons with dual diagnosis of psychiatric disorders and developmental disabilities. *Postgrad Med J*, 79(929):139-146.
- Antypa N, Giegling I, Calati R, Schneider B, Hartmann AM, Friedl M, Konte B, Lia L, De Ronchi D, Serretti A & Rujescu D. (2013) MAOA and MAOB polymorphisms and anger-related traits in suicidal participants and controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 263(5):393-403.
- Arendt M, Rosenberg R, Foldager L, Perto G & Munk-Jørgensen P. (2005) Cannabis-induced psychosis and subsequent schizophrenia-spectrum disorders: follow-up study of 535 incident cases. *British Journal Psychiatry*, 187:510-515.
- Arias F, Szerman N, Vega P, Mesias B, Basurte I, Morant C, Ochoa E, Poyo F & Babin F. (2013) Abuso o dependencia al cannabis y otros trastornos psiquiátricos. Estudio Madrid sobre prevalencia de patología dual. *Actas Esp Psiquiatr*, 41(2):122-129.
- Arias F. (2009) Prevalencia. En: Manejo Clínico del paciente con patología dual. Eds. Bobes J & Casas M. *Socidrogalcohol*.
- Ashcroft GW, Blackwood GW, Besson JA, Palomo T, Waring HL. (1981) Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry*, 138:268-269.
- Ashton CH & Moore PB. (2011) Endocannabinoid system dysfunction in mood and related disorders. *Acta Psychiatr Scand*, 124: 250–261.
- Ashton JC & Glass M. (2007) The Cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation dependent neurodegeneration. *Current Neuropharmacology*, 5: 73-80.
- Ates O, Demirturk F, Toprak M & Sezer S. (2013) Polymorphism of catechol-o-methyltransferase and uterine leiomyoma. *Mol Cell Biochem*, 375(1-2):179-183.
- Atwood BK & Mackie K. (2010) CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*, 160(3): 467–479.
- Ayala F. (1993). Estructura genética de las poblaciones. En: Dobzhansky T, Ayala F, Stebbins L & Valentine J. *Evolución*. Ediciones Omega.
- Ayalew M, Le-Niculescu H, Levey DF, Jain N, Changala B, Patel SD, Winiger E, Breier A, Shekhar A, Amdur R, Koller D, Nurnberger JI, Corvin A, Geyer M, Tsuang MT, Salomon D, Schork NJ, Fanous AH, O'Donovan, MC & Niculescu AB. (2012) Convergent functional genomics of schizophrenia: from comprehensive understanding to genetic risk prediction. *Molecular Psychiatry*, 17: 887 - 905.

- Ayuso-Mateos JL, Gutierrez-Recacha P, Haro JM & Chisholm D. (2006) Estimating the prevalence of schizophrenia in Spain using a disease model. *Schizophr Res*, 86(1-3):194-201.
- Bach AW, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan SW, Seeburg PH & Shih JC. (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Nat Acad Sci*, 85: 4934-4938.
- Baker D, Jackson SJ, & Pryce G. (2007) Cannabinoid control of neuroinflammation related to multiple sclerosis. *Br J Pharmacol*, 152(5): 649–654.
- Balu DT & Coyle JT (2011). Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(3): 848–870.
- Barrero FJ, Ampuero I, Morales B, Vives F, de Dios Luna del Castillo J, Hoenicka J. & García Yébenes J. (2005) Depression in Parkinson's disease is related to a genetic polymorphism of the cannabinoid receptor gene (CNR1). *The Pharmacogenomics Journal*, 5: 135 -141.
- Barrett JC & Cardon LR. (2006) Evaluating coverage of genome-wide association studies. *Nat Genet*, 38(6):659-662.
- Bassett AS, Chow EW, AbdelMalik P, Gheorghiu M, Husted J & Weksberg R. (2003) The schizophrenia phenotype in 22q11 deletion syndrome. *Am J Psychiatry*, 160(9):1580 - 1586.
- Bassett AS, Marshall CR, Lionel AC, Chow EW & Scherer SW. (2008) Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome. *Human Molecular Genetics*, 17(24): 4045 - 4053.
- Batel P. (2000) Addiction and schizophrenia. *Eur Psychiatry*, 15(2):115-122.
- Bauer M & Pfennig A. (2005) Epidemiology of bipolar disorders. *Epilepsia*, 46(4):8-13.
- Bauer MS, Simon GE, Ludman E & Unützer J. (2005) 'Bipolarity' in bipolar disorder: distribution of manic and depressive symptoms in a treated population. *Br J Psychiatry*, 187:87-88.
- Baum AE, Hamshere M, Green E, Cichon S, Rietschel M, Noethen MM, Craddock N & McMahon FJ. (2008) Meta-analysis of two genome-wide association studies of bipolar disorder reveals important points of agreement. *Mol Psychiatry*, 13(5):466-467.
- Bearden CE, Soares JC, Klunder AD, Nicoletti M, Dierschke N, Hayashi KM, Narr KL, Brambilla P, Sassi RB, Axelson D, Ryan N, Birmaher B & Thompson PM. (2008) Three-dimensional mapping of hippocampal anatomy in adolescents with bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 47(5):515-525.
- Bearden CE, Glahn DC, Lee AD, Chiang MC, van Erp TG, Cannon TD, Reiss AL, Toga AW & Thompson PM. (2008) Neural phenotypes of common and rare genetic variants. *Biol Psychol*, 79(1):43-57.
- Bendel O, Meijer B, Hurd Y & von Euler G. (2005) Cloning and expression of the human NMDA receptor subunit NR3B in the adult human hippocampus. *Neurosci Lett*, 377(1):31-36.
- Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo A & Romero J. (2008) Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol*, 153(2): 277–285.
- Benyamina A, Kebir O, Blecha L, Reynaud M & Krebs MO. (2011) CNR1 gene polymorphisms in addictive disorders: a systematic review and a meta-analysis. *Addict Biol*, 16(1):1-6.
- Bergles DE, Diamond JS & Jahr CE. (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol*, 9(3):293-298.

- Bertelsen A, Harvald B & Hauge MA. (1977) Danish twin study of manic-depressive disorders. *Br J Psychiatry*, 130:330-351.
- Beuten J, Payne TJ, Ma JZ & Li MD. (2006) Significant association of catechol-O-methyltransferase (COMT) haplotypes with nicotine dependence in male and female smokers of two ethnic populations. *Neuropsychopharmacology*, 31(3):675-84.
- Bishop JR, Miller D, Ellingrod VL & Holmanet T. (2011) Association between type-three metabotropic glutamate receptor gene (GRM3) variants and symptom presentation in treatment refractory schizophrenia. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*, 26 (1): 28–34.
- Biswal B, Yetkin FZ, Haughton VM & Hyde JS. (1995) Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med*, 34(4):537-541.
- Bjarnadottir TK, Fredriksson R & Schiøth HB. (2005) The gene repertoire and the common evolutionary history of glutamate, pheromone (V2R), taste (1) and other related G protein-coupled receptors. *Gene*, 362: 70-84.
- 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.
- Bland JM, Altman DG. (2000) Statistics notes. The odds ratio. *BMJ*, 320(7247):1468.
- Bonduriansky R & Chenoweth SF. (2000) Intralocus sexual conflict. *Trends Ecol Evol*, 24(5):280-288.
- Boos HB, Aleman A, Cahn W, Hulshoff Pol H & Kahn RS. (2007) Brain volumes in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*, 64(3):297-304.
- Boos HB, Cahn W, van Haren NE, Derks EM, Brouwer RM, Schnack HG, Hulshoff Pol HE & Kahn RS. (2012) Focal and global brain measurements in siblings of patients with schizophrenia. *Schizophr Bull*, 38(4):814-825.
- Botts SR & Raskind J. (1999) Gabapentin and lamotrigine in bipolar disorder. *Am J Health Syst Pharm*, 56(19):1939-1944.
- Brady KT & Sinha R. (2005) Co-occurring mental and substance use disorders: the neurobiological effects of chronic stress. *Am J Psychiatry*, 162(8):1483-1493.
- Braff DL, Greenwood TA, Swerdlow NR, Light GA & Schork NJ. (2008) Advances in endophenotyping schizophrenia. *World Psychiatry*, 7:11-18.
- Bremner JD, Vythilingam M, Vermetten E, Nazeer A, Adil J, Khan S, Staib LH & Charney DS. (2002) Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. *Biol Psychiatry*, 51(4):273-279.
- Broman J, Hassel B, Rinvik E & Ottersen OP. (2000) Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. En: Ottersen O P, Storm-Mathisen Jon. *Glutamate*. Eds. Ottersen OP & Storm-Mathisen J. Amsterdam: Elsevier.
- Brüne M. (2004) Schizophrenia-an evolutionary enigma?. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(1):41-53.
- Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH & van Oost BA. (1993) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*, 262(5133):578-580.

- Bundy H, Stahl D & MacCabe JH. (2011) A systematic review and meta-analysis of the fertility of patients with schizophrenia and their unaffected relatives. *Acta Psychiatr Scand*, 123(2):98-106.
- Byars SG, Ewbank D, Govindaraju DR & Stearns SC. (2010) Colloquium papers: Natural selection in a contemporary human population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(1):1787-1792.
- Byne W, Buchsbaum MS, Kemether E, Hazlett EA, Shinwari A, Mitropoulou V & Siever LJ. (2001) Magnetic resonance imaging of the thalamic mediodorsal nucleus and pulvinar in schizophrenia and schizotypal personality disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 58(2):133-140.
- Cadenhead KS, Swerdlow NR, Shafer KM, Diaz M & Braff DL. (2000) Modulation of the startle response and startle laterality in relatives of schizophrenic patients and in subjects with schizotypal personality disorder: evidence of inhibitory deficits. *Am J Psychiatry*, 157(10):1660-1668.
- Camarena B, Fresán A, Aguilar A, Escamilla R, Saracco R, Palacios J, Tovilla A & Nicolini H. (2012) Monoamine oxidase A and B gene polymorphisms and negative and positive symptoms in schizophrenia. *ISRN Psychiatry*, 2012:852949.
- 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(1):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(4):539-545.
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C & Cabral GA. (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol*, 2(1):69-82.
- Carlsson A & Lindqvist M. (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 20:140-144.
- Casey DE. (1991) Neuroleptic drug-induced extrapyramidal syndromes and tardive dyskinesia. *Schizophr Res*, 4(2):109-120.
- Caspi A & Moffitt TE. (2006) Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 7(7):583-590.
- Chakos MH, Mayerhoff DI, Loebel AD, Alvir JM & Lieberman JA. (1992) Incidence and correlates of acute extrapyramidal symptoms in first episode of schizophrenia. *Psychopharmacol Bull*, 28(1):81-86.
- Chambers RA, Krystal JH & Self DW. (2001) A neurobiological basis for substance abuse comorbidity in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 50(2):71-83.
- Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, Hirschhorn JN, Abecasis G, Altshuler D, Bailey-Wilson JE, Brooks LD, Cardon LR, Daly M, Donnelly P, Fraumeni JF Jr, Freimer NB, Gerhard DS, Gunter C, Guttmacher AE, Guyer MS, Harris EL, Hoh J, Hoover R, Kong CA, Merikangas KR, Morton CC, Palmer LJ, Phimister EG, Rice JP, Roberts J, Rotimi C, Tucker MA, Vogan KJ, Wacholder S, Wijsman EM, Winn DM & Collins FS. (2007) Replicating genotype-phenotype associations. *Nature*, 447: 655-660.
- Chavarría-Siles I, Contreras-Rojas J, Hare E, Walss-Bass C, Quezada P, Dassori A, Contreras S, Medina R, Ramírez M, Salazar R, Raventos H & Escamilla MA. (2008) Cannabinoid receptor 1 gene (CNR1) and susceptibility to a quantitative phenotype for hebephrenic schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147(3):279-84.

- Chen G, Greengard P & Yan Z. (2004) Potentiation of NMDA receptor currents by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(8):2596–2600.
- Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE & Weinberger DR. (2004) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet*, 75: 807–821.
- Chen Q, He G, Chen Q, Wu S, Xu Y, Feng G, Li Y, Wang L & He L. (2005) A case-control study of the relationship between the metabotropic glutamate receptor 3 gene and schizophrenia in the Chinese population. *Schizophr Res*, 73(1):21-26.
- Chen X, Williamson VS, An SS, Hetttema JM, Aggen SH, Neale MC & Kendler KS. (2008) Cannabinoid receptor 1 gene association with nicotine dependence. *Arch Gen Psychiatry*, 65(7):816-824.
- Chen ZY, Powell JF, Hsu YP, Breakefield XO & Craig IW. (1992) Organization of the human monoamine oxidase genes and long-range physical mapping around them. *Genomics*, 14:75-82.
- Chengappa KN, Gershon S, Levine J. (2001) The evolving role of topiramate among other mood stabilizers in the management of bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 3(5):215-232.
- Chepenik LG, Raffo M, Hampson M, Lacadie Ch, Wang F, Jones MM, Pittman B, Skudlarski P & Blumberg HP. (2010) Functional connectivity between ventral prefrontal cortex and amygdala at low frequency in the resting state in bipolar disorder. *Psychiatry Res*, 182(3): 207–210.
- Chepenik LG, Wang F, Spencer L, Spann M, Kalmar JH, Womer F, Edmiston E, Pittman B & Blumberg HP. (2012) Structure-Function Associations in Hippocampus in Bipolar Disorder. *Biol Psychol*, 90(1): 18–22.
- Chiang KP, Gerber AL, Sipe JC & Cravatt BF. (2004) Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. *Hum Mol Genet*, 13(18):2113-2119.
- Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S & Gertsch J. (2012) Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem*, 287(41):34660-34682.
- Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG & Chuang DM. (2013) Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev*, 65(1):105-142.
- Christenson JG, Dairman W & Udenfriend S. (1972) On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase (immunological titration-aromatic L-amino acid decarboxylase-serotonin-dopamine-norepinephrine). *Proc Nat Acad Sci*, 69:343-347.
- Ciompi L. (1980) Catamnestic long-term study on the course of life and aging of schizophrenics. *Schizophr Bull*, 6(4):606-618.
- Cipriani A, Barbui C, Butler R, Hatcher S & Geddes J. (2011) Depression in adults: drug and physical treatments. *Clin Evid (Online)*. pii: 1003.
- Cirulli ET & Goldstein DB. (2010) Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*, 11(6):415-425.
- Clark KA & Collingridge GL. (1996) Evidence that presynaptic changes are involved in the expression of LTP and LTD of NMDA receptor-mediated EPSCs in area CA1 of the hippocampus. *J Physiol Paris*, 90(5-6):311.

- Clarke T, Bloch PJ, Ambrose-Lanci LM, Doyle GA, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Dackis CA, Pettinati HM, O'Brien CP, Oslin DW & Lohoff FW. (2013) Further evidence for association between genetic variants in the cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene and cocaine dependence: confirmation in an independent sample and meta-analysis. *Addict Biol*, 18(4): 702–708.
- Colhoun HM, McKeigue PM & Davey Smith G. (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*, 361(9360):865-872.
- Comings DE, Muhleman D, Gade R, Johnson P, Verde R, Saucier G & MacMurray J. (1997) Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use. *Mol Psychiatry*, 2(2): 161-168.
- Compton WM, Thomas YF, Stinson FS & Grant BF. (2007) Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry*, 64(5):566-576.
- Conn PJ & Jones CK. (2009) Promise of mGluR2/3 activators in psychiatry. *Neuropsychopharmacology*, 34(1):248-249.
- Conn PJ & Pin JP. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37:205-237.
- Cooper JR, Bloom FE & Roth RH. (1996) *The biochemical basis of neuropharmacology*. 7th. Ed. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Cornish JL, Duffy P & Kalivas PW. (1999) A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience*, 93(4):1359-1367.
- Costas J, Sanjuán J, Ramos-Ríos R, Paz E, Agra S, Ivorra JL, Páramo M, Brenlla J & Arrojo M. (2011) Heterozygosity at catechol-O-methyltransferase Val158Met and schizophrenia: new data and meta-analysis. *J Psychiatr Res*, 45(1):7-14.
- Costas J, Sanjuán J, Ramos-Ríos R, Paz E, Agra S, Tolosa A, Páramo M, Brenlla J & Arrojo M. (2011b) Interaction between COMT haplotypes and cannabis in schizophrenia: A case-only study in two samples from Spain. *Schizophrenia Research*, 127: 22–27.
- Cousins DA, Butts K & Young AH. (2009) The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 11(8):787-806.
- Craddock N, O'Donovan MC & Owen MJ. (2009) Psychosis genetics: modeling the relationship between schizophrenia, bipolar disorder, and mixed (or "schizoaffective") psychoses. *Schizophr Bull*, 35(3):482-490.
- Craddock N, Owen MJ & O'Donovan MC. (2006) The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Molecular Psychiatry*, 11: 446–458.
- Craddock N, Owen MJ. (2010) The Kraepelinian dichotomy - going, going... but still not gone. *Br J Psychiatry*, 196(2):92-5.
- Cravatt BF & Lichtman AH. (2002) The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. *Chem Phys Lipids*, 121(1-2):135-48.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR & Lichtman AH. (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(16):9371-9376.

- Creese I, Burt DR & Snyder SH. (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*, 192(4238):481-483.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V & Di Marzo V. (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139(4):1405-15.
- Crow JF & Dove WF. (1999) Hardy, Weinberg and Language Impediments. *Anecdotal, Historical and Critical Commentaries on Genetics*. *Genetics*, 152: 821–825.
- Crow TJ. (1995) A theory of the evolutionary origins of psychosis. *Eur Neuropsychopharmacol*, 5:59-63.
- Crow TJ. (2008) The 'big bang' theory of the origin of psychosis and the faculty of language. *Schizophr Res*, 102(1-3):31-52.
- Cuevas-Esteban J, Campayo A, Gutiérrez-Galve L, Gracia-García P & López-Antón R. (2011) Fundamentos y hallazgos de la neuroimagen en la esquizofrenia: una actualización. *Rev. Neurol*. 52 (1): 27-36.
- Cummings JL. (1995) Anatomic and behavioral aspects of frontal-subcortical circuits. *Ann N Y Acad Sci*, 769:1-13.
- D'Souza DC, Perry E, MacDougall L, Ammerman Y, Cooper T, Wu YT, Braley G, Georgieva R & Krystal JH. (2004) The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropharmacology*, 29:1558-1572.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH. (1989) The dopamine D(2) receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J*, 8: 4025-4034.
- Dalton VS, Long LE, Weickert CS & Zavitsanou K. (2011) Paranoid schizophrenia is characterized by increased CB1 receptor binding in the dorsolateral prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 36(8):1620-1630.
- Das M, Das Bhowmik A, Bhaduri N, Sarkar K, Ghosh P, Sinha S, Ray A, Chatterjee A & Mukhopadhyay K. (2011) Role of gene-gene/gene-environment interaction in the etiology of eastern Indian ADHD probands. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(2):577-587.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G & Davidson M. (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*, 148(11):1474-1486.
- Dawkins K, Rudorfer MV & Potter WZ. (1993) Comments on gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Am J Psychiatry*, 150(4):678-679.
- de Bartolomeis A, Buonaguro EF, Iasevoli F & Tomasetti C. (2014) The emerging role of dopamine-glutamate interaction and of the postsynaptic density in bipolar disorder pathophysiology: Implications for treatment. *J Psychopharmacol*, doi: 10.1177/0269881114523864
- De Dios C, Ezquiaga E, Garcia A, Soler B & Vieta E. (2010) Time spent with symptoms in a cohort of bipolar disorder outpatients in Spain: a prospective, 18-month follow-up study. *J Affect Disord*, 125(1-3):74-81.
- de Jong JJ, de Gelder B & Hodiament PP. (2013) Sensory processing, neurocognition, and social cognition in schizophrenia: towards a cohesive cognitive model. *Schizophr Res*, 146(1-3):209-216.

- De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F & Di Marzo V (2003) Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis*, 2:5.
- de Sousa RT, van de Bilt MT, Diniz BS, Ladeira RB, Portela LV, Souza DO, Forlenza OV, Gattaz WF & Machado-Vieira R. (2011) Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. *Neurosci Lett*, 494(1):54-56.
- Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E & Copolov D. (2001) Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience*, 103(1):9-15.
- Di Chiara G & Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(14):5274-8.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T & De Petrocellis L. (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*, 21(12):521-8.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S & Piomelli D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Nat Acad Sci*, 99: 10819-10824.
- Dixon L, Haas G, Weiden P, Sweeney J & Frances A. (1990) Acute effects of drug abuse in schizophrenic patients: clinical observations and patients' self-reports. *Schizophr Bull*, 16(1):69-79.
- Dixon RA, Sigal IS, Rands E, Register RB, Candelore MR, Blake AD & Strader CD. (1987) Ligand binding to the beta-adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature*, 326(6108):73-77.
- Dluzen D & Horstink M. (2003) Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine*, 21(1):67-75.
- Dluzen DE & McDermott JL. (2008) Sex differences in dopamine - and vesicular monoamine-transporter functions. *Ann N Y Acad Sci*, 1139:140-150.
- Dluzen DE & Ramirez VD. (1989) Effects of orchidectomy on nigro-striatal dopaminergic function: behavioral and physiological evidence. *J Neuroendocrinol*, 1(4):285-290.
- Dluzen DE. (2000) Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurocytol*, 29(5-6):387-399.
- Dobzhansky T. (1977) Selección Natural. En: Dobzhansky T, Ayala F, Stebbins L & Valentine J. *Evolución*. Ediciones Omega. 1993.
- Doi N, Hoshi Y, Itokawa M, Usui C, Yoshikawa T & Tachikawa H. (2009) Persistence criteria for susceptibility genes for schizophrenia: a discussion from an evolutionary viewpoint. *PLoS One*, 4(11):e7799.
- Domschke K, Baune BT, Havlik L, Stuhmann A, Suslow T, Kugel H, Zwanzger P, Grotegerd D, Sehlmeier C, Arolt V & Dannlowski U. (2012) Catechol-O-methyltransferase gene variation: impact on amygdala response to aversive stimuli. *NeuroImage*, 60: 2222-2229.
- Drapalski A, Bennett M & Bellack A. (2011) Gender Differences in Substance Use, Consequences, Motivation to Change, and Treatment Seeking in People With Serious Mental Illness. *Subst Use Misuse*, 46(6): 808-818.
- Dremencov E, Gispan-Herman I, Rosenstein M, Mendelman A, Overstreet DH, Zohar J &

Yadid G. (2004) The serotonin-dopamine interaction is critical for fast-onset action of antidepressant treatment: in vivo studies in an animal model of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(1):141-147.

- DSM-IV-TR, Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Texto revisado. American Psychiatric Association. Harcourt Brace De España, 2002.

- D'Souza DC, Abi-Saab WM, Madonick S, Forselius-Bielen K, Doersch A, Braley G, Gueorguieva R, Cooper TB & Krystal JH. (2005) Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. *Biol Psychiatry*, 57: 594-608.

- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B & Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell*, 130(6): 1146-1158.

- Dudbridge F & Gusnanto A. (2008) Estimation of significance thresholds for genomewide association scans. *Genet Epidemiol*, 32(3):227-34.

- Dunham I, Collins J, Wade R & Scambler P. (1992) Possible role for COMT in psychosis associated with velo-cardio-facial syndrome. *Lancet*, 340(8831):1361-2.

- Eastwood SL & Harrison PJ. (2010) Markers of glutamate synaptic transmission and Plasticity are increased in the anterior cingulate cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, 67(11): 1010–1016.

- Egan MF & Weinberger DR. (1997) Neurobiology of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol*, 7(5):701-707.

- Egan MF, Straub RE, Goldberg TE, Yakub I, Callicott JH, Hariri AR, Mattay VS, Bertolino A, Hyde TM, Weickert CS, Akil M, Crook J, Vakkalanka RK, Balkissoon R, Gibbs RA, Kleinman JE & Weinberger DR. (2004) Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(34) 12604–12609.

- Egertová M, Giang DK, Cravatt BF & Elphick MR. (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*, 265(1410):2081-2085.

- Eggen SM, Hashimoto T & Lewis DA. (2008) Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 65(7): 772–784.

- Eggen SM, Hashimoto T & Lewis DA. (2008) Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 65(7):772-784.

- Eggers AE. (2013) A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Med Hypotheses*, 80(6):791-794.

- Ehringer H & Hornykiewicz O. (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr*, 38:1236-1239.

- Elston RC. (2009) Introduction and overview. *Statistical methods in genetic epidemiology*. *Statistical Methods Medical Reserch*, 9: 527-541.

- Erecińska M & Silver IA. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 35(4):245-296.

- Everitt BJ & Robbins TW. (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*, 8(11):1481-1489.
- Evers LJ, De Die-Smulders CE, Smeets EE, Clerkx MG & Curfs LM. (2009) The velo-cardio-facial syndrome: the spectrum of psychiatric problems and cognitive deterioration at adult age. *Genetic Counseling*, 20(4): 307-315.
- Extein IL & Gold MS. (1993) Hypothesized neurochemical models for psychiatric syndromes in alcohol and drug dependence. *J Addict Dis*, 12(3):29-43.
- Falconer & Mackay (1996). *Introducción a la genética cuantitativa*. 4ª Edición. Ed. Addison Wesley Longman. Editorial Acribia (2006).
- Falk CT & Rubinstein P. (1980) The effect of association of genetic factors on relative risk. *Ann Hum Genet*, 43(3):295-301.
- Falk CT & Rubinstein P. (1987) Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet*, 51(3):227-233.
- Falkai P, Wobrock T, Lieberman J, Glenthøj B, Gattaz WF & Möller HJ. (2005) Task Force on Treatment Guidelines for Schizophrenia. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of schizophrenia, Part 1: acute treatment of schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*, 6(3):132-191.
- Falkai P, Wobrock T, Lieberman J, Glenthøj B, Gattaz WF & Möller HJ. (2006) Task Force on Treatment Guidelines for Schizophrenia. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of schizophrenia, part 2: long-term treatment of schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*, 7(1):5-40.
- Fatemi HS & Folsom TD. (2009) The Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia Bulletin*, 35 (3):528–548.
- Feldman DJ, Frank RA, Kehne JH, Flannery R, Brown D, Soni S, Byrd G & Shah S. (1997) Mixed D2/5-HT2 antagonism differentially affects apomorphine- and amphetamine-induced stereotyped behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, 58(2):565-572.
- Fernández-de-las-Peñas C, Ambite-Quesada S, Gil-Crujera A, Cigarán-Méndez M & Peñacoba-Puente C. (2012) Catechol-O-Methyltransferase Val158Met polymorphism influences anxiety, depression, and disability, but not pressure pain sensitivity, in women with fibromyalgia syndrome. *The Journal of Pain*, 13(11):1068-1074.
- Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Núñez L, Ellenbroek BA & Rodriguez de Fonseca F. (2009). Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 206(4):531-549.
- Fernández-Espejo, E. (2006) Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Rev Neurol*, 43(3):147-154.
- Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML & Ramos JA. (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends in Neuroscience*, 23(1):14-20.
- Fernández-Ruiz J, Gómez M, Hernández M, de Miguel R & Ramos JA. (2004) Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res*, 6(5):389-401.
- Ferrer B, Gorriti MA, Palomino A, Gornemann I, de Diego Y, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Fernandez-Espejo E, Moratalla R, Navarro M & Rodríguez de Fonseca F. (2007) Cannabinoid CB1 receptor antagonism markedly increases dopamine receptor-mediated stereotypies. *Eur J Pharmacol*, 559(2-3):180-183.
- FK Goodwin & KR Jamison. (2007) *Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorders and*

Recurrent Depression. New York, Oxford University Press.

- Flanagan JM, Gerber AL, Cadet JL, Beutler E & Sipe JC. (2006) The fatty acid amide hydrolase 385 A/A (P129T) variant: haplotype analysis of an ancient missense mutation and validation of risk for drug addiction. *Hum Genet*, 120(4):581-8.
- Francis PT. (2003) Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 18(1):15-21.
- Frazier JA, Ahn MS, DeJong S, Bent EK, Breeze JL & Giuliano AJ. (2005) Magnetic resonance imaging studies in early-onset bipolar disorder: a critical review. *Harv Rev Psychiatry*, 13(3):125-140.
- French ED, Pilapil C & Quirion R. (1985) Phencyclidine binding sites in the nucleus accumbens and phencyclidine-induced hyperactivity are decreased following lesions of the mesolimbic dopamine system. *Eur J Pharmacol*, 116(1-2):1-9.
- Frith C & Dolan RJ. (1998) Images of psychopathology. *Curr Opin Neurobiol*, 8(2):259-262.
- Frye MA, Ha K, Kanba S, Kato T, McElroy SL, Özerdem A, Vázquez G & Vieta E. (2011) International consensus group on depression prevention in bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*, 72(10):1295-310.
- Fujii Y, Shibata H, Kikuta R, Makino C, Tani A, Hirata N, Shibata A, Ninomiya H, Tashiro N & Fukumaki Y. (2003) Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 13(2):71-76.
- Gambaro G, Anglani F & D'Angelo A. (2000) Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet*, 355(9200):308-311.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G & Casellas P. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*, 232:54-61.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J & Guzmán M. (2009) Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des*, 14(23):2279-2288.
- Galve-Roperh I, Palazuelos J, Aguado T & Guzmán M. (2009) The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 259(7):371-382.
- Galve-Roperh I, Chiurchiù V, Díaz-Alonso J, Bari M, Guzmán M & Maccarrone M. (2013) Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Prog Lipid Res*, 52(4):633-650.
- Gao X, Scott WK, Wang G, Mayhew G, Li YJ, Vance JM & Martin ER. (2008) Gene-gene interaction between FGF20 and MAOB in Parkinson disease. *Ann Hum Genet*, 72(2):157-62.
- Garcíá-Martí G, Martí-Bonmatí L, Aguilar EJ, Sanz-Requena R, Alberich-Bayarri Á, Bonmatí A, Sanjuán J. (2013) Neuroimagen funcional en el estudio de las conductas agresivas en pacientes con esquizofrenia. *Rev Neurol*, 56(4):193-199.
- Geddes JR & Miklowitz DJ. (2013) Treatment of bipolar disorder. *Lancet*, 381(9878):1672-1682.
- Gerard CM, Mollereau C, Vassart G & Parmentier M. (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*, 279:129-134.
- Gereau RW & Conn PJ. (1995) Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors

- modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J Neurosci*, 15(10):6879-6889.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL & Swerdlow NR. (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)*, 156(2-3):117-154.
 - Geyer MA, Swerdlow NR, Mansbach RS & Braff DL. (1990) Startle response models of sensorimotor gating and habituation deficits in schizophrenia. *Brain Res Bull*, 25(3):485-498.
 - Giang DK & Cravatt BF. (1997) Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Nat Acad Sci*, 94: 2238-2242.
 - Gigante AD, Bond DJ, Lafer B, Lam RW, Young LT & Yatham LN. (2012) Brain glutamate levels measured by magnetic resonance spectroscopy in patients with bipolar disorder: a meta-analysis. *Bipolar Disord*, 14(5):478-487.
 - Gijsman HJ, Geddes JR, Rendell JM, Nolen WA & Goodwin GM. (2004) Antidepressants for bipolar depression: a systematic review of randomized, controlled trials. *Am J Psychiatry*, 161(9):1537-1547.
 - Giros B, El Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T & Caron MG. (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Molec Pharm*, 42: 383-390.
 - Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Klosterkötter J & Piomelli D. (2004) Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology*, 29(11): 2108-2114.
 - Glass M, Brotchie JM & Maneuf YP. (1997) Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *Eur J Neurosci*, 9(2):199-203.
 - Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PM, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garris M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, Game RM, Rudd DS, Zurawiecki D, McDougale CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Kolevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T, McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JI, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SF, Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD & Hakonarson H. (2009) Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, 459(7246):569-573.
 - Goff DC & Coyle JT. (2001) The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 158(9):1367-1377.
 - Goldner EM, Hsu L, Waraich P & Somers JM. (2002) Prevalence and incidence studies of schizophrenic disorders: a systematic review of the literature. *Can J Psychiatry*, 47(9): 833-843.
 - Gonzalez-Iglesias AE, Murano T, Li S, Tomić M & Stojilkovic SS. (2008) Dopamine inhibits basal prolactin release in pituitary lactotrophs through pertussis toxin-sensitive and -insensitive signaling pathways. *Endocrinology*, 149(4):1470-1479.
 - Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H & Yamamoto S. (1998) Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*, 422(1):69-73.
 - Gorelick DA & Wilkins JN. (1989) Inpatient treatment of PCP abusers and users. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 15(1):1-12.

- Goswami S, Mattoo SK, Basu D & Singh G. (2004) Substance-abusing schizophrenics: do they self-medicate?. *Am J Addict*, 13(2):139-50.
- 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(10):867-72.
- Gottesman II & Wolfgram, DL. (1991) *Schizophrenia: the Origins of Madness*. New York. Ed. Freeman and Company.
- Gottesman II & Shields J. (1982) *Schizophrenia: The epigenetic puzzle*. Cambridge, England. Cambridge University Press.
- Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA & Manji HK. (2004) Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol Psychiatry*, 9(8):734-55.
- Grace AA, Bunney BS, Moore H & Todd CL. (1997) Dopamine-cell depolarization block as a model for the therapeutic actions of antipsychotic drugs. *Trends Neurosci*, 20(1):31-7.
- Grace AA. (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*, 41(1):1-24.
- Green MF. (1996) What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia?. *Am J Psychiatry*, 153(3):321-330.
- Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. (2000) *Genética*. Ed. McGraw Hill.
- Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC. (1991) Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Nat Acad Sci USA*, 88: 3637-3641.
- Guidali C, Viganò D, Petrosino S, Zamberletti E, Realini N, Binelli G, Rubino T, Di Marzo V & Parolaro D. (2011) Cannabinoid CB1 receptor antagonism prevents neurochemical and behavioural deficits induced by chronic phencyclidine. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14(1):17-28.
- Guldberg HC & Marsden CA. (1975) Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol Rev*, 27(2):135-206.
- Gupta M, Bhatnagar P, Grover S, Kaur H, Baghel R, Bhasin Y, Chauhan C, Verma B, Manduva V, Mukherjee O, Purushottam M, Sharma A, Jain S, Brahmachari SK & Kukreti R. (2009) Association studies of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene with schizophrenia and response to antipsychotic treatment. *Pharmacogenomics*, 10(3):385-397.
- Häfner H, Löffler W, Maurer K, Hambrecht M & an der Heiden W. (1999) Depression, negative symptoms, social stagnation and social decline in the early course of schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*, 100(2):105-118.
- Häfner H, Riecher A, Maurer K, Fätkenheuer B, Löffler W, an der Heiden W, Munk-Jørgensen P & Strömgen E. (1991) Sex differences in schizophrenic diseases. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 59(9):343-60.
- Häfner H. (2003) Gender differences in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 2:17-54.
- Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA & Mackie K. (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacology Science*, 28:83-92.

- Harris EC & Barraclough B. (1997) Suicide as an outcome for mental disorders. A meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 170:205–28.
- Harrison PJ. (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122(4):593-624.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. (1991): Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41: 89–125.
- Hendrickson LM, Guildford MJ & Tapper AR. (2013) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Front Psychiatry*, 4:29.
- Henson MA, Roberts AC, Salimi K, Vadlamudi S, Hamer RM, Gilmore JH, Jarskog LF & Philpot BD. (2008) Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 18(11):2560-2573.
- Hillard CJ, Weinlander KM & Stuhr KL. (2012) Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. *Neuroscience*. 204: 207–229.
- Hirschhorn JN & Daly MJ. (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*, 6(2):95-108.
- Hoenicka J, Garrido E, Martínez I, Ponce G, Aragüés M, Rodríguez-Jiménez R, España-Serrano L, Alvira-Botero X, Santos JL, Rubio G, Jiménez-Arriero MA & Palomo T. PARGPARG. (2010) Gender-specific COMT Val158Met polymorphism association in Spanish schizophrenic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B(1):79-85.
- Hoftman GD, Volk DW, Bazmi HH, Li S, Sampson AR & Lewis DA. (2013) Altered Cortical Expression of GABA-Related Genes in Schizophrenia: Illness Progression vs Developmental Disturbance. *Schizophr Bull*, 2013 Dec 22 [Epub ahead of print]
- Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E & Svoboda K. (2006) Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* 441(7096):979-983.
- Hotamisligil GS & Breakefield XO. (1991) Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet*, 49: 383-392.
- Howes OD & Kapur S. (2009) The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - The final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3):549–562.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R & Pertwee RG. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54(2):161-202.
- Hubert GW, Paquet M & Smith Y. (2001) Differential subcellular localization of mGluR1a and mGluR5 in the rat and monkey substantia nigra. *J Neurosci*, 21(6):1838-1847.
- Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM & Kimchi-Sarfaty C. (2009) Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?. *Methods Mol Biol*, 578:23-39.
- Ikeda M, Levitt M & Udenfriend S. (1967) Phenylalanine as substrate and inhibitor of tyrosine hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*, 120(2):420-427.
- Imperato A & Di Chiara G. (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, 239(1):219-228.
- Ira E, Zanoni M, Ruggeri M, Dazzan P & Tosato S. (2013) COMT, neuropsychological

function and brain structure in schizophrenia: a systematic review and neurobiological interpretation. *J Psychiatry Neurosci*, 38(6):366-380.

- Ishiguro H, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Imai K, Suzuki Y, Morikawa M, Inada T, Watanabe Y, Takahashi M, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Onaivi ES, Kunugi H, Sasaki T, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Naka I, Ohashi J, Kakita A, Takahashi H, Nawa H & Arinami T. (2009) Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 9: 24-33.

- Ishiguro H, Iwasaki S, Teasenfitz L, Higuchi S, Horiuchi Y, Saito T, Arinami T & Onaivi ES. (2007) Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J*, 7(6):380-385.

- Ison JR & Hoffman HS. (1983) Reflex modification in the domain of startle: II. The anomalous history of a robust and ubiquitous phenomenon. *Psychol Bull*, 94(1):3-17.

- Ito R, Robbins TW & Everitt BJ. (2004) Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci*, 7(4):389-97.

- Itzhak Y & Martin JL. (2000) Cocaine-induced kindling is associated with elevated NMDA receptor binding in discrete mouse brain regions. *Neuropharmacology*, 39(1):32-39.

- Iversen L. (2003) Cannabis and the brain. *Brain*, 126(6):1252-1270.

- Jaber M, Robinson SW, Missale C & Caron MG. (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35(11):1503-19.

- Jablensky A. (2010) The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(3): 271-287.

- Jackson DM & Westlind-Danielsson A. (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther*, 64(2):291-370.

- Jansson LB & Parnas J. (2007) Competing definitions of schizophrenia: what can be learned from polydiagnostic studies?. *Schizophrenia Bulletin*, 33(5):1178–1200.

- Javitt DC & Zukin SR. (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 48(10):1301-1308.

- Javitt DC. (2007) Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol*, 78:69-108.

- Jazbec S, Pantelis C, Robbins T, Weickert T, Weinberger DR & Goldberg TE. (2007) Intra-dimensional/extra-dimensional set-shifting performance in schizophrenia: impact of distractors. *Schizophr Res*, 89(1-3):339-349.

- Jentsch JD & Roth RH. (1999) The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20(3):201-225.

- Johnson ML, Day AE, Ho CC, Walker QD, Francis R & Kuhn CM. (2010) Androgen decreases dopamine neurone survival in rat midbrain. *J Neuroendocrinol* 22(4):238-247.

- Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM & Caron MG. (1998) Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci*, 18(6):1979-1986.

- Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Leon AC, Solomon DA, Coryell W, Maser JD, Keller MB. (2005) Psychosocial disability in the course of bipolar I and II disorders: a prospective, comparative, longitudinal study. *Arch Gen Psychiatry*, 62(12):1322-1330.

- Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon DA, Leon AC, Rice JA & Keller MB. (2002) The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 59(6):530-537.
- Justinova Z, Panlilio LV & Goldberg SR. (2009) Drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci*, 1:309-346.
- Kaalund SS, Newburn EN, Ye T, Tao R, Li C, Deep-Soboslay A, Herman MM, Hyde TM, Weinberger DR, Lipska BK & Kleinman JE. (2013) Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain. *Mol Psychiatry*, doi:10.1038/mp.2013.165.
- Kaczocha M, Glaser ST & Deutsch DG. (2009) Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(15):6375-6380.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K & Sawa A. (2005) A schizophrenia associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nature Cell Biology*, 7: 1167-1178.
- Kandel ER, Schwartz JH & Jessel TM. (2000) Principles of neural science. 4^a Ed. New York: Apleton and Ange.
- Karayiorgou M, Altemus M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J & Gogos JA. (1997) Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(4572-4575).
- Karayiorgou M, Sobin C, Blundell ML, Galke BL, Malinova L, Goldberg P, Ott J & Gogos JA. (1999) Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAOA on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*, 45:1178-1189.
- Karlsson M, Reue K, Xia YR, Lusic AJ, Langin D, Tornqvist H & Holm C. (2011) Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene. *Gene*, 272:11-18.
- Karsak M, Cohen-Solal M, Freudenberg J, Ostertag A, Morieux C, Kornak U, Essig J, Erxlebe E, Bab I, Kubisch C, de Vernejoul MC, Zimmer A. (2005) Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis. *Hum Molec Genet*, 14:3389-3396.
- Katona I & Freund TF. (2008) Endocannabinoid signings a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nature Medicine*, 14:37-76.
- Kawakubo Y, Suga M, Tochigi M, Yumoto M, Itoh K, Sasaki T, Kano Y & Kasai K. (2011) Effects of metabotropic glutamate receptor 3 genotype on phonetic mismatch negativity. *PLoS One*, 6(10):e24929.
- Keabian JW & Calne DB. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277(5692):93-96.
- Keefe RS, Silva SG, Perkins DO & Lieberman JA. (1999) The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Schizophr Bull*, 25(2):201-222.
- Keener MT, Fournier JC, Mullin BC, Kronhaus D, Perlman SB, LaBarbara E, Almeida JC & Phillips ML. (2012) Dissociable patterns of medial prefrontal and amygdala activity to face identity versus emotion in bipolar disorder. *Psychol*, 42(9):1913-1924.
- Keller MC & Miller G. (2006) Resolving the paradox of common, harmful, heritable mental disorders: which evolutionary genetic models work best?. *Behav Brain Sci*, 29(4):385-452.

- Keller MC, Simonson MA, Ripke S, Neale BM, Gejman PV, Howrigan DP, Lee SH, Lencz T, Levinson DF, Sullivan PF. & The Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium. (2012) Runs of homozygosity implicate autozygosity as a schizophrenia risk factor. *Plos Genetics*, 8(4):e1002656.
- Kelley AE & Berridge KC. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci*, 22(9):3306-3311.
- Kendler KS, Pedersen NL, Neale MC & Mathé AA. (1995) A pilot Swedish twin study of affective illness including hospital - and population - ascertained subsamples: results of model fitting. *Behav Genet*, 25(3):217-232.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR & Walters EE. (2005) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62(6):593-602.
- Kessler RC, Rubinow DR, Holmes C, Abelson JM & Zhao S. (1997) The epidemiology of DSM-III-R bipolar I disorder in a general population survey. *Psychol Med*, 27(5):1079-1089.
- Kessler RC. (2004) The epidemiology of dual diagnosis. *Biol Psychiatry*, 56(10):730-737.
- Khantzian EJ. (1997) The self-medication hypothesis of substance use disorders: a reconsideration and recent applications. *Harv Rev Psychiatry*, 4(5):231-244.
- Khantzian EJ. (2013) Addiction as a self-regulation disorder and the role of self-medication. *Addiction*, 108(4):668-669.
- Khoury MJ & Beaty TH. (1994) Applications of the case-control method in genetic epidemiology. *Epidemiol Rev*, 16(1):134-150.
- Khoury MJ & Flanders WD. (1996) Nontraditional epidemiologic approaches in the analysis of gene-environment interaction: case-control studies with no controls! *Am J Epidemiol*, 144(3):207-213.
- Kiesepää T, Partonen T, Haukka J, Kaprio J & Lönnqvist J. (2004) High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. *Am J Psychiatry*, 161(10):1814-1821.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV & Gottesman MM. (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315(5811):525-528.
- Kirkbride JB, Fearon P, Morgan C, Dazzan P, Morgan K, Tarrant J, Lloyd T, Holloway J, Hutchinson G, Leff JP, Mallett RM, Harrison GL, Murray RM & Jones PB. (2006) Heterogeneity in incidence rates of schizophrenia and other psychotic syndromes: findings from the 3-center AeSOP study. *Arch Gen Psychiatry*, 63(3):250-8.
- Kirov G, Grozeva D, Norton N, Ivanov D, Mantripragada KK, Holmans P; International Schizophrenia Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Owen MJ & O'Donovan MC. (2009) Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 18(8):1497-1503.
- Kiyohara Ch, Yoshihiro MMK, Fujimoto T, Shirasawa S, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Shimada H, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y & Nagai M. (2011) Genetic polymorphisms involved in dopaminergic neurotransmission and risk for Parkinson's disease in a Japanese population. *BMC Neurology*, 11:89.
- Klebe S, Golmard JL, Nalls MA, Saad M, Singleton AB, Bras JM, Hardy J, Simon-Sanchez J, Heutink P, Kuhlensäumer G, Charfi R, Klein C, Hagenah J, Gasser T, Wurster I, Lesage S, Lorenz D, Deuschl G, Durif F, Pollak P, Damier P, Tison F, Durr A, Amouyel P, Lambert JC,

Tzourio C, Maubaret C, Charbonnier-Beaupel F, Tahiri K, Vidailhet M, Martinez M, Brice A & Corvol JC. FPDGSG & IPDGC. (2013) The Val158Met COMT polymorphism is a modifier of the age at onset in Parkinson's disease with a sexual dimorphism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(6):666-673.

- Klegeris A, Bissonnette CJ & McGeer PL. (2003) Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol*, 139(4):775-786.

- Kloster E, Saft C, Epplen JT & Arning L. (2013) CNR1 variation is associated with the age at onset in Huntington disease. *Eur J Med Genet*, 56(8):416-419.

- Koch M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol*, 59(2):107-128.

- Koethe D, Giuffrida A, Schreiber D, Hellmich M, Schultze-Lutter F, Ruhrmann S, Klosterkötter J, Piomelli D & Leweke FM. (2009) Anandamide elevation in cerebrospinal fluid in initial prodromal states of psychosis. *Br J Psychiatry*, 194:371-374

- Kondo DG, Hellem TL, Shi XF, Sung YH, Prescott AP, Kim TS, Huber RS, Forrest LN & Renshaw PF. (2014) A review of MR spectroscopy studies of pediatric bipolar disorder. *AJNR Am. J. Neuroradiol*, 2014 Feb 20. [Epub ahead of print]

- Koob GF. (1999) The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann N Y Acad Sci*, 877:445-460.

- Kozłowski P, Mezer M & Krzyżosiak W. (2010) Trinucleotide repeats in human genome and exome. *Nucleic Acids Res*, 38(12): 4027-4039.

- Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, Strømgaard K & Gether U. (2011) SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev*, 63(3):585-640.

- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr & Charney DS. (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*, 51(3):199-214.

- Kumer SC & Vrana KE. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem*, 67(2):443-462.

- Lachenbruch PA. (1997) The odds ratio. *Control Clin Trials*, 18(4):381-382.

- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL & Weinshilboum RM. (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*, 6(3):243-250.

- Laird NM & Lange C. (2011) *The Fundamentals of Modern Statistical Genetics*. New York. Ed. Springer.

- Lambert DM & Fowler CJ. (2005) The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem*, 48(16):5059-5087.

- Lambert M, Karow A, Leucht S, Schimmelmann B & Naber D. (2010) Remission in schizophrenia: validity, frequency, predictors, and patients' perspective 5 years later. *Dialogues Clin Neurosci*, 12(3): 393-407.

- Lander ES & Schork NJ. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science*, 265(5181):2037-2048.

- Lang UE, Bajbouj M, Sander T & Gallinat J. Gender-dependent association of the functional catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype with sensation seeking personality trait. *Neuropsychopharmacology*, 32(9):1950-1955.
- Laursen TM & Munk-Olsen T. (2010) Reproductive patterns in psychotic patients. *Schizophr Res*, 121(1-3):234-240.
- 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.
- Leboyer M, Bellivier F, Nosten-Bertrand M, Jouvent R, Pauls D & Mallet J. (1998) Psychiatric genetics: search for phenotypes. *Trends Neurosci*, 21(3):102-5.
- Lee LG, Connell CR & Bloch W. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, 21(16):3761-3766.
- Leeson VC, Harrison I, Ron MA, Barnes TR, Joyce EM. (2012) The Effect of Cannabis Use and Cognitive Reserve on Age at Onset and Psychosis Outcomes in First-Episode Schizophrenia. *Schizophr Bull*, 38(4): 873–880.
- Lehtinen V, Joukamaa M, Lahtela K, Raitasalo R, Jyrkinen E, Maatela J & Aromaa A. (1990) Prevalence of mental disorders among adults in Finland: basic results from the Mini Finland Health Survey. *Acta Psychiatr Scand*, 81(5):418-425.
- Lencz T, Morgan TV, Athanasiou M, Dain B, Reed CR, Kane JM, Kucherlapati R & Malhotra AK. (2007) Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 12(6):572-580.
- Lennox BR, Park SB, Medley I, Morris PG & Jones PB. (2000) The functional anatomy of auditory hallucinations in schizophrenia. *Psychiatry Res*, 100(1):13-20.
- Leriche L, Schwartz JC & Sokoloff P. (2003) The dopamine D3 receptor mediates locomotor hyperactivity induced by NMDA receptor blockade. *Neuropharmacology*, 45(2):174-181.
- Leuchter AF, McCracken JT, Hunter AM, Cook IA & Alpert JE. (2009) Monoamine oxidase A and catechol-o-methyltransferase functional polymorphisms and the placebo response in major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol*, 29(4):372-377.
- Leung A & Chue P. (2000) Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 401:3-38.
- Levy E, Powell J, Buckle VJ, Hsu YP, Breakefield XO & Craig IW. (1989) Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xp11.23-11.4 by in situ hybridization: implications for Norrie disease. *Genomics*, 5(2):368-370.
- Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM & Piomelli D. (1999) Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport*, 10(8):1665-1669.
- Lewis DA & Levitt P. (2002) Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual Review of Neuroscience*, 25: 409-432.
- Lewis DA & Lieberman JA. (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, 28(2):325-334.
- Li J, Wang Y, Hu S, Zhou R, Yu X, Wang B, Guan L, Yang L, Zhang F & Faraone SV. (2008) The monoamine oxidase B gene exhibits significant association to ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 147(3):370-374.

- Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO & Israel MA. (2005) Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(16):5814-5819.
- Lichtenstein P, Yip BH, Björk C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF & Hultman CM. (2009) Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet*, 373(9659):234-239.
- Lien YJ, Liu CM, Faraone SV, Tsuang MT, Hwu HG, Hsiao PC & Chen WJ. (2010) A genome-wide quantitative trait loci scan of neurocognitive performances in families with schizophrenia. *Genes Brain Behav*, 9(7):695-702.
- Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA & Martin ER. (2007) No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet*, 80(3):531-538.
- Lin YM, Davamani F, Yang WC, Lai TJ & Sun HS. (2008) Association analysis of monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder in Han Chinese. *Behav Brain Funct*, 4: 21.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W & Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4(6):357-362.
- Lledo PM, Homburger V, Bockaert J & Vincent JD. (1992) Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron*, 8(3):455-463.
- Lopez AD & Murray CC. (1998) The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*, 4(11):1241-1243.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melén K, Julkunen I & Taskinen J. (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*, 34(13):4202-4210.
- Lundstrom K, Salminen M, Jalanko A, Savolainen R & Ulmanen I. (1991) Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol*, 10:181-189.
- Lupica CR & Riegel AC. (2005) Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology*, 48(8):1105-1116.
- Lyoo IK, Dager SR, Kim JE, Yoon SJ, Friedman SD, Dunner DL & Renshaw PF. (2010) Lithium-induced gray matter volume increase as a neural correlate of treatment response in bipolar disorder: a longitudinal brain imaging study. *Neuropsychopharmacology*, 35(8):1743-1750.
- Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V & Finazzi-Agrò A. (2000) Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem*, 275(18):13484-13492.
- Madden DR. (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci*, 3(2):91-101.
- Maina G, Albert U, Bellodi L, Colombo C, Faravelli C, Monteleone P, Bogetto F, Cassano GB & Maj M. (2007) Health-related quality of life in euthymic bipolar disorder patients: differences between bipolar I and II subtypes. *J Clin Psychiatry*, 68(2):207-212.
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M & Chen G. (2012) Impaired

mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 13(5):293–307.

- Mansfield ES, Wilson RB & Fortina P. (2001) Analysis of short tandem repeat markers by capillary array electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 163:151-161.
- Marengo S, Steele SU, Egan MF, Goldberg TE, Straub RE, Sharrief AZ & Weinberger DR. (2006) Effect of metabotropic glutamate receptor 3 genotype on N-acetylaspartate measures in the dorsolateral prefrontal cortex. *Am J Psychiatry*, 163(4):740-742.
- Maria K, Charalampos T, Vassilakopoulou D, Stavroula S, Vasiliki K & Nikolaos D. (2012) Frequency Distribution of COMT Polymorphisms in Greek Patients with Schizophrenia and Controls: A Study of SNPs rs737865, rs4680, and rs165599. *ISRN Psychiatry*, 2012:651613.
- Martínez-González M, Sánchez-Villegas A & López del Burgo C. (2006) Introducción a los modelos multivariados. En: Martínez-González M, Sánchez-Villegas A & Faulin J. *Bioestadística amigable*. España: Editorial Díaz de Santos.
- Martínez-Raga J, Knecht C, Ramírez N & Szerman N. (2009) Sistemas de neurotransmisión glutamatérgica y adicción a la cocaína. *Progresos en el tratamiento farmacológico. Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 73(1): 63-72, 2009.
- Martínez-Ramírez OC, Pérez-Morales R, Castro C, Flores-Díaz A, Soto-Cruz KE, Astorga-Ramos A, Gonsebatt ME, Casas L, Valdés-Flores M & Rubio J. (2013) Polymorphisms of catechol estrogens metabolism pathway genes and breast cancer risk in Mexican women. *Breast*, 22(3):335-343.
- Martorell L, Costas J, Valero J, Gutierrez-Zotes A, Phillips C, Torres M, Brunet A, Garrido G, Carracedo A, Guillamat R, Vallès V, Guitart M, Labad A & Vilella E. (2008) Analyses of variants located in estrogen metabolism genes (ESR1, ESR2, COMT and APOE) and schizophrenia. *Schizophr Res*, 100(1-3):308-315.
- Marx J. (2007) Behavioral genetics. Evidence linking DISC1 gene to mental illness builds. *Science*, 318(5853):1062-1063.
- Mateos JM, Benítez R, Elezgarai I, Azkue JJ, Lázaro E, Osorio A, Bilbao A, Doñate F, Sarría R, Conquet F, Ferraguti F, Kuhn R, Knöpfel T & Grandes P. (2000) Immunolocalization of the mGluR1b splice variant of the metabotropic glutamate receptor 1 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the rat cerebellar cortex. *J Neurochem*, 74(3):1301-1309.
- Mathé JM, Nomikos GG, Blakeman KH & Svensson TH. (1999) Differential actions of dizocilpine (MK-801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine systems: role of neuronal activity. *Neuropharmacology*, 38(1):121-128.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC & Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.
- McClure EA, Gipson CD, Malcolm RJ, Kalivas PW & Gray KM. (2014) Potential role of N-acetylcysteine in the management of substance use disorders. *CNS Drugs*, 28(2):95-106.
- McGeer PL, Eccles JC & McGeer EG. (1987) *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. 2ª Ed. New York. Plenum Press.
- McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C & Chant D. (2004) A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med*, 28:2-13.
- McGrath JJ. (2005) Myths and plain truths about schizophrenia epidemiology--the NAPE lecture 2004. *Acta Psychiatr Scand*, 111(1):4-11.

- McGrath. (2006) Variations in the Incidence of Schizophrenia: Data Versus Dogma. *Schizophrenia Bulletin*, 32(1):195–197.
- McKinney MK & Cravatt BF. (2005) Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem*, 74:411-432.
- McMillen BA, Lommatzsch CL, Sayonh MJ & Williams HL. (2013) Interactions of a Dopamine D1 Receptor Agonist with Glutamate NMDA Receptor Antagonists on the Volitional Consumption of Ethanol by the mHEP Rat. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6(4):469-479.
- Meador-Woodruff JH, Grandy DK, Van Tol HH, Damask SP, Little KY, Civelli O & Watson SJ Jr. (1994) Dopamine receptor gene expression in the human medial temporal lobe. *Neuropsychopharmacology*, 10(4):239-248.
- Meltzer HY. (1997) Clozapine withdrawal: serotonergic or dopaminergic mechanisms?. *Arch Gen Psychiatry*, 54(8):760-763.
- Mendrek A & Stip E. (2011) Sexual dimorphism in schizophrenia: is there a need for gender-based protocols?. *Expert Rev Neurother*, 11(7):951-959.
- Menniti FS, Lindsley CW, Conn PJ, Pandit J, Zagouras P & Volkman RA. (2013) Allosteric modulators for the treatment of schizophrenia: targeting glutamatergic networks. *Curr Top Med Chem*, 3(1):26-54.
- Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE & Zarkov Z. (2011) Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry*, 68(3):241-251.
- Meschler JP & Howlett AC. (2001) Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology*, 40(7):918-926.
- Messias EL, Chen CY & Eaton WW. (2007) Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths. *Psychiatr Clin North Am*, 30(3):323-338.
- Millar JK, Mackie S, Clapcote SJ, Murdoch H, Pickard BS, Christie S, Muir WJ, Blackwood DH, Roder JC, Houslay MD & Porteous DJ. (2007) Disrupted in schizophrenia 1 and phosphodiesterase 4B: towards an understanding of psychiatric illness. *J Physiol*, 584(2):401-405.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St 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(9):1415-1423.
- Miller LG & Jankovic J. (1990) Neurologic approach to drug-induced movement disorders: a study of 125 patients. *South Med J*, 83(5):525-532.
- Minocci D, Massei J, Martino A, Milianti M, Piz L, Di Bello D, Sbrana A, Martinotti E, Rossi AM, Nieri P. (2011) Genetic association between bipolar disorder and 524A>C (Leu133Ile) polymorphism of CNR2 gene, encoding for CB2 cannabinoid receptor. *J Affect Disord*, 134(1-3):427-430.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M & Caron MG. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78(1):189-225.
- Mitsunaga MM, Garrett A, Howe M, Karchemskiy A, Reiss A & Chang K. (2011) Increased subgenual cingulate cortex volume in pediatric bipolar disorder associated with mood stabilizer exposure. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 21(2):149-55.
- Modi WS & Bonner TI. (1991) Localization of the cannabinoid (sic) receptor locus using non-

isotopic in situ hybridization. *Cell Genet.* 58:1915.

- Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN & Namboodiri AM. (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: From Neurodiagnostics to Neurobiology. *Prog Neurobiol*, 81(2): 89–131.

- Moghaddam B & Javitt D. (2012) From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*, 37(1):4-15.

- Monteleone P, Bifulco M, Maina G, Tortorella A, Gazzo P, Proto MC, Di Filippo C, Monteleone F, Canestrelli B, Buonerba G, Bogetto F & Maj M. (2010) Investigation of CNR1 and FAAH endocannabinoid gene polymorphisms in bipolar disorder and major depression. *Pharmacological Research*, 61(5):400-404.

- Mueser KT, Bellack AS & Blanchard JJ. (1992) Comorbidity of schizophrenia and substance abuse: implications for treatment. *J Consult Clin Psychol*, 60(6):845-856.

- Mueser KT, Drake RE & Wallach MA. (1998) Dual diagnosis: a review of etiological theories. *Addict Behav*, 23(6):717-734.

- Müller TD, Bröner G, Wandolowski M, Carrie J, Nguyen TT, Greene BH, Scherag A, Grallert H, Vogel CI, Scherag S, Rief W, Wichmann HE, Illig T, Schäfer H, Hebebrand J & Hinney A. (2010) Mutation screen and association studies for the fatty acid amide hydrolase (FAAH) gene and early onset and adult obesity. *BMC Med Genet*, 11:2.

- Müller TD, Reichwald K, Bröner G, Kirschner J, Nguyen TT, Scherag A, Herzog W, Herpertz-Dahlmann B, Lichtner P, Meitinger T, Platzer M, Schäfer H, Hebebrand J & Hinney A. (2008) Lack of association of genetic variants in genes of the endocannabinoid system with anorexia nervosa. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 2(1):33.

- Munk-Jørgensen P. (1987) First-admission rates and marital status of schizophrenics. *Acta Psychiatr Scand*, 76(2):210-216.

- Munro S, Thomas KL & Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441):61-65.

- Murase S, Nisell M, Grenhoff J & Svensson TH. (1992) Decreased sensory responsiveness of noradrenergic neurons in the rat locus coeruleus following phencyclidine or dizocilpine (MK-801): role of NMDA antagonism. *Psychopharmacology (Berl)*, 109(3):271-276.

- Nagatsu T. (1983) Biopterin cofactor and monoamine-synthesizing monooxygenases. *Neurochem Int*, 5(1):27-38.

- Nakanishi S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron*, 13(5):1031-1037.

- Neale BM & Sham PC. (2004) The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet*, 75(3):353-362.

- Niciu MJ, Kelmendi B & Sanacora G. (2012) Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacol Biochem Behav*, 100(4): 656–664.

- Nishi A, Bibb JA, Matsuyama S, Hamada M, Higashi H, Nairn AC & Greengard P. (2002) Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A. *J Neurochem*, 81(4):832-841.

- Nopoulos PC, Ceilley JW, Gailis EA & Andreasen NC. (2001) An MRI study of midbrain morphology in patients with schizophrenia: relationship to psychosis, neuroleptics, and cerebellar neural circuitry. *Biol Psychiatry*, 49(1):13-19.

- Nunes EV, Liu X, Samet S, Matseoane K & Hasin D. (2006) Independent versus substance-induced major depressive disorder in substance-dependent patients: observational study of course during follow-up. *J Clin Psychiatry*, 67(10):1561-1567.
- O'Dowd BF. (1993) Structures of dopamine receptors. *J Neurochem*, 60(3):804-816.
- O'Donovan M, Craddock N & Owen M. (2009) Genetics of psychosis; insights from views across the genome. *Human Genetics*, 126: 3-12.
- Ochoa S, Usall J, Haro JM, Araya S, Autonell J, Busquets E & Gost A. (2001) Comparative study of the needs of patients with schizophrenia by gender. *Actas Esp Psiquiatr*, 29(3):165-171.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gu S & Liu QR. (2012) CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol*, 26(1):92-103.
- Onaivi ES. (2006) Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*, 54:231-246.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K & Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(8):2766-2770.
- Osby U, Brandt L, Correia N, Ekblom A & Sparén P. (2001) Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*, 58(9):844-850.
- O'Shea RD. (2002) Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29:1018-1023.
- Pacher P, Bátkai S & Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58(3):389-462.
- Palmer CL, Lim W, Hastie PG, Toward M, Korolchuk VI, Burbidge SA, Banting G, Collingridge GL, Isaac JT & Henley JM. (2005) Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal LTD. *Neuron*, 47(4):487-494.
- Palomo T, Besson JAO & Ascroft GW. (1985) Chronic Schizophrenia: a new approach to treatment. *Br J Clin and Soc Psychiatry*, 3:6-7.
- Parker GA. (1979) Sexual selection and sexual conflict. En: *Sexual selection and reproductive competition in insects*. Eds Blum MS & Blum NA. New York. Academic Press.
- Parolaro D, Realini N, Vigano D, Guidali C & Rubino T. (2010) The endocannabinoid system and psychiatric disorders. *Exp Neurol*, 224(1):3-14.
- Parsons LH, Weiss F & Koob GF. (1996) Serotonin1b receptor stimulation enhances dopamine-mediated reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, 128(2):150-160.
- Partridge L & Hurst LD. (1998) Sex and conflict. *Science*, 281(5385):2003-2008.
- Parwani A, Duncan EJ, Bartlett E, Madonick SH, Efferen TR, Rajan R, Sanfilippo M, Chappell PB, Chakravorty S, Gonzenbach S, Ko GN & Rotrosen JP. (2000) Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 47(7):662-669.
- Peralta V & Cuesta MJ. (2007) A dimensional and categorical architecture for the classification of psychotic disorders. *World Psychiatry*, 6(2):100-101.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R & Ross RA. (2010) International Union of

Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev*, 62(4):588-631.

- Pertwee RG. (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: D9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and D9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal Psychiatry*, 153:199-215.

- Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS & Wenthold RJ. (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*, 71(4):949-976.

- Pino C. (2009) Paciente con psicosis tóxica. En: Manejo Clínico del paciente con patología dual. Ed. Bobes J & Casas M. *Socidrogalcohol*.

- Ponce G, Hoenicka J, Rubio G, Ampuero I, Jiménez-Arriero MA, Rodríguez-Jiménez R, Palomo T & Ramos JA. (2003) Association between cannabinoid receptor gene (CNR1) and childhood attention deficit/hyperactivity disorder in Spanish male alcoholic patients. *Molecular Psychiatry*, 8: 466-467.

- Porteous D. (2008) Genetic causality in schizophrenia and bipolar disorder: out with the old and in with the new. *Curr Opin Genet Dev*, 18(3):229-234.

- Potvin S, Briand C, Prouteau A, Bouchard RH, Lipp O, Lalonde P, Nicole L, Lesage A & Stip E. (2005) CANTAB explicit memory is less impaired in addicted schizophrenia patients. *Brain Cogn*, 59(1):38-42.

- Power RA, Kyaga S, Uher R, MacCabe JH, Långström N, Landen M, McGuffin P, Lewis CM, Lichtenstein P & Svensson AC. (2013) Fecundity of patients with schizophrenia, autism, bipolar disorder, depression, anorexia nervosa, or substance abuse vs their unaffected siblings. *JAMA Psychiatry*, 70(1):22-30.

- Proudnikov D, Krosiak T, Sipe JC, Randesi M, Li D, Hamon S, Ho A, Ott J & Kreek MJ. (2010) Association of polymorphisms of the cannabinoid receptor (CNR1) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) genes with heroin addiction: impact of long repeats of CNR1. *Pharmacogenomics J*, 10(3):232-242.

- Purves-Tyson TD, Handelsman DJ, Double KL, Owens SJ, Bustamante S & Weickert CS. (2012) Testosterone regulation of sex steroid-related mRNAs and dopamine-related mRNAs in adolescent male rat substantia nigra. *BMC Neuroscience*, 13:95.

- Ramos JA & Fernández-Ruiz J. (2003) Estado actual de los conocimientos sobre el sistema endocannabinoide endógeno. En: Ramos JA & Fernández-Ruiz J. *Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides*. Madrid. Editorial de la Comunidad de Madrid.

- Ramsey JM, Schwarz E, Guest PC, van Beveren NJ, Leweke FM, Rothermundt M, Bogerts B, Steiner J & Bahn S. (2013) Distinct molecular phenotypes in male and female schizophrenia patients. *PLoS One*, 8(11):e78729.

- Regeer EJ, ten Have M, Rosso ML, Hakkaart-van Roijen L, Vollebergh W, Nolen WA. (2004) Prevalence of bipolar disorder in the general population: a Reappraisal Study of the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study. *Acta Psychiatr Scand*, 110(5):374-382.

- Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Locke BZ, Keith SJ, Judd LL & Goodwin FK. (1990) Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA*, 264(19):2511-2518.

- Reith ME, Xu C & Chen NH. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol*, 324:1-10.

- Reynolds GP & Mason SL. (1994) Are striatal dopamine D4 receptors increased in schizophrenia?. *J Neurochem*, 63(4):1576-1577.
- Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R & Vogel Z. (1998) Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, 71(4):1525-1534.
- Rice WR. (1992) Sexually antagonistic genes: experimental evidence. *Science*, 256(5062):1436-1439.
- Risch N. (1990) Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet*, 46(2):222-228.
- Rodríguez-Pulido F & González de Rivera JL. (1993) La investigación epidemiológica de la esquizofrenia: algunos problemas metodológicos. En: *El método epidemiológico en Salud Mental*. Eds. González de Rivera JL, Rodríguez F & Sierra A. Barcelona. Ed. Masson-Salvat.
- Romero J, Lastres-Becker I, de Miguel R, Berrendero F, Ramos JA & Fernández-Ruiz J. (2002) The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther*, 95(2):137-152.
- Roncero C, Collazos F, Valero S & Casas M. (2007) Consumo de cannabis y desarrollo de psicosis: estado actual. *Actas Esp Psiquiatr*. 35(3):182-189.
- Rosenbrock H, Kramer G, Hobson S, Koros E, Grundl M, Grauert M, Reymann KG & Schröder UH. (2010) Functional interaction of metabotropic glutamate receptor 5 and NMDA-receptor by a metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur J Pharmacol*, 639(1-3):40-46.
- Roten LT, Fenstad MH, Forsmo S, Johnson MP, Moses EK, Austgulen R & Skorpen F. (2011) A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2). *Mol Hum Reprod*, 17(7):439-446.
- Rowe L & Day T. (2006) Detecting sexual conflict and sexually antagonistic coevolution. *Phil Trans R Soc B*, 361(1466):277-285.
- Rowe L & Day T. (2006) Detecting sexual conflict and sexually antagonistic coevolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1466):277-285.
- Rubio G, Ponce G & Jiménez MA. (2000) Eficacia de la risperidona en el manejo de problemas clínicos en toxicomanías. *Trastornos Adictivos*, 1(4):252-253.
- Ruiz-Contreras AE, Carrillo-Sánchez K, Gómez-López N, Vadillo-Ortega F, Hernández-Morales S, Carnevale-Cantoni A, Espejel-Núñez A, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O. (2013) Working memory performance in young adults is associated to the AATn polymorphism of the CNR1 gene. *Behav Brain Res*, 236(1):62-66.
- Rujescu D, Ingason A, Cichon S, Pietiläinen OP, Barnes MR, Toulopoulou T, Picchioni M, Vassos E, Ettinger U, Bramon E, Murray R, Ruggeri M, Tosato S, Bonetto C, Steinberg S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Petursson H, Gylfason A, Olason PI, Hardarsson G, Jonsdottir GA, Gustafsson O, Fossdal R, Giegling I, Möller HJ, Hartmann AM, Hoffmann P, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Djurovic S, Melle I, Andreassen OA, Hansen T, Werge T, Kiemenev LA, Franke B, Veltman J, Buizer-Voskamp JE; GROUP Investigators, Sabatti C, Ophoff RA, Rietschel M, Nöthen MM, Stefansson K, Peltonen L, St Clair D, Stefansson H, Collier DA. (2009) Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 18(5):988-996.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid

receptor. *Br J Pharmacol*, 152(7):1092-1101.

- Saha S, Chant D, Welham J & McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*, 2(5):e141.

- Salamone JD, Correa M, Mingote S & Weber SM. (2003) Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(1):1-8.

- Salgado-Pineda P, Caclin A, Baeza I, Junqué C, Bernardo M, Blin O & Fonlupt P. (2007) Schizophrenia and frontal cortex: where does it fail?. *Schizophr Res*, 91(1-3):73-81.

- Salgado-Pineda P, Landin-Romero R, Fakra E, Delaveau P, Amann BL & Blin O. (2014) Structural abnormalities in schizophrenia: further evidence on the key role of the anterior cingulate cortex. *Neuropsychobiology*, 69(1):52-58.

- Salio C, Fischer J, Franzoni MF & Conrath M. (2002) Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*, 110(4):755-764.

- Salokangas RK. (2003) Symptom dimensions and outcome in schizophrenia. *World Psychiatry*, 2(3):172-178.

- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press.

- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Edition. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanchez-Moreno J, Martinez-Aran A, Tabarés-Seisdedos R, Torrent C, Vieta E & Ayuso-Mateos JL. (2009) Functioning and disability in bipolar disorder: an extensive review. *Psychother Psychosom*, 78(5):285-297.

- Sánchez-Morla EM, Barabash A, Martínez-Vizcaíno V, Tabarés-Seisdedos R, Balanzá-Martínez V, Cabranes-Díaz JA, Baca-Baldomero E & Gómez JL. (2009) Comparative study of neurocognitive function in euthymic bipolar patients and stabilized schizophrenic patients. *Psychiatry Res*, 169(3):220-228.

- Sánchez-Morla EM, García-Jiménez MA, Barabash A, Martínez-Vizcaíno V, Mena J, Cabranes-Díaz JA, Baca-Baldomero E & Santos JL. (2008) P50 sensory gating deficit is a common marker of vulnerability to bipolar disorder and schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*, 117(4):313-318.

- Sánchez-Morla EM, Santos JL, Aparicio A, García-Jiménez MÁ, Soria C & Arango C. (2013) Neuropsychological correlates of P50 sensory gating in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, 143(1):102-106.

- Santos JL, Sánchez-Morla EM, Aparicio A, García-Jiménez MA, Villanueva C, Martínez-Vizcaíno V & Arango C. (2010) P50 gating in deficit and nondéficit schizophrenia. *Schizophr Res*, 119(1-3):183-190.

- Sassi RB, Brambilla P, Hatch JP, Nicoletti MA, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Keshavan MS, Soares JC. (2004) Reduced left anterior cingulate volumes in untreated bipolar patients. *Biol Psychiatry*, 56(7):467-475.

- Sawa A & Snyder SH. (2002) Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science*, 296(5568):692-695.

- Schacht JP, Selling RE & Hutchinson KE. (2009) Intermediate cannabis dependence

phenotypes and the FAAH C385A variant: an exploratory analysis. *Psychopharmacol*, 203(3):511-517.

- Schacht JP, Selling RE & Hutchison KE. (2009) Intermediate cannabis dependence phenotypes and the FAAH C385A variant: an exploratory analysis. *Psychopharmacology (Berl)*, 203(3):511–517.

- Schaid DJ. (1999) Case-parents design for gene-environment interaction. *Genet Epidemiol*, 16(3):261-273.

- Schaid DJ. (1999b) Likelihoods and TDT for the case-parents design. *Genet Epidemiol*, 16(3):250-260.

- Schaid DJ. (2002) Relative efficiency of ambiguous vs. directly measured haplotype frequencies. *Genet Epidemiol*, 23(4):426-443.

- Scherer SW, Duvoisin RM, Kuhn R, Heng HH, Belloni E & Tsui LC. (1996) Localization of two metabotropic glutamate receptor genes, GRM3 and GRM8, to human chromosome 7q. *Genomics*, 31(2): 230-233.

- Schoepp DD, Jane DE & Monn JA. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 38(10):1431-1476.

- Schroth GP, Chou PJ & Ho PS. (1992) Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes. *J Biol Chem*, 267(17):11846-11855.

- Schuff N, Meyerhoff DJ, Mueller S, Chao L, Sacrey DT, Laxer K & Weiner MW. (2006) N-acetylaspartate as a marker of neuronal injury in neurodegenerative disease. *Adv Exp Med Biol*, 576:241-262.

- Schultz W. (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, 7(2):191-197.

- Schwartz JC, Diaz J, Bordet R, Griffon N, Perachon S, Pilon C, Ridray S & Sokoloff P. (1998) Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. *Brain Res Brain Res Rev*, 26(2-3):236-242.

- Schwartz JC, Ridray S, Bordet R, Diaz J & Sokoloff P. (1998) D1/D3 receptor relationships in brain coexpression, coactivation, and coregulation. *Adv Pharmacol*, 42:408-411.

- Sebat J, Levy DL & McCarthy SE. (2009) Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends Genet*, 25(12):528-35.

- Seeburg PH, Burnashev N, Köhr G, Kuner T, Sprengel R & Monyer H. (1995) The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent Prog Horm Res*, 50:19-34.

- Seeman P, Guan HC & Van Tol HH. (1993) Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature*, 365(6445):441-445.

- Seifert J, Ossege S, Emrich HM, Schneider U & Stuhmann M. (2007) No association of CNR1 gene variations with susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett*, 426(1):29-33.

- Shen J, Petersen KF, Behar KL, Brown P, Nixon TW, Mason GF, Petroff OA, Shulman GI, Shulman RG & Rothman DL. (1999) Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(14):8235-8240.

- Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR & Peterson PK. (2005) Synthetic cannabinoid WIN55, 212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-

stimulated human astrocytes. *Glia*, 49(2):211-219.

- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M & McCarley RW. (2001) A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res*, 49(1-2):1-52.

- Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Didierjean L, Hellman U & Saurat JH. (1994) Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. *Biochem J*, 302(2):363-371.

- Silverstein SM, Wang Y & Keane BP. (2013) Cognitive and neuroplasticity mechanisms by which congenital or early blindness may confer a protective effect against schizophrenia. *Front Psychol*, 3:624.

- Simmons ML, Frondoza CG & Coyle JT. (1991) Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neurosci*, 45:37-45.

- Simpson SG & Jamison KR. (1999) The risk of suicide in patients with bipolar disorders. *J Clin Psychiatry*, 60(2):53-56.

- Sipe JC, Chiang K, Gerber AL, Beutler E & Cravatt BF. (2002) A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(12):8394-8399.

- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L & Leon A. (1996) The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(9): 3984-3989.

- Sklar P, Smoller JW, Fan J, Ferreira MA, Perlis RH, Chambert K, Nimgaonkar VL, McQueen MB, Faraone SV, Kirby A, de Bakker PI, Ogdie MN, Thase ME, Sachs GS, Todd-Brown K, Gabriel SB, Sougnez C, Gates C, Blumenstiel B, Defelice M, Ardlie KG, Franklin J, Muir WJ, McGhee KA, MacIntyre DJ, McLean A, VanBeck M, McQuillin A, Bass NJ, Robinson M, Lawrence J, Anjorin A, Curtis D, Scolnick EM, Daly MJ, Blackwood DH, Gurling HM & Purcell SM. (2008) Whole-genome Association Study of Bipolar Disorder. *Mol Psychiatry*, 13(6): 558-569.

- Slager SL & Schaid DJ. (2001) Evaluation of Candidate Genes in Case-Control Studies: A Statistical Method to Account for Related Subjects. *Am J Hum Genet*, 68(6): 1457-1462.

- Smart TG & Paoletti P. (2012) Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(3). pii:a009662.

- Snyder SH. (1981) Dopamine receptors, neuroleptics, and schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 138(4):460-464.

- Solowij N & Michie PT. (2007) Cannabis and cognitive dysfunction: Parallels with endophenotypes of schizophrenia?. *J Psychiatry Neurosci*, 32(1): 30-52.

- Spangler R, Goddard NL, Avena NM, Hoebel BG & Leibowitz SF. (2003) Elevated D3 dopamine receptor mRNA in dopaminergic and dopaminoreceptive regions of the rat brain in response to morphine. *Brain Res Mol Brain Res*, 111(1-2):74-83.

- Stadelmann AM, Juckel G, Arning L, Gallinat J, Epplen JT & Roser P. (2011) Association between a cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism and cannabinoid-induced alterations of the auditory event-related P300 potential. *Neurosci Lett*, 496(1):60-64.

- Stearns SC, Byars SG, Govindaraju DR & Ewbank D. (2010) Measuring selection in contemporary human populations. *Nat Rev Genet*, 11(9):611-622.

- Stearns SC, Govindaraju DR, Ewbank D & Byars SG. (2012) Constraints on the coevolution of contemporary human males and females. *Proc Biol Sci*, 279(1748):4836-44.
- Stella N. (2010) Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes and astrocytomas. *Glia*, 58(9):1017–1030.
- Stork C & Renshaw PF. (2005) Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry*, 10(10):900-919.
- Stowell RJ. (1991) Dual diagnosis issues. *Psychiatric Annals*, 21(2):98-104.
- Stulp G, Kuijper B, Buunk AP, Pollet TV & Verhulst S. (2012) Intralocus sexual conflict over human height. *Biol Lett*, 8(6):976-978.
- Südhof TC. (2008) Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease. *Nature*, 455(7215): 903–911.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S & Gokoh M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, 45(5):405-46.
- Sullivan PF. (2007) Spurious genetic associations. *Biological Psychiatry*, 61(10): 1121-1126.
- Sun Y & Bennett A. (2007) Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res*, 2007:23513.
- Sun Y, Zhang J, Yuan Y, Yu X, Shen Y & Xu Q. (2012) Study of a possible role of the monoamine oxidase A (MAOA) gene in paranoid schizophrenia among a Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 159B(1):104-111.
- Svensson TH, Mathé JM, Andersson JL, Nomikos GG, Hildebrand BE & Marcus M. (1995) Mode of action of atypical neuroleptics in relation to the phencyclidine model of schizophrenia: role of 5-HT₂ receptor and alpha 1-adrenoceptor antagonism. *J Clin Psychopharmacol*, 15(1):11S-18S
- Swartz MS, Wagner HR, Swanson JW, Stroup TS, McEvoy JP, Canive JM, Miller DD, Reimherr F, McGee M, Khan A, Van Dorn R, Rosenheck RA & Lieberman JA. (2006) Substance use in persons with schizophrenia: baseline prevalence and correlates from the NIMH CATIE study. *J Nerv Ment Dis*, 194(3):164-172.
- Swerdlow NR & Geyer MA. (1998) Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull*, 24(2):285-301.
- Szerman N. (2009) Paciente dual complicado. En: *Manejo Clínico del paciente con patología dual*. Ed. Bobes J & Casas M. *Socidrogalcohol*.
- Tajima K, Fernández H, López-Ibor JL, Carrasco JL & Díaz-Marsá M. (2009) Schizophrenia treatment. Critical review on the drugs and mechanisms of action of antipsychotics. *Actas Esp Psiquiatr*, 37(6):330-342.
- Takahashi H, Koeda M, Oda K, Matsuda T, Matsushima E, Matsuura M, Asai K & Okubo Y. (2004) An fMRI study of differential neural response to affective pictures in schizophrenia. *Neuroimage*, 22(3):1247-1254.
- Talamo A, Centorrino F, Tondo L, Dimitri A, Hennen J & Baldessarini RJ. (2006) Comorbid substance-use in schizophrenia: relation to positive and negative symptoms. *Schizophr Res*, 86(1-3):251-255.
- Tan H, Chen Q, Sust S, Buckholtz JW, Meyers JD, Egan MF, Mattay VS, Meyer-Lindenberg

- A, Weinberger DR & Callicott JH. (2007) Epistasis between catechol-O-methyltransferase and type II metabotropic glutamate receptor 3 genes on working memory brain function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(30):12536–12541.
- Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R & Ulmanen I. (1994) Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem*, 223(3):1049-1059.
- The International HapMap Consortium. (2010) Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, 467:52-58.
- Tong D, He S, Wang L, Jin L, Si P & Cheng X. (2013) Association of single-nucleotide polymorphisms in the cannabinoid receptor 2 gene with schizophrenia in the Han Chinese population. *J Mol Neurosci*, 51(2):454-460.
- Tsai SJ, Wang YC & Hong CJ. (2001) Association study between cannabinoid receptor gene (CNR1) and pathogenesis and psychotic symptoms of mood disorders. *Am J Med Genet*, 105(3):219-221.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K & Walker JM. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2):393-411.
- Tsutsumi A, Glatt SJ, Kanazawa T, Kawashige S, Uenishi H, Hokyo A, Kaneko T, Moritani M, Kikuyama H, Koh J, Matsumura H & Yoneda H. (2011) The genetic validation of heterogeneity in schizophrenia. *Behav Brain Funct*, 7:43.
- Turetsky BI, Moberg PJ, Yousem DM, Doty RL, Arnold SE & Gur RE. (2000) Reduced olfactory bulb volume in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(5):828-830.
- Tyndale RF, Payne JI, Gerber AL & Sipe JC. (2007) The fatty acid amide hydrolase C385A (P129T) missense variant in cannabis users. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144(5):660-666.
- Tzschenke TM & Schmidt WJ. (2003) Glutamatergic mechanisms in addiction. *Mol Psychiatry*, 8(4):373-382.
- Uher R. (2009) The role of genetic variation in the causation of mental illness: an evolutioninformed framework. *Mol Psychiatry*, 14(12):1072-1082.
- Ujike H, Takaki M, Nakata K, Tanaka Y, Takeda T, Kodama M, Fujiwara Y, Sakai A & Kuroda S. (2002) CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephenic schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 7(5): 515-518.
- Urigüen L, García-Fuster MJ, Callado LF, Morentin B, La Harpe R, Casadó V, Lluís C, Franco R, García-Sevilla JA & Meana JJ. (2009) Immunodensity and mRNA expression of A2A adenosine, D2 dopamine, and CB1 cannabinoid receptors in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: effect of antipsychotic treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, 206(2):313-324.
- Ustun TB, Ayuso-Mateos JL, Chatterji S, Mathers C & Murray CJ. (2004) Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Br J Psychiatry*, 184: 386-392.
- Uys JD, LaLumiere RT. Glutamate: the new frontier in pharmacotherapy for cocaine addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7(5):482-491.
- Van der Stelt M & Di Marzo V. (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *European Journal of Pharmacology*, 480(1-3):133-150.

- van Os J, Bak M, Hanssen M, Bijl RV, de Graaf R & Verdoux H. (2002) Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. *Am J Epidemiol*, 156(4):319-327.
- van Os J, Hanssen M, Bijl RV & Vollebergh W. (2001) Prevalence of psychotic disorder and community level of psychotic symptoms: an urban-rural comparison. *Archives of General Psychiatry*, 58(7):663-668.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB & Civelli O. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350(6319):610-614.
- Vargas-Alarcón G, Fragoso JM, Cruz-Robles D, Vargas A, Vargas A, Lao-Villadóniga JI, García-Fructuoso F, Ramos-Kuri M, Hernández F, Springall R, Bojalil R, Vallejo M & Martínez-Lavín M. (2007) Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia. *Arthritis Res Ther*, 9(5):R110.
- Vaughan CW & Christie MJ. (2005) Retrograde signalling by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, 168:367-383.
- Vázquez-Barquero JL, Cuesta Nuñez MJ, de la Varga M, Herrera Castanedo S, Gaité L, Arenal A. (1995) The Cantabria first episode schizophrenia study: a summary of general findings. *Acta Psychiatr Scand*, 91(3):156-162.
- Viguera AC, Baldessarini RJ & Tondo L. (2001) Response to lithium maintenance treatment in bipolar disorders: comparison of women and men. *Bipolar Disord*, 3(5):245-252.
- Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, Lawford BR, Young RM & Morris CP. (2011) A novel SNP in COMT is associated with alcohol dependence but not opiate or nicotine dependence: a case control study. *Behav Brain Funct*, 7:51.
- Volkow ND & Fowler JS. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*, 10(3):318-325.
- Volkow ND, Wang GJ, Maynard L, Fowler JS, Jayne B, Telang F, Logan J, Ding YS, Gatley SJ, Hitzemann R, Wong C & Pappas N. (2002) Effects of alcohol detoxification on dopamine D2 receptors in alcoholics: a preliminary study. *Psychiatry Res*, 116(3):163-172.
- Volkow ND. (2001) Drug abuse and mental illness: progress in understanding comorbidity. *Am J Psychiatry*, 158(8):1181-1183.
- Voruganti LN, Slomka P, Zabel P, Mattar A & Awad AG. (2001) Cannabis induced dopamine release: an in-vivo SPECT study. *Psychiatry Res*, 107(3):173-177.
- Wan M, Cravatt BF, Ring HZ, Zhang X & Francke U. (1998) Conserved chromosomal location and genomic structure of human and mouse fatty-acid amide hydrolase genes and evaluation of clasper as a candidate neurological mutation. *Genomics* 54(3): 408-414.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM, Kim CE, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere CM, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Herman EI, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney JA, Brune CW, Cantor RM, Bernier R, Gilbert JR, Cuccaro ML, McMahon WM, Miller J, State MW, Wassink TH, Coon H, Levy SE, Schultz RT, Nurnberger JI, Haines JL, Sutcliffe JS, Cook EH, Minshew NJ, Buxbaum JD, Dawson G, Grant SF, Geschwind DH, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD & Hakonarson H. (2009) Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*, 459(7246): 528–533.
- Wei YL, Li CX, Li SB, Liu Y & Hu L. (2011) Association study of monoamine oxidase A/B genes and schizophrenia in Han Chinese. *Behav Brain Funct*, 7:42.

- Wei YL, Li CX, Li SB, Liu Y & Hu L.. (2012) Heroin Self-Administration Experience Establishes Control of Ventral Tegmental Glutamate Release by Stress and Environmental Stimuli. *Neuropsychopharmacology*, 37(13):2863–2869.
- Weiler IJ & Greenough WT. (1993) Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(15):7168-7171.
- Weiner N & Molinoff PB. (1994) Catecholamines. En: Siegel GJ, Agranoff B, Albers RW & Molinoff PB, Eds. *Basic Neurochemistry*. 5ª Ed. New York: Raven Press; 1994.
- Wells JE, Bushnell JA, Hornblow AR, Joyce PR & Oakley-Browne MA. (1989) Christchurch Psychiatric Epidemiology Study, Part I: methodology and lifetime prevalence for specific psychiatric disorders. *Aust N Z J Psychiatry*,;23(3):315–326.
- Westermeyer J. (2006) Comorbid schizophrenia and substance abuse: a review of epidemiology and course. *Am J Addict*, 15(5):345-355.
- Weyler W, Hsu YP & Breakefield XO. (1990) Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol Ther*, 47(3):391-417.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG & Bear MF. (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790):1093-1097.
- Willard SS & Koochekpour S. (2013) Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci*, 9(9):948-959.
- Williams HJ, Owen MJ & O'Donovan MC. (2007) Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia?. *Schizophr Bull*, 33(3):635-641.
- Willner P, Hale AS & Argyropoulos S. (2005) Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. *J Affect Disord*, 86(1):37-45.
- Winokur G & Kadrmas A. (1989) A polyepisodic course in bipolar illness: possible clinical relationships. *Compr Psychiatry*, 30(2):121-127.
- Winqvist R, Lundstrom K, Salminen M, Laatikainen M & Ulmanen I. (1991) Mapping of human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.2 and detection of a frequent RFLP with BglI. *Cell Genet*, 58:2051.
- Wong AH & Van Tol HH. (2003) Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(3):269-306.
- Xia Y, Ma D, Hu J, Tang Ch, Wu Z, Liu L & Xin F. (2012) Effect of metabotropic glutamate receptor 3 genotype on N-acetylaspartate levels and neurocognition in non-smoking, active alcoholics. *Behav Brain Funct*, 8:42.
- Xiang YT, Shum D, Chiu HF, Tang WK & Ungvari GS. (2010) Association of demographic characteristics, symptomatology, retrospective and prospective memory, executive functioning and intelligence with social functioning in schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*, 44(12):1112-1117.
- Xie X & Hagan RM. (1998) Cellular and molecular actions of lamotrigine: Possible mechanisms of efficacy in bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 38(3):119-130.
- Xu B, Roos JL, Levy S, van Rensburg EJ, Gogos JA & Karayiorgou M. (2008) Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nature Genetics*, 40:880-885.
- Yonkers KA, Kando JC, Cole JO & Blumenthal S. (1992) Gender differences in

pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic medication. *Am J Psychiatry*, 149(5):587-595.

- Zakzanis KK, Poulin P, Hansen KT & Jolic D. (2000) Searching the schizophrenic brain for temporal lobe deficits: a systematic review and meta-analysis. *Psychol Med*, 30(3):491-504.

- Zavitsanou K, Garrick T & Huang XF. (2004) Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(2):355-360.

- Zhan L, Kerr JR, Lafuente MJ, Maclean A, Chibalina MV, Liu B, Burke B, Bevan S & Nasir J. (2011) Altered expression and coregulation of dopamine signalling genes in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37(2):206-219.

- Zhang J & Yu KF. (1998) What's the relative risk? A method of correcting the Odds ratio in cohort studies of common outcomes. *JAMA*, 280:1690-1691.

- Zhang J, Chen Y, Zhang K, Yang H, Sun Y, Fang Y, Shen Y & Xu Q. (2010) A cis-phase interaction study of genetic variants within the MAOA gene in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 68(9):795-800.

- Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, Onaivi ES, Arinami T & Uhl GR. (2004) Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry*, 9(10):916-931.

- Zimmerman ME, DelBello MP, Getz GE, Shear PK & Strakowski SM. (2006) Anterior cingulate subregion volumes and executive function in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 8(3):281-288.

Anexos.

I- Ampliación de los datos referentes a los valores de edad en la población del estudio.

		Controles N=316	Esquizofrenia N=379	Psicosis Dual N=124	Trastorno Bipolar N=120	TUS N=71
% Varones		42,72	60,16	87,90	43,33	70,12
Edad presente	\bar{x} (S_x):	41,23 (15,78)	39,22 (10,54)	32,72 (8,54)	41,90 (11,77)	28,74 (6,29)
	M_e (P_{25} - P_{75}):	41 (27 – 65)	39 (32 – 45)	30 (27 – 39)	42 (34 – 52)	28 (25 – 34)
Edad de inicio	\bar{x} (S_x):		24,09 (6,61)	23,17 (5,45)	26,24 (9,84)	
	M_e (P_{25} - P_{75}):		23 (19 – 28)	22 (19 – 26)	24 (18 – 32)	
Años de evolución	\bar{x} (S_x):		15,13 (10,07)	9,55 (8,09)	15,66 (11,31)	
	M_e (P_{25} - P_{75}):		15 (7 – 22)	7 (3 – 16)	15 (7 – 22)	
Edad de inicio del consumo	\bar{x} (S_x):			17,76 (4,09)		16,83 (4,41)
	M_e (P_{25} - P_{75}):			17 (15 – 18)		16 (15 – 17)
Diferencia entre el inicio del consumo y el primer brote	\bar{x} (S_x):			5,41 (3,77)		
	M_e (P_{25} - P_{75}):			6 (1 - 10)		

Tabla I. Valores de edad en las poblaciones del estudio. \bar{X} : media. S_x : Desviación estándar. M_e : mediana. (P_{25} - P_{75}): percentiles 25 y 75 de la muestra.

II- Consumo de tabaco en los grupos sin TUS.

	Controles N=316	Trastorno Bipolar N=108	Esquizofrenia N=379
TABACO (%)	36,8	55,06	48,38
DOSIS TABACO (CIGARRILLOS/DÍA): \bar{X} ; Me (p25)	17; 20 (10)	21; 15(10)	28; 20(20)

Tabla II. Consumo de tabaco en las poblaciones sin TUS. Se muestra el porcentaje de consumidores de tabaco y la dosis en cigarrillos diarios de dichos consumidores. \bar{X} : media. Me (p25): mediana y percentil 25.

II- Prevalencias de consumo de otras sustancias en la muestra que presenta TUS por consumo de cannabis:

En la muestra de psicosis dual, el 52% presenta consumo exclusivo tabaco-cannabis, el 28% consumo de tabaco-cannabis y además otra sustancia, por último, el 21% pueden considerarse policonsumidores.

Los porcentajes en la Tabla II hacen referencia a la presencia de consumo de la sustancia sin que necesariamente se cumplan criterios de abuso o dependencia, incluyendo además consumos no actuales.

	Psicosis Dual N=124	Trastorno Bipolar + TUS N=12	TUS N=71
CANNABIS (CIGARRILLOS/DÍA): \bar{X} , Me (p25)	7,5; 6(3)	N.C. (*)	6; 6(3)
TABACO (%)	92,10	91,67	64,29
DOSIS TABACO (CIGARRILLOS/DÍA): \bar{X} , Me (p25)	22; 20(15)	20; 18(11)	13; 10(9)
ALCOHOL (%)	48,00	66,67	21,43
COCAÍNA (%)	32,67	50,00	10,71
OPIACEOS (%)	9,33	16,67	0,00
ANFETAMINAS (%)	1,32	0,00	0,00
OTRAS (%)	12,00	16,67	0,00

Tabla III. Porcentajes de prevalencia de consumo de diferentes sustancias en los consumidores de cannabis de la muestra. (*) N.C.: No Consta, el dato exacto de consumo no pudo registrarse. \bar{X} : media. Me (p25): mediana y percentil 25.

IV- Tratamientos utilizados en los distintos grupos de pacientes.

	Esquizofrenia	Psicosis Dual	Trastorno Bipolar
Risperidona	67,7	51,3	1,0
Olanzapina	34,4	28,9	7,1
Amisulpride	16,1	9,2	1,0
Quetiapina	14,0	3,9	
Clozapina	10,8	6,6	1,0
Ziprasidona	8,6	5,3	
Aripiprazol	6,5	6,6	1,0
Paliperidona	2,2	2,6	
Haloperidol	24,7	9,2	3,1
Flufenazina	14,0	10,5	
Benzodiacepina	24,3		25,5
Carbonato de Litio			60,2
Carbamazepina			20,4
Valproato			18,4
Lamotrigina			17,3
Topiramato			1,0

Tabla IV. Porcentajes de pacientes que son tratados con cada fármaco. Habitualmente son necesarios combinaciones de dos o más para el tratamiento adecuado a cada paciente.