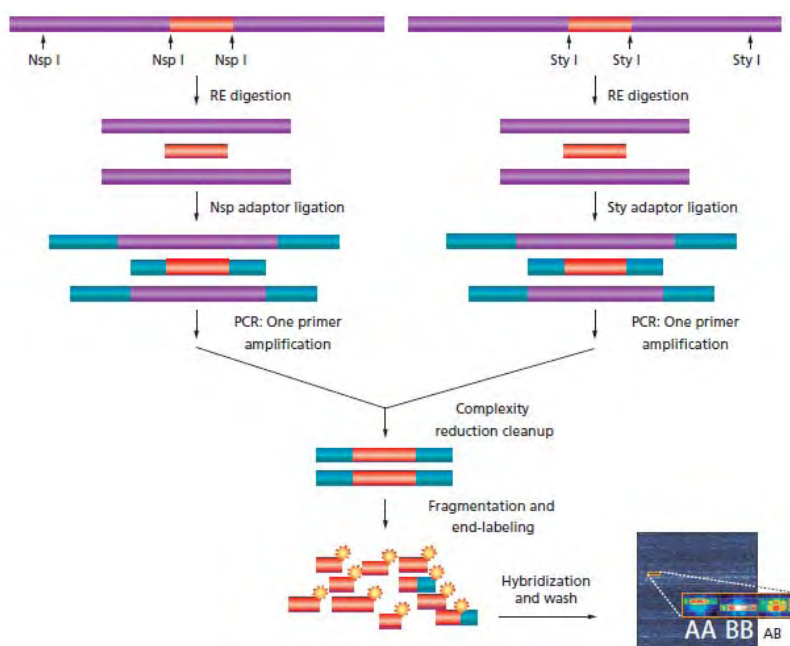
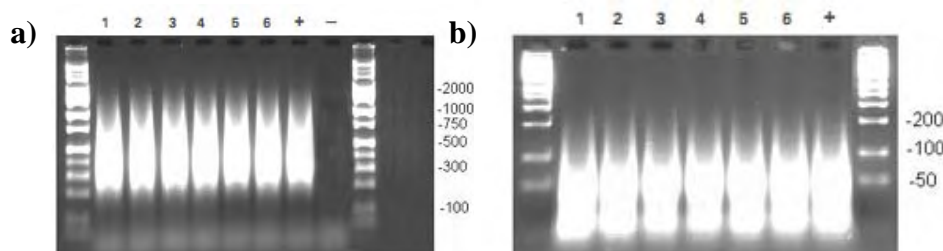


misturados e, em seguida, purificados por meio de esferas magnéticas (Agencourt – Coulter) e quantificados. As amostras devem estar numa concentração de cerca de 450,0 ng/μl. Na etapa seguinte os produtos de PCR foram fragmentados com DNaseI para gerar fragmentos de aproximadamente 50 pb a 200 pb (Figura 11b). As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5% para verificar o tamanho médio dos fragmentos e, posteriormente, realizar a marcação terminal dos fragmentos com Biotina - *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)*.



**Figura 10 – Esquema representativo das etapas envolvidas nos experimentos de *array Genome-wide 6.0 Affymetrix*.** Essas etapas envolveram a digestão com enzima de restrição, ligação com adaptadores, PCR, purificação, fragmentação e marcação terminal (*labeling*), hibridização, lavagem em estação fluidica e *scanner*. Obtida de <http://www.affymetrix.com>.



**Figura 11 – a) Gel de agarose 2% após a digestão com as enzimas *Sty I* e *Nsp I*, ligação dos adaptadores e a amplificação do DNA, mostrando um padrão de bandas de 200pb a 1100pb. b) Gel de agarose 3% após a digestão com *DNase I*, mostrando um padrão de bandas de 50pb a 200pb.**

A etapa seguinte é a hibridação, na qual foi preparado um coquetel, denominado coquetel de hibridação, contendo para cada amostra: 12  $\mu\text{L}$  de MES, 13  $\mu\text{L}$  de solução *Denhardt*, 3  $\mu\text{L}$  de EDTA, 3  $\mu\text{L}$  de esperma de salmão DNA (10 mg/mL), 2  $\mu\text{L}$  de reagente de controle de oligo, 3  $\mu\text{L}$  de *Human Cot-1 DNA* (1 mg/mL), 1  $\mu\text{L}$  de *Tween-20* (3%), 13  $\mu\text{L}$  de DMSO (100%) e 140  $\mu\text{L}$  de TMACL (5 M). Adicionaram-se 190  $\mu\text{L}$  do coquetel de hibridação em cada amostra e em seguida os tubos foram homogeneizados em vortex e levados ao termociclador onde passaram por uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 49 °C contínuos.

Após a desnaturação, 200  $\mu\text{L}$  de cada reação (coquetel de hibridação de cada amostra) foram colocados em um array *Genome-Wide Human SNP array 6.0* (Affymetrix, Santa Clara, EUA). A hibridação prosseguiu por 16 a 18 horas e foi realizada em forno de hibridação a 50°C com rotação de 60 rpm.

Após a etapa de hibridação, iniciou-se o processo de lavagem e marcação final (fluorescência) com SAPE (*Streptavidin-phycoerythrin*). A amostra foi removida do array e transferida para um novo tubo, podendo ser armazenada durante meses em caso de necessidade de repetição. Para lavagem foram utilizados dois tampões de lavagem, denominados A e B (SSPE 20x), o anticorpo biotilado anti-estreptavidina (0,5mg/mL), tampão MES e SAPE. Todas as etapas de lavagem foram realizadas de modo automatizado em estação fluídica especial (Fluidic Station 450 – Affymetrix, Santa Clara, EUA)

### 3.8.2 Análise dos Dados

Os arrays foram submetidos à leitura em *Scanner 7G Affymetrix* de alta resolução. As análises primárias de conversão de imagem foram realizadas utilizando o *software Genotyping Console 3.0.2* (Affymetrix, Santa Clara, EUA). O *software* utiliza um algoritmo especial (*Birdseed<sup>3</sup> v1*) para totalizar o sinal das *probes* de SNPs e criar a informação final de controle de qualidade (CQ)

Em seguida utilizamos o *software Partek Genomics Suite* ([www.partek.com](http://www.partek.com)) para investigar possíveis ampliações, deleções e ou duplicações que podem ser novos CNVs ou já descritos e catalogados. Consideramos apenas as sondas não-polimórficas (CNVs) e excluimos as sondas de SNPs da análise, uma vez que, por ser um *pool* de amostras de DNA, múltiplos genótipos seriam encontrados para cada loco polimórfico, e isto poderia perturbar os algoritmos que poderiam gerar dados com pouca confiabilidade. Além disso, utilizamos outro *software*, o *PennCNV* (<http://www.openbioinformatics.org/penncnv/>), para a confirmação dos nossos achados. O *software Partek Suite* permite uma análise com dois algoritmos diferentes para a análise de CNVs: o *Hidden Markov Model* (HMM) e o *circular binary segmentation*; e o *PennCNV* foi desenvolvido no algoritmo HMM.

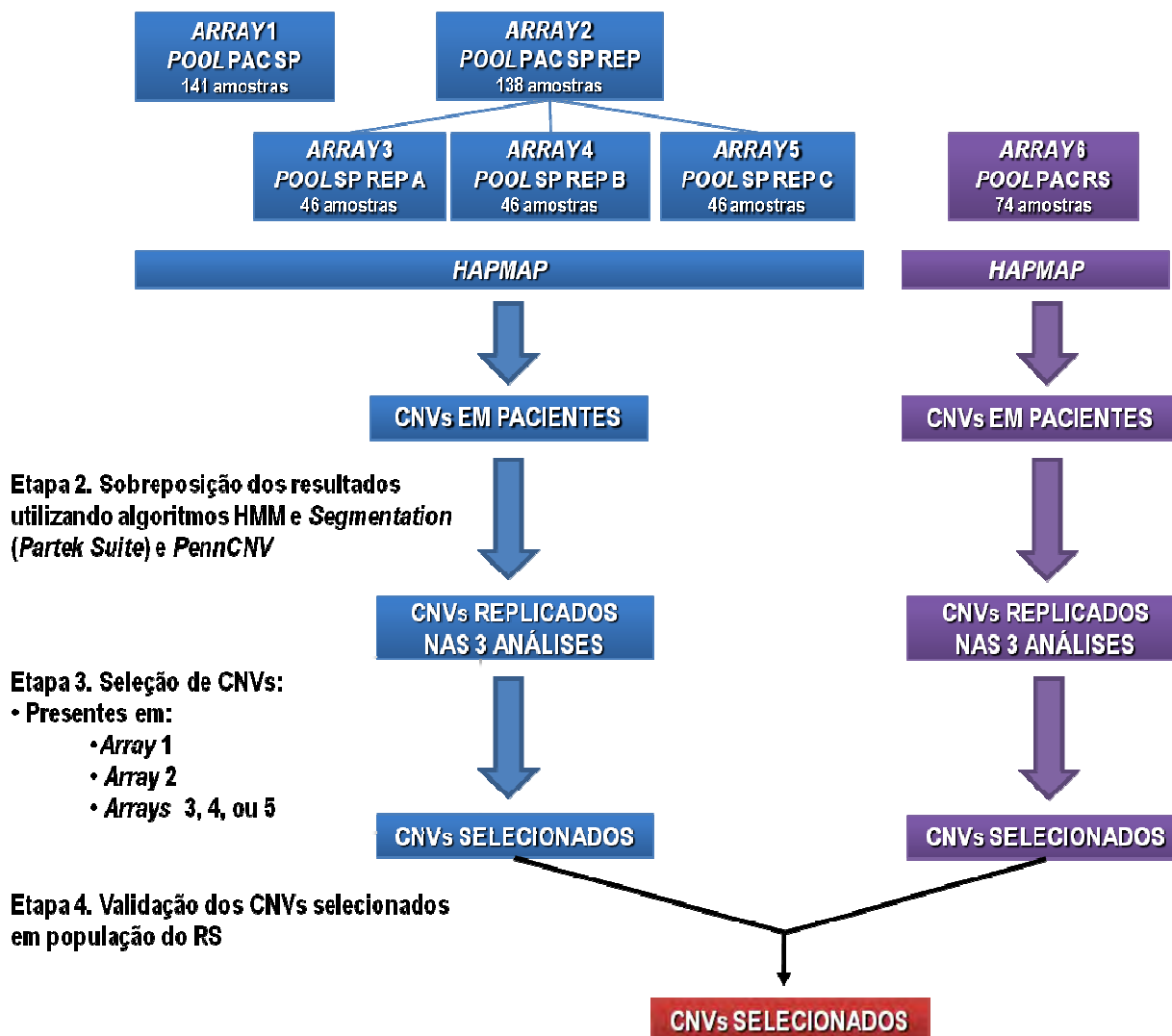
Com o algoritmo HMM é possível determinar os estados de números de cópias classificado de acordo com o estado (0, 1, 2, 3, 4), onde: estado 0 = deleção em homocigose; estado 1 = deleção em heterocigose; estado 2 = diplóide normal; estado 3 = ganho de uma única cópia e estado 4 = ganho de duas cópias. Os desequilíbrios foram determinados com base das razões  $\log_2$  das intensidades obtidas, e as sequências foram consideradas amplificadas ou deletadas quando ultrapassaram a variação de três desvios padrão. Existem diversas ferramentas nos *softwares* que possibilitam a interligação dos achados com bancos de dados externos (*UCSC* - <http://genome.ucsc.edu/>, *Toronto DGV* - <http://projects.tcag.ca/variation/> e *Ensembl* - <http://www.ensembl.org/index.html>).

O algoritmo *circular binary segmentation* traduz as medidas de intensidade de ruídos, segmentando os cromossomos em regiões contíguas, que podem estar amplificadas, normais ou deletadas (Olshen et al, 2004).

Foram gerados relatórios por estes *softwares*, a partir dos quais foram analisados os dados, com relação à frequência de ampliações e deleções apresentadas nos *pools* de pacientes com esquizofrenia, comparando-se os resultados obtidos com um banco de sequências genômicas de indivíduos normais do *HapMap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como utilizamos três análises (*Circular binary segmentation* e HMM do *Partek Suite* e *PennCNV*), os resultados foram sobrepostos, a fim de investigar CNVs que estivessem presentes em todas as análises.

Foram considerados CNVs relevantes regiões genômicas que se apresentasse amplificadas ou deletadas nos *pools* SP, SP REP e em pelo menos um *pool* subdividido (SP REP-A, SP REP-B ou SP REP-C). Além da sobreposição dos resultados em *pools*, essas alterações deveriam estar replicadas nas três análises com diferentes *softwares* (Figura 12).

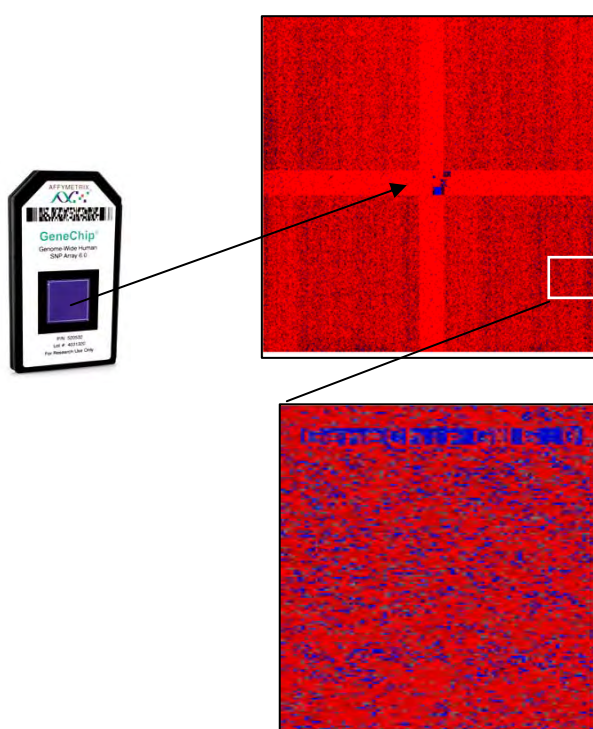
#### Etapa 1. Comparação de cada *Array* com o *HapMap*



**Figura 12 – Esquema da análise de *arrays*.** Na etapa 1, as seqüências genômicas dos *pools* foram comparados às do *HapMap*. Em seguida, foi feita uma sobreposição entre três análises utilizando o *software Partek Suite* (algoritmos HMM e *Segmentation*) e *PennCNV*. Na terceira etapa, foram selecionadas as CNVs que se replicavam nos dois *arrays* dos *pools* de São Paulo (*Arrays* 1 e 2) e em pelo menos um subdividido (*Arrays* 3, 4 e 5). Finalmente, as CNVs selecionadas foram validadas por meio daquelas encontradas no *pool* do Rio Grande do Sul. PAC: Paciente; SP: São Paulo; REP: Replicata; RS: Rio Grande do Sul; CNV: Variação em número de cópias; Hmm: *Hidden Markov Model*

### 3.8.3 Qualidade das análises

Após a leitura dos *arrays*, imagens são geradas e uma delas está representada na Figura 13, evidenciando a presença de uma “cruz” contendo as sondas de CNVs e os demais quadrantes contendo as sondas de SNPs e ainda uma região central que serve de controle de direcionamento para o *laser* do *scanner*. Esses dados representam os controles de qualidade de hibridação e indicam que a mesma ocorreu de forma correta.



**Figura 13 – Imagem gerada após “leitura” do *chip 6.0* utilizando o *software Partek Suite*.** A região de “cruz” contém as sondas de CNV e os demais quadrantes representam as sondas contendo os SNPs. A região central escura contém os controles internos de qualidade da hibridação. Na lateral do *array* existem sondas que são marcadas em forma do nome do *chip* (*Gene Chip GW 6.0*), o que garante sucesso de hibridação quando acesas.

## Análise estatística

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados foram calculadas por contagem de alelos como descrito por Emery (1986) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado por meio de teste de qui-quadrado.

Os resultados obtidos referentes aos parâmetros do presente estudo foram submetidos a testes estatísticos adequados para cada variável estudada, de forma a avaliar a associação de variantes dos genes com os demais achados psiquiátricos, neuropsicológicos e neuroestruturais.

A análise estatística foi realizada por meio dos *softwares* SPSS®15.0 e STATISTICA 7. Para as variáveis contínuas primeiramente foi verificada a normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk e assim foram utilizados testes paramétricos (testes *t-student*, ANCOVA e Modelo Linear Geral (GLM - *General Linear Model*) ou não paramétricos (testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) dependendo das suas distribuições. Para as variáveis categóricas, foram utilizados o teste de qui-quadrado e a análise de regressão logística. Para a análise de haplótipos, foram utilizados os *softwares* HaploVIEW, *Linkage Disequilibrium Analyser* (LDA) e SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) (Sole et al, 2006). O índice de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da casuística

Os grupos de indivíduos controles e portadores de esquizofrenia foram comparados quanto a sexo, idade e ancestralidade para verificar diferenças e corrigi-las. Utilizando o teste Shapiro-Wilk, foi observado que as variáveis idade na primeira consulta, ancestralidade europeia, africana e nativo americana não apresentavam uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, utilizando o teste Mann-Whitney, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto à idade na primeira consulta ( $p = 0,204$ ), ancestralidade africana ( $p = 0,423$ ), europeia ( $p = 0,532$ ) e nem ancestralidade nativo americana ( $p = 0,648$ ). Por meio do teste de qui-quadrado, foi observado que os grupos de pacientes com esquizofrenia e de indivíduos controles diferiram quanto a sexo ( $\chi^2 = 7,138$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,008$ ). Assim, a variável sexo foi utilizada como covariável nos testes de associação.

### 4.2 Avaliação genético-clínica

A avaliação genético-clínica, descrita anteriormente, foi realizada em 134 pacientes com esquizofrenia (Tabela 3). Para o refinamento do estudo, foram adicionados o exame de ecocardiograma, para investigar alterações cardíacas, e a dosagem de cálcio sérico, para investigar hipocalcemia, que são sinais fenotípicos da 22q11DS (Tabela 3).



Tabela 3 – Descrição clínica do fenótipo dos portadores de esquizofrenia.

Variável	Sem deleção 22q11.2	
	P/I	Frequência
Alterações psiquiátricas	129/129	100%
Problemas de sociabilização	129/129	100%
Alterações oftalmológicas	69/127	54,3%
Fenda palpebral oblíqua para baixo	33/129	25,6%
Comissuras labiais voltadas para baixo	30/129	23,3%
Hélices das orelhas superespessadas	22/129	17,0%
Hipoplasia alar	11/128	8,6%
Alteração cardíaca	3/43	7,0%
Perda auditiva	7/129	5,4%
Insuficiência velofaríngea	6/129	4,6%
Voz nasalada/aguda e fina	5/129	3,9%
Hipotonia	3/129	2,3%
Fenda palatina	1/129	0,7%
Hipocalcemia	0/144	0%

P/I: número de pacientes com a característica em relação ao total de pacientes investigados para a característica

### 4.3 Análise genética

#### 4.3.1 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada em 191 pacientes portadores de esquizofrenia e os resultados dessa análise estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resumo dos resultados de análise citogenética dos pacientes com esquizofrenia.

Variável	N	Frequência
<b>Cariótipo</b>	191	
46,XY	125	65,44%
46,XX	60	31,41%
46,XY,9ph	2	1,05%
46,XX,9ph	2	1,05%
46,XY,inv(16)(p11.2q12.1)	2	1,05%

9ph: presença de heterocromatina somente em p (braço curto)

Inv(16): inversão do cromossomo 16

N: Tamanho amostral

Todos os indivíduos apresentaram resultados normais e entre eles foram identificados quatro pacientes que apresentaram cariótipo 46,XY,XX,9ph, o que configura a presença de heterocromatina somente no braço curto do cromossomo 9, e dois pacientes com cariótipo 46,XY,inv(16)(p11.2q12.1), que configura uma inversão pericêntrica no cromossomo 16, heteromorfismos cromossômicos considerados como variantes normais na população.

### 4.3.2 Análise molecular da deleção 22q11.2 por meio da técnica de MLPA

Dentre os 157 pacientes analisados por MLPA, 156 não demonstraram alterações do número de cópias das sondas avaliadas (Figura 14).

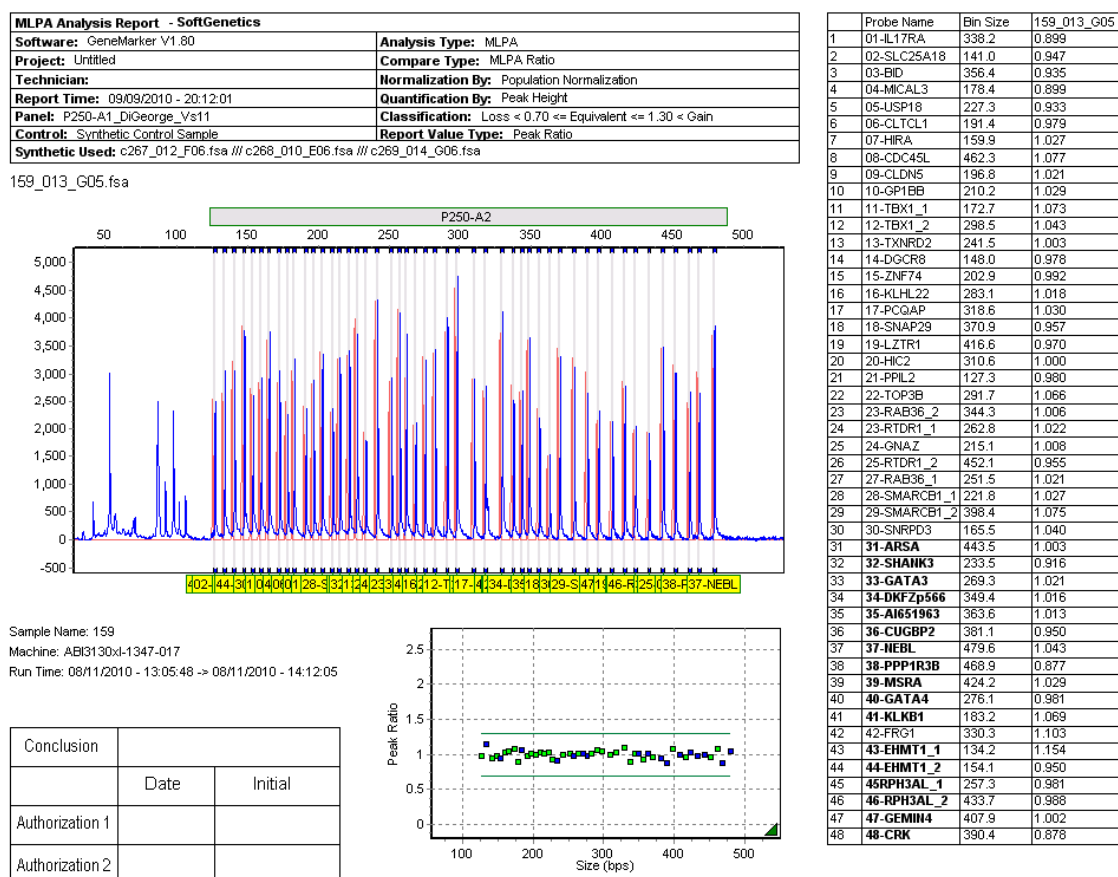
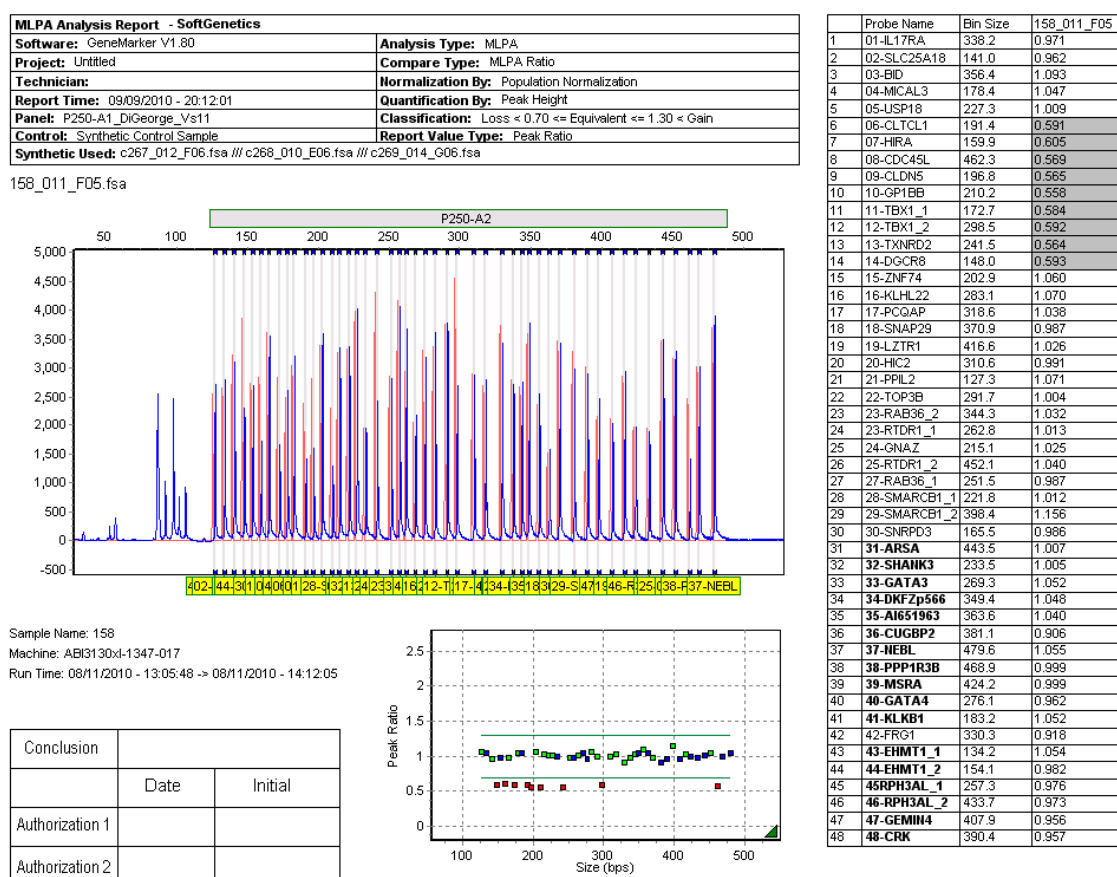


Figura 14 – Resultado normal da MLPA obtido por meio do software GeneMarker de um dos pacientes (T159) sem alteração no número de cópias para todas as regiões estudadas. A ausência de variação no número de cópias de cada região pode ser visualizada pelas alturas dos picos (diagrama superior) e na forma de pontos (diagrama inferior). As regiões estudadas estão dispostas na tabela à esquerda.

Foi identificada a deleção 22q11.2 em apenas um dos 157 (0,6%) pacientes estudados por MLPA (Christofolini et al, submetido para a revista *Schizophrenia Research*). Esse paciente apresenta uma deleção de 1,5 Mb, que inclui a região compreendida entre as *Low Copy Repeat-A* (LCR-A) e *Low Copy Repeat-B* (LCR-B) indicada pela presença de apenas uma dose das regiões correspondentes às sondas 06-CLTCL1, 07-HIRA, 08-CDC45L, 09-CLDN5, 10-GP1BB, 11-TBX1, 12-TBX1-2, 13-TXNRD2 e 14-DGCR8 (Figura 15).

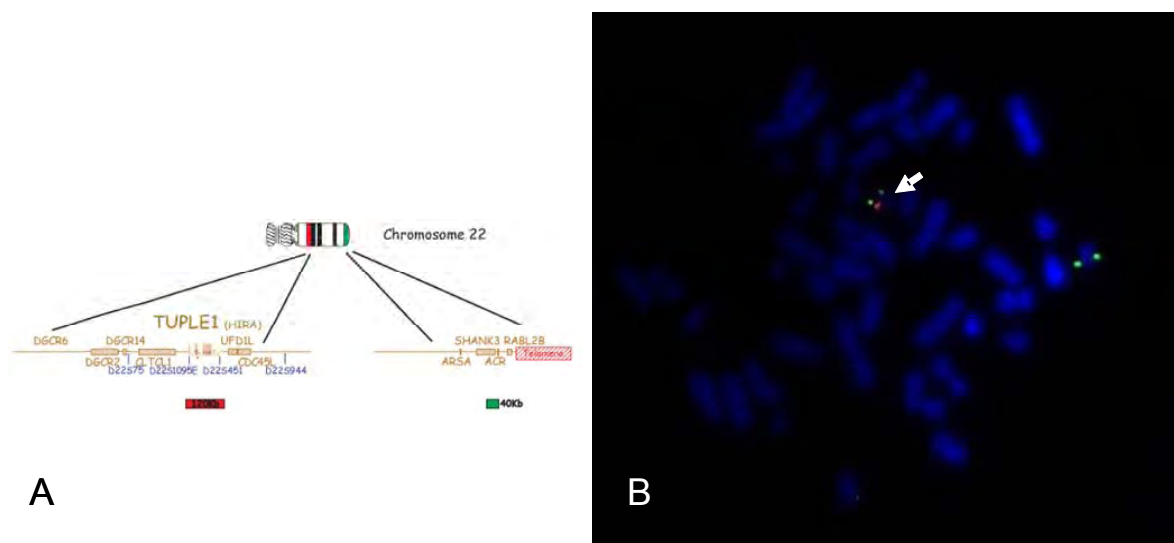


**Figura 15 – Resultado da MLPA obtido por meio do software GeneMarker do paciente (T158) portador da deleção de 1,5Mb em 22q11.2.** A variação no número de cópias de cada região pode ser visualizada por diferenças de altura dos picos (diagrama superior) e na forma de pontos fora da região de normalidade (diagrama inferior). As regiões estudadas estão dispostas na tabela à esquerda. Em cinza estão destacadas as regiões em monossomia.

### 4.3.3 Análise da deleção 22q11.2 por meio da técnica de FISH

A confirmação da deleção encontrada no paciente T158 pela técnica de MLPA foi realizada por FISH utilizando uma sonda específica para a região 22q11.2. Essa sonda de DNA tem cerca de 120 kb e hibrida com o gene *TUPLE1*, localizado entre as LCRs A e B.

Neste paciente, a deleção foi confirmada, uma vez que foi observado apenas um sinal da região 22q11.2 (sonda com marcação em vermelho) e dois sinais da sonda controle (sonda com marcação em verde), por célula, como observado na Figura 16, de forma que a nomenclatura citogenética para essa paciente, de acordo com o ISCN (Shaffer et al, 2009) pode ser representada como 46,XY,ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE 1-).



**Figura 16 – a) Esquema das sondas utilizadas para o estudo do cromossomo 22 e b) metáfase provenientes de cultura de linfócitos mostrando a presença de uma cópia da região 22q11.2 (sinal vermelho), indicado pela seta e a presença de duas cópias (uma em cada cromossomo 22) da região controle mapeada em 22q13.33 (sinal verde).**

Os pais do paciente também foram investigados e apresentaram cariótipo normal e ausência da deleção 22q11.2. Portanto, essa informação permite concluir que a deleção ocorreu *de novo*.

#### 4.3.4 Avaliação genético-clínica do paciente portador da deleção 22q11.2

O paciente portador da deleção 22q11.2 é do sexo masculino, primeiro de três filhos saudáveis de pais não consanguíneos. A gestação foi sem intercorrências e o parto a termo, com peso e comprimento normais, dentro do percentil 50 (3,750 Kg e 52 cm, respectivamente). A mãe referiu problemas de sucção no período pré-natal e alguns episódios de convulsão que cessaram após intervenção medicamentosa. Não foram relatados engasgos frequentes. O desenvolvimento psicomotor foi levemente atrasado. Em relação ao desenvolvimento cognitivo, apresentou problemas de aprendizado e dificuldade na socialização. Apresentou otite frequente durante a infância.

O primeiro evento psicótico ocorreu aos 26 anos. Entretanto, a família observou um comportamento inconstante e agressivo, com períodos de alienação desde a infância. Aos 30 anos e 10 meses, sua estatura era de 182,5 cm, peso de 143 Kg e circunferência da cabeça de 60 cm (perc>97%), mostrando obesidade (IMC=42,9) e macrocrania. O paciente apresentou face alongada, testa curta, fendas palpebrais estreitas e oblíquas voltadas para baixo, ponte nasal proeminente com ponta nasal bulbosa, hipoplasia alar, filtro longo e discreto, orelhas pequenas com lóbulos achatados, palato alto e estreito, mancha hiperocrômica no tórax com contorno irregular e maior diâmetro de 10 cm, sugerindo nevus. Os níveis de cálcio sérico estavam normais e o ecocardiograma não mostrou nenhuma alteração cardíaca estrutural. O paciente não apresentou fala nasalada nem insuficiência velofaríngea. O artigo referente a este caso encontra-se em preparo (Christofolini et al, em preparo).

#### 4.3.5 Gene *UFD1L*

Ao todo, foram genotipados 188 portadores de esquizofrenia para o polimorfismo rs5992403, 178 para o rs1547931 e 180 para o rs5746744. Essa diferença se deve à falta de amostras biológicas e à metodologia empregada para a

detecção dos genótipos rs1547931 e rs5746744, uma vez que esses foram investigados posteriormente e por RFLP, uma técnica menos sensível que a genotipagem por PCR Tempo Real. Um total de 199 indivíduos controles foram genotipados para os três polimorfismos, sendo que as frequências genotípicas e alélicas encontradas estão descritas na Tabela 5.

**Tabela 5 – Frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos do gene *UFD1L* e associação dos genótipos com esquizofrenia por meio da análise de regressão logística.**

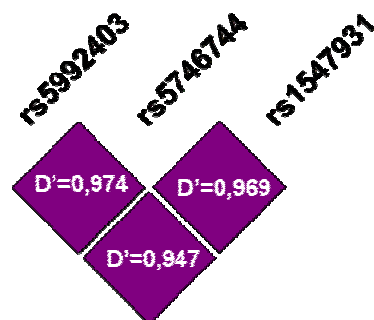
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Alelo (%)</b>		<b>Genótipo (%)</b>			<b>p<sub>genótipo</sub></b>
<b>rs5992403</b>		<b>Alelo A</b>	<b>Alelo G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
Casos	188	53,72	46,28	30,3	46,8	22,9	0,380
Controles	199	50,25	49,75	24,1	52,3	23,6	
<b>rs1547931</b>		<b>Alelo G</b>	<b>Alelo C</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>	
Casos	178	83,99	16,01	71,3	25,3	3,4	0,696
Controles	199	85,43	14,57	74,4	22,1	3,5	
<b>rs5746744</b>		<b>Alelo G</b>	<b>Alelo C</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>	
Casos	180	83,61	16,39	71,1	25,0	3,9	0,618
Controles	199	85,93	14,07	75,4	21,1	3,5	

N: Tamanho amostral

Por meio do teste de qui-quadrado, foi observado que as distribuições genotípicas tanto no grupo de pacientes quanto no de controles dos três polimorfismos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). Utilizando a análise de regressão logística e tendo sexo como covariável, nenhum dos genótipos dos polimorfismos investigados foram fatores de risco para a esquizofrenia ( $p > 0,05$ ), conforme representado na Tabela 5.

#### 4.3.5.1 Análise de haplótipos do gene *UFD1L*

Por meio dos *softwares* HaploVIEW e LDA, foi verificado que todos os três polimorfismos do gene *UFD1L* estavam em desequilíbrio de ligação, sendo que os valores de  $p$  e  $D'$  estão representados na Figura 17. Os haplótipos que apresentaram frequência menor que 1% não foram considerados. As frequências dos haplótipos GGG, GGA e CCA foram, respectivamente: 0,478; 0,367 e 0,147.



**Figura 17 – Esquema de desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos do gene *UFD1L*.** Valores de  $D'$  estão representados na figura. Todos os polimorfismos se encontram em desequilíbrio de ligação ( $p < 0,01$ ). Os polimorfismos rs5992403 e rs5746744 estão em forte ligação ( $D' = 0,974$ ), assim como os rs5746744 e rs1547931 ( $D' = 0,969$ ) e os rs5992403 e rs1547931 ( $D' = 0,947$ ).

Utilizando o teste de qui-quadrado, não foi encontrada associação entre nenhum dos haplótipos compostos tanto por três polimorfismos quanto por dois deles, como representado na Tabela 6.

**Tabela 6 - Frequências dos haplótipos total, no grupo de casos e no de controles e resultados dos testes de qui-quadrado para os haplótipos dos polimorfismos do gene *UFD1L*.**

Haplótipo	Frequência total	Casos	Controles	p
<b>rs5992403-rs1547931-rs5746744</b>				
GGG	0,478	0,461	0,493	0,384
GGA	0,367	0,376	0,359	0,633
CCA	0,147	0,157	0,138	0,454
<b>rs1547931-rs5746744</b>				
GG	0,845	0,837	0,852	0,573
CC	0,147	0,157	0,138	0,454
<b>rs5992403-rs5746744</b>				
GG	0,482	0,463	0,500	0,315
GA	0,366	0,374	0,359	0,686
CA	0,149	0,160	0,140	0,455
<b>rs5992403-rs1547931</b>				
GG	0,480	0,465	0,494	0,425
GA	0,368	0,377	0,360	0,625
CA	0,147	0,156	0,140	0,525

#### 4.3.5.2 Gene *UFD1L* e idade de acometimento

Dado que o gene *UFD1L* está expresso durante o neurodesenvolvimento, foi avaliado se polimorfismos nesse gene poderiam estar

associados à idade de acometimento. Por meio do teste de Krukal-Wallis, não foi encontrada nenhuma associação entre os genótipos e a idade de acometimento (Tabela 7) nem com os seus haplótipos.

**Tabela 7. Médias e desvios padrão das idades de acometimento da esquizofrenia para cada genótipo dos polimorfismos do gene *UFD1L* e resultados do teste de Kruskal-Wallis associando os genótipos com a idade de acometimento.**

Polimorfismo	N	Médias±DP			p
		AA	AG	GG	
rs5992403	178	22,30±6,85	23,42±6,26	24,54±9,46	0,376
rs1547931	168	23,51±7,42	22,88±7,12	25,67±4,18	0,329
rs5746744	170	23,27±7,25	22,49±6,90	27,00±5,20	0,126

N: Tamanho amostral; DP: Desvio padrão

Apesar desses resultados, também foi investigado se os polimorfismos do gene *UFD1L* poderiam ser fatores de risco para um subtipo precoce de esquizofrenia (acometimento abaixo de 18 anos) (Rapoport et al, 2005). Dessa forma, os pacientes foram separados em dois grupos de acordo com a idade de acometimento: Grupo I (acometimento precoce: < 18 anos) e Grupo II (acometimento tardio: ≥ 18 anos). As frequências dos genótipos e os resultados estão descritos na Tabela 8.

**Tabela 8 – Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene *UFD1L* quanto aos grupos separados por idade de acometimento da esquizofrenia (Grupo I: < 18 anos e Grupo II: ≥ 18 anos) e resultados da análise de regressão logística.**

Grupo	N	Genótipo (%)			p
		AA	AG	GG	
<b>rs5992403</b>					
Grupo I (< 18 anos)	38	42,1	34,2	23,7	0,157
Grupo II (≥ 18 anos)	140	28,6	51,4	20,0	
<b>rs1547931</b>		GG	GC	CC	
Grupo I (< 18 anos)	35	68,6	31,4	0,0	0,762
Grupo II (≥ 18 anos)	133	71,4	24,1	4,5	
<b>rs5746744</b>		GG	GC	CC	
Grupo I (< 18 anos)	36	69,4	30,6	0,0	0,813
Grupo II (≥ 18 anos)	134	70,9	23,9	5,2	

N: Tamanho amostral;

Por meio da regressão logística, nenhum dos polimorfismos mostrou-se um fator de risco para os grupos separados por idade de acometimento ( $p > 0,05$ ) e nem os seus haplótipos. No entanto, ao assumir um modelo sobredominante



e ajustando para sexo, foi observado que, para o polimorfismo rs5992403, o heterozigoto AG era fator de proteção para o grupo de esquizofrenia de acometimento precoce ( $p=0,042$ ;  $OR=0,46$ ;  $IC95\%=0,22-0,99$ ) quando comparado aos homozigotos AA e GG. Dessa forma, a presença das duas variantes parece propiciar à esquizofrenia de início mais tardio, enquanto que a homozigose desses alelos parece estar associada à esquizofrenia de início mais precoce. Resultados preliminares do polimorfismo rs5992403 em relação à idade de acometimento foram publicados no periódico *Journal of Psychiatric Research* (Anexo VII).

#### 4.3.5.3 Gene *UFD1L* e refratariedade ao tratamento com antipsicóticos

O grupo de portadores de esquizofrenia foi separado em pacientes refratários ou não ao tratamento com antipsicóticos a fim de avaliar se os polimorfismos do gene *UFD1L* poderiam contribuir para a resposta a drogas. Como a refratariedade estava associada à idade de acometimento ( $p=0,016$ ), esta foi adicionada como covariável.

**Tabela 9 – Frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene *UFD1L* quanto aos grupos de refratário e não refratário e resultados da análise de regressão logística.**

Grupo	N	Genótipo (%)			p
<b>rs5992403</b>		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
Não refratário	69	29,0	50,7	20,3	0,951
Refratário	54	31,5	48,1	20,4	
<b>rs1547931</b>		<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>	
Não refratário	64	76,6	23,4	0,0	0,986
Refratário	53	71,7	22,6	5,7	
<b>rs5746744</b>		<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>	
Não refratário	64	75,0	23,4	1,6	0,353
Refratário	54	72,2	22,2	5,6	

No entanto, por meio da regressão logística, não foi encontrado nenhum fator preditor para refratariedade, além da idade de acometimento, como descrito na Tabela 9, e nem quando foram analisados os haplótipos.

#### 4.3.5.4 Gene *UFD1L* e neuropsicologia

Foram avaliados 109 portadores de esquizofrenia para os polimorfismos rs1547931 e rs5746744 e 115 para o rs5992403. Devido a frequência de homozigotos CC, portadores desse genótipo foram agrupados com os heterozigotos GC para os SNPs rs1547931 e rs5746744. Foi realizada uma ANCOVA para observar diferenças de desempenho em escores de testes neuropsicológicos tendo os três SNPs como variáveis independentes, e as medidas neuropsicológicas como variáveis dependentes. Variáveis como idade, escolaridade e quociente de inteligência foram inseridas como covariáveis, uma vez que estavam significativamente correlacionadas às variáveis neuropsicológicas em estudo. Os resultados significantes ou com tendência à significância estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 10 – Resultados da ANCOVA, com idade, escolaridade e quociente de inteligência como covariáveis, apresentando as variáveis neuropsicológicas em associação com os genótipos dos polimorfismos do gene *UFD1L*.**

Variáveis	N	Médias ± DP			p
		GG	GC + CC		
<b>rs1547931</b>	<b>109</b>				
Hopkins 2		5,68±0,20	6,54±0,31		0,022
Hopkins 3		6,93±0,23	8,04±0,36		0,010
Hopkins evocação		4,32±0,21	5,52±0,33		0,030
Perseveração		21,52±1,33	16,88±2,07		0,064
Lista de palavras		12,52±0,37	14,18±0,58		0,017
<b>rs5746744</b>	<b>109</b>				
Hopkins 2		5,66±0,20	6,47±0,30		0,029
Hopkins 3		6,93±0,23	8,06±0,35		0,008
Hopkins evocação		4,30±0,22	5,48±0,33		0,003
Lista de palavras		12,44±0,37	14,20±0,56		0,011
<b>rs5994203</b>	<b>115</b>				
Hopkins 3		6,91±0,35	7,77±0,26	6,47±0,38	0,012
Hopkins evocação		4,47±0,35	5,11±0,26	4,05±0,37	0,054
Perseveração		24,10±2,06	17,68±1,52	20,94±2,22	0,043

N: Tamanho amostral; DP: Desvio padrão

Os portadores dos alelos polimórficos C tanto do SNP rs1547931 quanto do rs5746744 apresentaram um melhor desempenho no teste HVLT-R na segunda e terceira evocações, bem como na evocação tardia.

Já pelos testes WCST e Lista de Palavras foi possível verificar um melhor desempenho nos portadores do alelo C do rs1547931. Para o rs5746744, os portadores do alelo C também foram melhores no teste Lista de Palavras.

Os heterozigotos AG (rs5992403) apresentaram médias de acerto maiores do que os homozigotos GG para o HVLTR utilizando o *post hoc* Bonferroni (Hopkins 3:  $p=0,017$ ; Hopkins evocação:  $p=0,064$ ). Os heterozigotos AG também apresentaram um melhor desempenho no teste WCST quando comparados aos portadores do genótipo AA ( $p=0,04$ ).

#### **4.3.5.5 Gene *UFD1L* e neuroimagem**

Em relação ao polimorfismo do gene *UFD1L*, foram avaliados 147 pacientes portadores de esquizofrenia. Para o polimorfismo rs5992403 foi encontrado um aumento significativo do volume no córtex frontal direito (giro frontal inferior) (MNI  $x,y,z= 45\ 1\ 42$ ) e na ínsula/putamen esquerdo (MNI  $x,y,z= -29\ -11\ 1$ ) nos portadores do genótipo AA quando comparados aos do genótipo AG do polimorfismo rs5992403 ( $p<0,05$ ). Além disso, tanto para o polimorfismo rs5746744 quanto para o rs1547931, ao se agrupar os heterozigotos GC com os homozigotos CC, foi observada uma redução do córtex frontal direito (MNI  $x,y,z= 45\ 2\ 43$ ) quando comparados aos portadores do genótipo GG ( $p<0,05$ ).

#### **4.3.6 Gene *ZDHC8***

Ao todo, foram genotipados 187 portadores de esquizofrenia e 199 indivíduos controles para o polimorfismo rs175174 do gene *ZDHC8*, sendo que as frequências genóticas e alélicas encontradas estão descritas na Tabela 11.

**Tabela 11 – Frequências dos genótipos do polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8* e associação dele com esquizofrenia por meio da análise de regressão logística.**

Grupo	N	Alelo (%)		Genótipo (%)			p
		Alelo A	Alelo G	AA	AG	GG	
Casos	187	57,75	42,25	35,8	43,9	20,3	0,218
Controles	199	56,78	43,22	30,7	52,3	17,1	

N: Tamanho amostral

Por meio do teste de qui-quadrado, foi observado que as distribuições genotípicas tanto no grupo de pacientes quanto no de controles se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). Utilizando a análise de regressão logística e tendo sexo como covariável, nenhum dos genótipos do polimorfismo investigado foi preditor da esquizofrenia ( $p = 0,218$ ), conforme representado na Tabela 11.

#### 4.3.6.1 Gene *ZDHHC8* e idade de acometimento

Dado que o gene *ZDHHC8* foi associado à esquizofrenia e é expresso no cérebro, foram investigadas associações do polimorfismo rs175174 e outras características clínicas, como idade de acometimento e refratariedade. Por meio do teste de Kruskal-Wallis, não foi encontrada nenhuma associação entre os genótipos e a idade de acometimento (Tabela 12).

**Tabela 12. Médias e desvios padrão das idades de acometimento da esquizofrenia para cada genótipo do polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8*, e resultados do teste de Kruskal-Wallis associando os genótipos com a idade de acometimento.**

Polimorfismo	N	Médias±DP			p
		AA	AG	GG	
rs175174	177	22,42±7,02	23,87±7,36	22,03±7,28	0,267

N: Tamanho amostral; DP: Desvio padrão

Apesar desses resultados, também foi investigado se o polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8* poderia ser fator de risco para um subtipo mais precoce da esquizofrenia (acometimento menor que 18 anos), da mesma forma que o gene *UFD1L*. As frequências dos genótipos e os resultados estão descritos na Tabela 13.

**Tabela 13 – Frequências dos genótipos do polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8* quanto aos grupos separados por idade de acometimento da esquizofrenia (Grupo I: < 18 anos e Grupo II: ≥ 18 anos) e resultados da análise de regressão logística.**

Grupo rs175174	N	Genótipo (%)			p
		AA	AG	GG	
Grupo I (< 18 anos)	37	37,8	29,7	32,4	0,020
Grupo II (≥ 18 anos)	140	34,3	48,6	17,1	

N: Tamanho amostral

Por meio da regressão logística, e tendo ancestralidade e sexo como covariáveis, foi observado que os genótipos do SNP rs175174 eram preditores do subtipo de esquizofrenia, sendo que o heterozigoto AG era fator de proteção para a esquizofrenia de acometimento precoce quando comparado ao homozigoto GG ( $p=0,07$ ; OR=0,22; IC95%=0,07-0,67) e ao homozigoto AA ( $p=0,035$ ; OR=0,33; IC95%=0,12-0,93).

#### 4.3.6.2 Gene *ZDHHC8* e refratariedade ao tratamento com antipsicóticos

O polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8* também foi investigado quanto a resposta a antipsicóticos. Para tanto foi utilizada a análise de regressão logística tendo a variável idade de acometimento como covariável.

**Tabela 14 – Frequências dos genótipos do polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8* quanto aos grupos de refratário e não-refratário e resultados da análise de regressão logística.**

Grupo rs175174	N	Genótipo (%)			p
		AA	AG	GG	
Não refratário	69	30,4	47,8	21,7	0,249
Refratário	54	42,6	40,7	16,7	

N: Tamanho amostral

No entanto, por meio da regressão logística, o polimorfismo rs175174 não foi fator preditor para refratariedade, como descrito na Tabela 14.

#### 4.3.6.3 Gene *ZDHHC8* e neuropsicologia

Foram avaliados 115 portadores de esquizofrenia para o polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8*. Foi realizado um teste ANCOVA para observar a associação dos genótipos com alguns aspectos neuropsicológicos. Idade, escolaridade e quociente de inteligência foram inseridos como covariáveis, uma vez que elas estavam correlacionadas com as variáveis neuropsicológicas em estudo. Os resultados significantes ou com tendência à significância estão descritos na Tabela 15.

**Tabela 15 – Resultados da ANCOVA, tendo idade, escolaridade, quociente de inteligência como covariáveis, apresentando as variáveis neuropsicológicas em associação com os genótipos do polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8*.**

Variáveis	N	Médias $\pm$ DP			p
		AA	AG	GG	
rs175174	115				
Lista de palavras		13,64 $\pm$ 0,53	13,36 $\pm$ 0,47	11,55 $\pm$ 0,73	0,060
UPsequence		121,09 $\pm$ 3,40	109,36 $\pm$ 3,01	114,73 $\pm$ 4,76	0,042

N: Tamanho amostral; DP: Desvio padrão

Para o teste Lista de Palavras, os portadores do genótipo AA apresentaram uma tendência de melhor desempenho que os homozigotos GG utilizando o *post-hoc* Bonferroni ( $p=0,068$ ) e também para outra variável medida pelo mesmo teste (UPsequence), os homozigotos AA foram melhores do que heterozigotos AG ( $p=0,036$ ).

#### 4.3.6.4 Gene *ZDHHC8* e neuroimagem

Quanto aos dados de neuroimagem, foram analisados 147 pacientes portadores de esquizofrenia. Foram encontradas associações entre o polimorfismo rs175174 e alterações em quatro regiões cerebrais: giro frontal inferior direito, hemisfério cerebelar direito, lóbulo parietal inferior direito (giro supramarginal) e lóbulo parietal inferior esquerdo.

Os portadores do genótipo GG apresentaram uma redução no giro frontal inferior direito quando comparados aos portadores do genótipo AA. Em adição, essa redução foi mantida quando assumimos um modelo recessivo agrupando os heterozigotos AG com os homozigotos AA e comparamos com os homozigotos GG.

Além disso, foi encontrada uma redução no hemisfério cerebelar direito nos heterozigotos AG quando comparados aos homozigotos AA e esse mesmo resultado foi encontrado quando assumimos um modelo dominante agrupando os portadores do alelo G (Genótipos AG e GG).

Alteração em uma terceira região também foi encontrada: portadores do genótipo AA apresentaram redução no lóbulo parietal inferior direito quando comparados aos homozigotos para o outro alelo. Também, ao agruparmos os portadores do alelo A (Genótipos AG e AA) foi identificada essa mesma alteração quando comparados aos homozigotos GG.

O modelo contrário, ou seja, comparando-se os homozigotos AA em relação aos portadores do alelo G, observou-se redução no lóbulo parietal inferior esquerdo nos portadores do genótipo AA. Os resultados da neuroimagem estão resumidos na Tabela 16.

**Tabela 16 – Resultados da análise de neuroimagem quanto ao polimorfismo rs175174 do gene ZDHHC8.**

Grupos de genótipos	Grupos de genótipos	Região	Alteração	Coordenadas	Z-score	ke
AA	GG	Giro frontal inferior direito	Redução em GG	46 14 14	3.57	678
AA + AG	GG	Giro frontal inferior direito	Redução em GG	45 12 14	3.50	54
AA	AG	Hemisfério cerebelar direito	Redução em AG	23 -68 -41	3.85	72
AA	AG + GG	Hemisfério cerebelar direito	Redução em AG + GG	21 -68 -40	3.35	100
GG	AA	Lobulo parietal inferior direito (giro supramarginal)	Redução em AA	55 -47 30	3.89	242
GG	AA + AG	Lobulo parietal inferior direito (giro supramarginal)	Redução em AA + AG	55 -47 30	3.68	142
AG + GG	AA	Lóbulo parietal inferior esquerdo	Redução em AA	39 -66 38	3.49	54

\*  $P < 0.05$ ; ke= extensão dos achados (número de voxels)

#### 4.3.7 Interação entre os genes *UFD1L* e *ZDHHC8*

Como ambos os genes *UFD1L* e *ZDHHC8* são expressos no cérebro, foi verificado se a interação entre polimorfismos desses dois genes poderia estar associada à etiologia da esquizofrenia, idade de acometimento e refratariedade.

Por meio da análise de regressão logística, não foi encontrada nenhuma associação entre a interação dos polimorfismos do gene *UFD1L* e o do *ZDHHC8* com a doença e nem com refratariedade ( $p > 0,05$ ).

Utilizando a análise de GLM, foi encontrada uma associação entre a interação dos polimorfismos rs5992403 (*UFD1L*) e rs175174 (*ZDHHC8*) e a idade de acometimento da esquizofrenia ( $p = 0,011$ ;  $\eta^2 = 0,079$ ; poder observado = 0,840). Utilizando o teste de *post hoc* de Bonferroni, foi observado que a associação estava presente quando se comparava a interação dos genótipos GG (rs5992403) e AG (rs175174) com a dos genótipos AA (rs5992403) e AG (rs175174) ( $p = 0,022$ ) e também com a dos genótipos AA (rs5992403) e GG (rs175174) ( $p = 0,029$ ). Os resultados dessa interação estão representados na Figura 18.

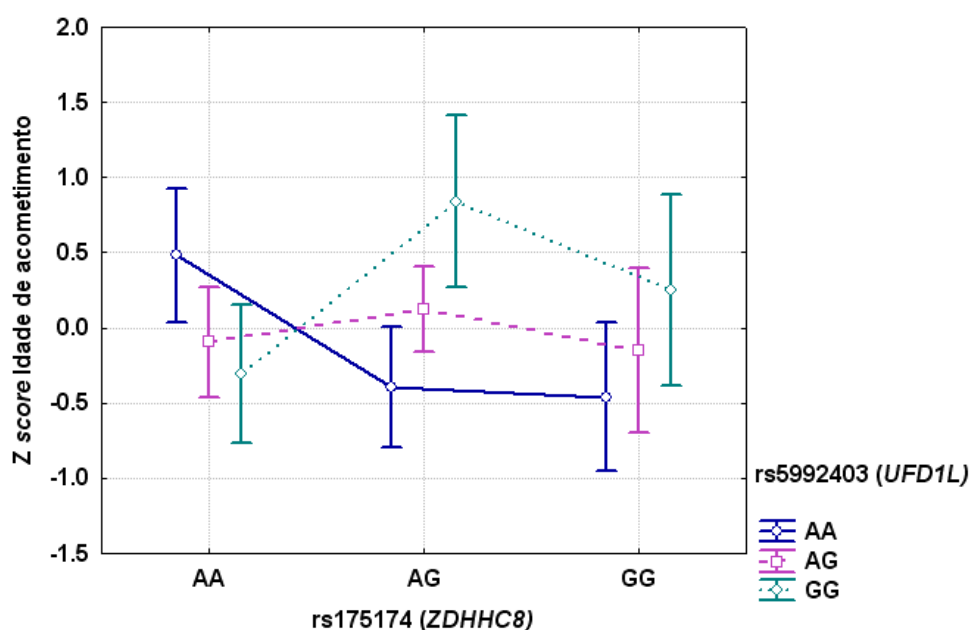


Figura 18 – Gráfico representando nas ordenadas os valores de idade de acometimento padronizados com Z score e nas abscissas os genótipos do polimorfismo rs175174 do gene *ZDHHC8* e nas linhas os do polimorfismo rs5992403 do gene *UFD1L*.



#### 4.3.8 Gene *TBX1* e a síndrome 22q11DS

Dentre os portadores do espectro da síndrome da deleção 22q11.2 foram selecionados 10 pacientes sem deleção da região 22q11.2 para sequenciar o gene *TBX1* a fim de investigar se o fenótipo era dado por mutações nesse gene. Esses pacientes foram selecionados pela presença de pelo menos dois sinais maiores como: fenda palatina, alterações psiquiátricas e alteração cardíaca.

Foram sequenciadas ambas as fitas dos éxons 1, 2, 4, 6, 7, 9B de 10 pacientes e o éxon 9A em 9 pacientes. Foram encontrados polimorfismos nos éxons 2, 4, 7 e 9A, como descrito na Tabela 17.

**Tabela 17 – Polimorfismos encontrados nos éxons 2, 4, 7 e 9A do gene *TBX1* e suas frequências.**

Éxon	Polimorfismo	Frequências dos genótipos encontrados na amostra (%)			
		N	1/1	1/2	2/2
Éxon 2	rs737868	10	6 (60,0)	3 (30,0)	1 (10,0)
Éxon 4	rs41298814	10	7 (70,0)	2 (20,0)	1 (10,0)
Éxon 7	rs41298836	10	8 (80,0)	2 (20,0)	0
	rs41298840	10	7 (70,0)	2 (20,0)	1 (10,0)
Éxon 9A	rs4819522	10	6 (60,0)	4 (40,0)	0
	rs41298008	10	9 (90,0)	1 (10,0)	0
	rs5746826	9	3 (33,3)	3 (33,3)	3 (33,3)

1/1: Homozigoto para o alelo comum;

1/2: Heterozigoto;

2/2: Homozigoto para o alelo polimórfico;

N: Número total de indivíduos analisados

#### 4.3.9 Análise de CNVs

Primeiramente foram excluídas as CNVs presentes nos cromossomos sexuais, dado que as nossas amostras eram *pools* de DNA. Em seguida, a partir da análise pelo algoritmo *circular binary segmentation*, foram verificadas as variações que estavam presentes no *pool* SP, no SP REP e em pelo menos um subdividido (SP REP-A, SP REP-B, SP REP-C). As regiões encontradas amplificadas ou deletadas foram sobrepostas nos resultados com o *software PennCNV*. Também foram verificadas se