

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**Investigação dos genes *CNR1* e *AKT1* como possíveis fatores de
risco/proteção para a esquizofrenia.**

Vinicius Colonese Mrad

Orientadora: Profa. Sintia Iole Nogueira Belangero

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de
Botucatu – UNESP, como
exigência parcial para a obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Mrad, Vinicius Colonese.

Investigação dos genes *CNRI* e *AKTI* como possíveis fatores de risco/proteção para a esquizofrenia / Vinicius Colonese Mrad. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Sintia Iole Nogueira Belangero

Coorientador: Marília de Arruda Cardoso Smith

Capes: 20205007

1. Genética humana. 2. Esquizofrenia – Aspectos genéticos.

Palavras-chave: *AKTI*; *CNRI*; Esquizofrenia; Genotipagem.

“Um homem não pode fazer o certo numa área da vida, enquanto está ocupado em fazer o errado em outra. A vida é um todo indivisível.”

Mahatma Ghandi

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Marcos e Daniela, por todo o apoio e carinho que me deram durante esses quatro anos. Obrigado por todos os ensinamentos e por todas as oportunidades. Seguir o exemplo de vocês é um grande desafio, espero um dia ser metade da pessoa que vocês são. Amo muito vocês!

À minha irmã, Mariana, que eu amo tanto e sempre estive ao meu lado pra tudo que eu precisei. Saiba que sempre estarei preparado pra tudo que você precisar.

Ao meu avô, Abílio Colonese, que foi embora antes do tempo. Tenho certeza que ele gostaria muito de ver seu neto mais velho se formando, pois educação foi algo que ele sempre prezou demais! Esteja onde estiver, saiba que me apoiei muito na sua força e nos seus conselhos. Muito Obrigado.

Agradeço

À minha orientadora, Sintia, por abrir as portas do laboratório e me ensinar como ser um pesquisador. Durante esse ano, ela conseguiu ser uma grande orientadora, uma ótima amiga e uma mãezona, afinal, precisava treinar para a Laurinha! Você é o exemplo de profissional que almejo me tornar. Obrigado por tudo.

A toda a equipe da esquizo, Vanessa, Marcos, Letícia e Gabriel, por ser um grupo sempre disposto a ajudar. Um agradecimento especial a Vanessa Ota, por todo o auxílio disponibilizado na realização desse trabalho, ótimos conselhos e grande amizade.

A todos os amigos da Disciplina de Genética da UNIFESP por todas as conversas em momentos difíceis, por todas as risadas nos momentos alegres, por todas as cervejas divididas nos barzinhos e nos “banhos” e por todo o carinho no momento em que os novatos, como eu fui, chegam à família Genética. Vocês são grandes profissionais e ótimos amigos.

À equipe do Laboratório Interdisciplinar de Neurociências Clínicas, principalmente ao Professor Rodrigo Bressan, Professor Jair Mari e aos psiquiatras Airton, Ary e Deyvis, pela grande colaboração nesse projeto e por todo o apoio concedido dentro do LINC.

Aos meus amigos da Biomed XLIV, Patrícia (Sê), Mariana (Hips), Grazielle (1/2ão), Vanessa (Lolo), Iberê (Eto), Melina (Piru), Thaís (Miss), Natasha (Fléx) e Janaina (Mits), por dividirem comigo momentos que vou levar pra sempre e lembranças que vou guardar com muito carinho. Vocês foram essenciais na minha graduação.

Um agradecimento especial a quatro pessoas que mudaram meu ano de 2011. Morar em São Paulo não teria sido tão prazeroso sem vocês por perto, Bianca (Péks), Camila (Mosquete) e

Marina (Pi); obrigado pela amizade incondicional. Ao meu grande amigo, Felipe (Borra), obrigado por me receber sempre com muita alegria quando eu precisei ir pra Botucatu. Contem sempre comigo.

Aos meus amigos de São Paulo, Izabela e Thiago, por todo o apoio nos momentos difíceis e por toda a diversão que passamos juntos.

Aos meus companheiros de lar, minha família paulistana, Bruno Calegare e Rodrigo Affonso. Morar com vocês foi minha distração e meu escape da vida de laboratório, que muitas vezes nos esgota. Tive muita sorte de ter encontrado um lugar tão bom e com pessoas tão fantásticas pra morar. Obrigado pela ótima convivência nesses meses.

Aos meus amigos do Rio, Jordana, Beatriz, Bárbara, Samyra, Yuri, Renan e Maciel, por mostrarem que a distância não consegue separar amigos tão importantes como vocês são pra mim. Sempre contem comigo pra tudo que vocês precisarem, pois foram inúmeras vezes que eu me apoiei em vocês pra tudo que eu precisei. Amo muito vocês todos.

A minha irmã e melhor amiga, Amanda, por ser minha grande parceira, confidente, cúmplice e exemplo. Espero ter você por perto em todas as etapas da minha vida. Te amo muito.

Aos meus familiares que eu amo muito e sempre me apoiaram, principalmente à minha tia, Darlene, que me deu suporte durante a época do cursinho, esteve ao meu lado na época dos vestibulares, ajudou na minha mudança pra Botucatu, na minha mudança pra São Paulo e em todos os momentos nos quais eu precisei. Obrigado por tudo.

Aos meus avós, João, Ângela e Salomé, por todo o carinho, amor e ensinamentos que me passaram. Vocês são muito especiais!

À Professora Marília Smith, chefe da Disciplina de Genética, pelo apoio concedido para realizar esse trabalho.

A todos os funcionários e professores da Disciplina de Genética, por toda a dedicação em manter o laboratório em ótimo funcionamento.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

1	Resumo.....	8
2	INTRODUÇÃO.....	10
2.1	Contexto.....	10
2.2	Teorias neurobiológicas da esquizofrenia.....	11
2.3	Sistema Endocanabinóide e esquizofrenia.....	12
2.4	Gene <i>CNR1</i> , esquizofrenia e o uso de <i>Cannabis</i>	14
2.5	Canabinóides, <i>AKT1</i> e esquizofrenia.....	16
3	OBJETIVOS.....	17
3.1	Objetivo Geral:.....	17
3.2	Objetivos específicos:.....	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1	População de estudo.....	18
4.2	Avaliação clínico-psiquiátrica.....	18
4.3	Avaliação laboratorial.....	19
4.3.1	Extração de DNA.....	19
4.3.2	Análise da estratificação populacional.....	19
4.3.3	PCR em Tempo Real.....	20
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
6	RESULTADOS.....	22
6.1	Caracterização da Casuística.....	22
6.2	Genotipagem.....	23
6.3	Análise de covariáveis.....	25
6.4	Associação entre os polimorfismos e a etiologia da doença.....	26
6.4.1	Genótipos.....	26
6.4.2	Haplótipos e alelos.....	27
6.5	Associação entre os polimorfismos e a refratariedade ao tratamento.....	28
6.5.1	Genótipos, alelos e haplótipos.....	28
6.6	Associação entre os polimorfismos e os subtipos de esquizofrenia.....	29
	Tabela 10: Frequências dos genótipos do gene <i>CNR1</i> rs806380 entre 2 subtipos de esquizofrenia e entre transtorno esquizoafetivo e sua significância.....	30
7	DISCUSSÃO.....	31
7.1	<i>CNR1</i> e etiologia da esquizofrenia.....	31
7.2	<i>CNR1</i> rs806380 e Transtorno esquizoafetivo.....	32
7.3	Refratariedade e idade de acometimento.....	32
7.4	Polimorfismos, refratariedade e uso de <i>Cannabis</i>	33
8	CONCLUSÃO.....	35
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1 Resumo

A fisiopatologia da esquizofrenia parece envolver uma complexa interação entre vulnerabilidades genéticas e fatores de risco ambientais. O uso de *Cannabis* tem sido apontado como um destes fatores, que contribui para o surgimento de sintomas psicóticos em indivíduos predispostos e piora o curso da doença pré-estabelecida. O sistema endocanabinóide está envolvido neste processo, podendo apresentar possíveis implicações na manifestação de sintomas.

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar se variantes dos genes *CNRI* (codificador do receptor endocanabinóide tipo 1) e *AKTI* (codificador de proteína serina-treonina quinase), individualmente ou interativamente, e o uso de *Cannabis* podem ser fatores de risco para a esquizofrenia e para a refratariedade ao tratamento com antipsicóticos.

Foram estudados 202 pacientes portadores de esquizofrenia e 277 indivíduos saudáveis. Os polimorfismos rs1049353 (G/A) e rs806380 (A/G) do gene *CNRI* e os rs2494732 (C/T) e rs1130233 (A/G) do gene *AKTI* foram genotipados por meio da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real com sistema de detecção *Taqman*[®]. Tais polimorfismos foram correlacionados ao diagnóstico de esquizofrenia e a outras variáveis, tal como o uso de *Cannabis*, resposta ao tratamento e subtipos da doença. Também foi realizada análise de estratificação populacional a partir de marcadores genéticos escolhidos para a população brasileira a fim de correção estatística de fatores confundidores relacionados a diferenças étnicas.

Foi visto uma influência positiva da idade de acometimento em pacientes refratários quando comparados com os pacientes respondedores ($p = 0,006$), confirmando os dados da literatura que sugerem uma idade de acometimento mais precoce da doença em portadores de esquizofrenia refratária.

A interação dos genótipos AA do polimorfismo rs806380 e do genótipo CT do polimorfismo rs1049353, ambos do gene *CNRI*, teve uma associação positiva com a etiologia da doença ($p = 0,036$; O.R. = 0,462), sugerindo um marcador de proteção para a esquizofrenia. Além disso, foi encontrada uma associação positiva entre o genótipo GG do polimorfismo rs806380 do gene *CNRI* e o diagnóstico de transtorno esquizoafetivo quando comparado ao

diagnóstico de esquizofrenia ($p = 0,006$), sugerindo um marcador de suscetibilidade para a doença, o que pode ajudar no diagnóstico diferencial entre esquizofrenia e transtorno esquizoafetivo.

Dessa forma, o nosso estudo possibilitou uma melhor caracterização dos genes *CNR1* e *AKT1* na esquizofrenia, bem como identificou variantes que podem auxiliar no diagnóstico diferencial da esquizofrenia e confirmou uma interação entre fatores de suscetibilidade para a etiologia da doença.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Contexto

A esquizofrenia é uma doença mental grave, caracterizada por um complexo conjunto de distúrbios do pensamento, percepção, afeto e comportamento social (Organização Mundial de Saúde - OMS, 1998). Dentre todas as condições psiquiátricas, é uma das mais intrigantes e estigmatizadas. Atinge cerca de 1% da população, o que somado às suas características de início precoce e prejuízo funcional coloca-a entre as 10 principais causas de anos perdidos de vida saudável listadas pela OMS (Mathers *et al.*, 2006). Apesar do impacto da doença para os pacientes, familiares e o sistema de saúde, além de ser alvo de estudos há mais de 100 anos, suas causas ainda não foram completamente esclarecidas. O conhecimento atual aponta para uma etiologia multifatorial, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais (Leroy *et al.*, 2001; Caspi *et al.*, 2005).

De acordo com o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) (First *et al.*, 1996), a esquizofrenia pode ser dividida em 5 subtipos: paranoide, desorganizada, catatônica, indiferenciada e residual. A diferença entre elas está baseada nos sintomas e critérios de diagnóstico do DSM-IV, sendo necessário apresentar pelo menos dois entre os cinco sintomas representativos da doença por um intervalo de tempo significativo dentro de um período de um mês. Dependendo de quais sintomas presentes no paciente, ele será classificado em um dos subtipos descritos acima.

Um diagnóstico diferencial seria o de transtorno esquizoafetivo. Este é considerado como um quadro depressivo na esquizofrenia, pois os pacientes apresentam sintomas afetivos além dos psicóticos. Porém, esse é um diagnóstico ainda controverso, que exige a presença de ambos os sintomas em momentos diferentes (Noto e Bressan, 2010).

2.2 Teorias neurobiológicas da esquizofrenia

A idéia de uma alteração biológica causando a esquizofrenia é tão antiga quanto a definição desta enquanto entidade nosológica. Kraepelin (1996), ao sistematizar os diagnósticos psiquiátricos, agrupou a então chamada *dementia praecox* dentro do grupo das demências endógenas. O conceito de endogenicidade era fundamental para o sistema kraepeliniano e embora expressasse o desconhecimento das causas reais das afecções mentais foi de grande importância ao centrar na própria constituição do indivíduo, a origem da doença. A concepção de um transtorno demencial direcionou inicialmente as pesquisas para um processo neurodegenerativo. Alzheimer foi o primeiro a conduzir estudos neuropatológicos e não observou gliose reativa diferenciando os processos neuropatológicos envolvidos na esquizofrenia das demências senis (Bogerts, 1999).

As dificuldades metodológicas inerentes aos estudos neuropatológicos, os achados inconsistentes e o advento dos antipsicóticos na década de 50, fizeram com que as pesquisas passassem a focar os neurotransmissores como elementos centrais na gênese da esquizofrenia.

Nesse contexto, surge a teoria dopaminérgica que se baseia principalmente nas evidências de que todos os antipsicóticos compartilham entre si algum grau de afinidade por receptor D2 (Talbot e Laruelle, 2002; Kapur e Seeman, 2001) e que drogas que aumentam a transmissão dopaminérgica, como as anfetaminas, podem induzir sintomas psicóticos em indivíduos saudáveis e agravam os pré-existentes em pacientes esquizofrênicos (Laruelle *et al.*, 1996). Laruelle *et al.* (1996), num estudo de SPECT (*Single-photon emission computed tomography*), demonstraram um maior aumento da liberação de dopamina após administração de anfetamina em portadores de esquizofrenia comparados a controles, primeira evidência *in vivo* de desregulação de neurônios dopaminérgicos na esquizofrenia. Embora, outras evidências se somem a essa de tal forma que não restem dúvidas sobre a participação da dopamina na esquizofrenia, essa teoria falha enquanto modelo explicativo por não elucidar (1) o porquê do início dos sintomas ocorrer usualmente na adolescência e início da vida adulta; (2) como se dão as alterações estruturais cerebrais e os prejuízos cognitivos e (3) o motivo dos antipsicóticos não serem igualmente eficazes sobre sintomas negativos.

Além disso, ao lado dos achados sobre neurotransmissores, neuropatologia e neuroimagem, foi constatado ainda que história familiar e fatores ambientais como complicações obstétricas, infecções maternas, estação do ano ao nascer, sinais neurológicos “leves”, alterações comportamentais e cognitivas e uso de *Cannabis* parecem também influenciar o risco para o desenvolvimento de esquizofrenia (McDonald e Murray, 2000; Lewis e Levitt, 2002).

2.3 Sistema Endocanabinóide e esquizofrenia

Nos últimos anos, outros sistemas neurobiológicos têm sido apontados como alvos promissores para o entendimento das possíveis causas da esquizofrenia, como os sistemas glutamatérgico (Goff e Coyle, 2001), adenosinérgico (Lara *et al.*, 2006) e endocanabinóide (Koethe *et al.*, 2009). Este último tem sido cada vez mais citado em inúmeras publicações envolvendo a fisiopatologia da doença.

Trata-se de um sistema lipofílico de sinalização celular que exerce importantes funções regulatórias sobre o corpo dos mamíferos (Fernandez-Espejo *et al.*, 2009). Esse sistema foi descoberto na década de 80 (Devane *et al.*, 1988) a partir da identificação dos receptores canabinóides tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2). O sistema é formado ainda por ligantes endógenos, como a anandamida e o 2-aracdonil-glicerol (2-AG), enzimas e transportadores. Os receptores CB1 e CB2, particularmente os CB1 devido a sua localização mais central e ampla distribuição por estruturas como gânglios da base, hipocampo, amígdala, regiões do córtex e cerebelo (Herkenham *et al.*, 1991), atuam na modulação de diversos outros sistemas de neurotransmissão cerebral, dentre eles o sistema dopaminérgico, classicamente associado à esquizofrenia. Algumas substâncias canabinóides presentes na planta *Cannabis sativa*, como o delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol, são capazes de se ligar aos receptores CB1 e exercer importantes efeitos sobre o sistema nervoso central (D’Souza *et al.*, 2004; Zuardi *et al.*, 1982).

Diversos achados reforçam a idéia de que o sistema endocanabinóide esteja envolvido na fisiopatologia da esquizofrenia. O uso de *Cannabis*, especialmente devido aos efeitos nocivos do THC, parece aumentar o risco da manifestação de sintomas psicóticos em indivíduos vulneráveis (Verdoux *et al.*, 2003; Caspi *et al.*, 2005; Henquet *et al.*, 2005;). Além disso, altera o curso e o

prognóstico de transtornos psicóticos pré-existent, dentre eles a esquizofrenia (Turner e Tsuang, 1990; Gut-Fayand *et al.*, 2001), promovendo a exacerbação de curta duração ou recorrência de sintomas positivos, piora das funções cognitivas (D'Souza *et al.*, 2005) e da resposta terapêutica aos antipsicóticos (Green *et al.*, 2004).

Alguns autores apontam inclusive para a existência de uma possível disfunção do sistema endocanabinóide nos indivíduos portadores de esquizofrenia. Dean *et al.* (2001) encontraram, numa análise *post-mortem*, um aumento da densidade de receptores CB1 no córtex pré-frontal dorsolateral de portadores de esquizofrenia. Leweke *et al.* (1999) observaram maior concentração de anandamida (um dos principais canabinóides endógenos) no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com esquizofrenia.

Do ponto de vista neurobiológico, conforme demonstrado na figura 1, os canabinóides endógenos e exógenos podem participar indiretamente da desregulação dopaminérgica mesocorticolímbica associada ao surgimento dos sintomas psicóticos (Fernandez-Espejo *et al.*, 2009). Recentemente, Bossong *et al.* (2009), demonstrou em um estudo de PET-*scan* (*Positron emission tomography*) utilizando o radiotraçador D2/D3 racloprida, um aumento da liberação de dopamina no estriado, após a administração de THC. Estes resultados sugerem, portanto, que o sistema endocanabinóide está envolvido na regulação da liberação de dopamina no Sistema Nervoso Central (Bossong *et al.*, 2009). Por isso, a investigação de possíveis marcadores biológicos relacionados a este sistema torna-se importante. O sistema endocanabinóide, apesar de não estar classicamente associado à fisiopatologia da esquizofrenia, pode exercer influências significativas.

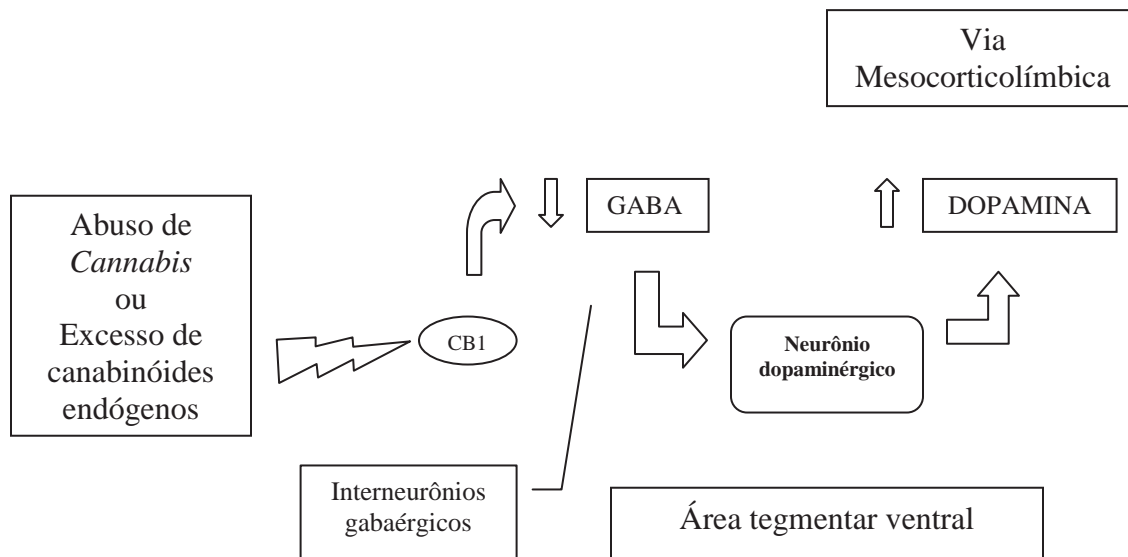


Figura 1: Abuso de *Cannabis*/excesso de canabinóides endógenos e o sistema dopaminérgico na esquizofrenia – uso abusivo de *Cannabis*, principalmente de seu princípio ativo delta-9-THC (ou excesso de canabinóides endógenos) atua no receptor CB1 induzindo hiperatividade dopaminérgica no sistema límbico (via inibição dos interneurônios gabaérgicos da área tegmentar ventral). Modificado de **Fernandez-Espejo et al., 2009**.

2.4 Gene *CNR1*, esquizofrenia e o uso de *Cannabis*

Os receptores CB1 são codificados pelo gene *CNR1*, localizado no cromossomo 6q14-15, que tem sido considerado um possível *locus* de susceptibilidade para a esquizofrenia (Cao *et al.*, 1997). Uma associação entre determinado polimorfismo deste gene (repetição AAT) e a forma hebefrênica da doença foi estabelecida numa amostra de pacientes japoneses (Ujike *et al.*, 2002). Tsai *et al.* (2000) não encontrou evidências de associação positiva em pacientes chineses. A repetição AAT foi ainda estudada em outras populações de pacientes portadores de esquizofrenia e os resultados continuaram sendo controversos. Alguns autores replicaram os achados de associação positiva com a doença (Chavarria-Síles *et al.*, 2008; Martínez-Gras *et al.*, 2006), porém, outros não evidenciaram nenhuma associação (Ballon *et al.*, 2006; Seifert *et al.*, 2007).

Recentemente, um estudo associou três *tag* SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) do gene *CNR1* (portadores do alelo G no polimorfismo rs12720071 e homocigotos CC nos polimorfismos rs7766029 e rs9450898) com diminuição do volume cerebral em relação aos outros genótipos em pacientes com esquizofrenia (Ho *et al.*, 2011). Para o polimorfismo rs12720071, os autores encontraram uma diminuição ainda maior em indivíduos com uso abusivo de *Cannabis* quando comparados com indivíduos que não faziam uso dessa substância. Além disso, estes apresentaram piores desempenhos em teste de neurocognição, sugerindo uma forte interação entre o genótipo e fatores ambientais no fenótipo da esquizofrenia.

O polimorfismo do gene *CNR1* mais estudado é o 1359G/A (rs1049353). Pesquisadores franceses encontraram resultados divergentes sobre a relação entre este polimorfismo e a resposta aos antipsicóticos. Leroy *et al.* (2001) não observaram associação positiva, enquanto que, Hamdani *et al.* (2008) verificaram que a presença do alelo G foi mais frequente entre os pacientes que tiveram pior resposta aos antipsicóticos atípicos, dentre eles a clozapina.

Esses últimos dois estudos também avaliaram a associação entre este polimorfismo e o uso de *Cannabis*. No primeiro estudo, o genótipo GG esteve associado ao uso de *Cannabis* entre os pacientes com esquizofrenia. Já o segundo estudo não observou relação entre a presença do alelo G e o uso da substância entre os pacientes, encontrando apenas a associação deste polimorfismo à refratariedade ao tratamento. Este estudo concluiu, portanto, que o alelo G pode ser considerado um possível marcador farmacogenético da resposta ao tratamento com antipsicóticos atípicos (Hamdani *et al.*, 2008).

Apesar de não apresentar significância estatística no trabalho de Ho *et al.* (2011), pacientes portadores do alelo G do polimorfismo rs1049353 pareceram ser mais propensos ao uso abusivo de *Cannabis* que não portadores deste alelo, sendo mais uma evidência de resultados heterogêneos na literatura. Neste mesmo estudo, foi avaliado o polimorfismo rs806380, porém não foi encontrada associação positiva.

Ambos os autores concluem ainda que novos estudos são importantes para a melhor caracterização desta possível associação entre polimorfismos do gene *CNR1*, esquizofrenia, uso de *Cannabis* e a resposta aos antipsicóticos.

2.5 Canabinóides, *AKT1* e esquizofrenia

O gene *AKT1*, localizado na região cromossômica 14q32-32, codifica a proteína AKT serina-treonina quinase que participa em diversas funções metabólicas como desenvolvimento sináptico, proliferação celular, transporte de proteínas (Coffer *et al.*, 1998; Manning e Cantley, 2007) e apoptose (Grimes e Jope, 2001; Watcharasit *et al.*, 2002). Estudos já comprovaram a associação entre esquizofrenia e polimorfismos do gene *AKT1* em famílias com descendência européia ou asiática (Schwab *et al.*, 2005; Thiselton *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2007). Outro estudo também relatou a diminuição dos níveis da proteína AKT em amostras cerebrais *post-mortem* de pacientes com esquizofrenia (Zhao *et al.*, 2006).

Além disso, um estudo mostrou o efeito neuroprotetor da ação de canabinóides exógenos, como o THC, na via PI3K/Akt através da ativação de receptores CB1 em ratos (Ozaita *et al.*, 2007), dando evidências para uma interação entre os genes *AKT1* e *CNR1*, que codificam a proteína AKT e os receptores CB1, respectivamente. No entanto, não há uma regularidade na replicação desses resultados, existindo diversos trabalhos na literatura com ausência de associação entre polimorfismos do gene *AKT1* e esquizofrenia (Ide *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010).

Entre os polimorfismos mais estudados do gene *AKT1* estão os rs2494732 e rs1130233, que já foram investigados quanto sua associação à esquizofrenia. Estes polimorfismos também foram associados com diversos fatores ambientais de risco para a doença, como complicações obstétricas (Joo *et al.*, 2009) e o uso de *Cannabis* (Winkel *et al.*, 2010). Com essas informações, esperamos encontrar uma associação entre polimorfismos do gene *AKT1* e esquizofrenia, bem como a sua interação com o uso de *Cannabis* e o sistema endocanabinóide, mais especificamente o receptor CB1 e polimorfismos do gene *CNR1*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Verificar se algumas variantes do gene *CNR1* (codificador do receptor endocanabinóide tipo 1) e do gene *AKT1* (codificador da proteína serina-treonina quinase), individualmente e/ou interativamente, podem ser fatores de risco ou proteção para a esquizofrenia;

3.2 Objetivos específicos:

- Investigar a associação dos polimorfismos rs806380 e rs1049353 do gene *CNR1* e dos polimorfismos rs1130233 e rs2494732 do gene *AKT1* com a esquizofrenia;
 - Investigar se a estratificação da população é uma covariável no estudo desses polimorfismos;
 - Investigar a associação desses mesmos polimorfismos com a resposta aos antipsicóticos, de modo a relacionar os diferentes genótipos com a refratariedade ao tratamento nos pacientes;
 - Buscar possíveis haplótipos de risco ou proteção para a esquizofrenia e/ou para a resposta ao tratamento;
 - Buscar possíveis alelos de risco ou proteção para a esquizofrenia e/ou para a resposta ao tratamento;
 - Investigar a interação entre os polimorfismos dos genes *AKT1* e *CNR1* na esquizofrenia e refratariedade ao tratamento;
 - Identificar a relação desses polimorfismos com a idade de acometimento, uso de *Cannabis* e subtipos específicos de esquizofrenia.
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População de estudo

Foram avaliados 202 pacientes com esquizofrenia, recrutados do Programa de esquizofrenia da Universidade Federal de São Paulo (PROESQ), e 277 indivíduos controles saudáveis. Foram incluídos no estudo os pacientes com o diagnóstico de esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo conforme os critérios diagnósticos estabelecidos pelo DSM-IV. Os diagnósticos foram confirmados através da aplicação dos módulos A, B, C, D e E da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID-I) (First *et al.*, 1996). Todos os indivíduos controles também foram submetidos à SCID-I e aqueles que apresentaram diagnóstico de psicose ou histórico familiar foram excluídos da amostra. Pacientes ou controles incapazes de consentir em participar do estudo foram excluídos. O termo de consentimento livre e esclarecido foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (emenda 2 -1737/06).

4.2 Avaliação clínico-psiquiátrica

Para a caracterização clínica da amostra, foram colhidos dados sócio-demográficos e relativos à doença. A partir da entrevista com pacientes e familiares e revisão do prontuário, foram obtidos dados como idade de início da doença, número de internações e histórico das medicações utilizadas. Psiquiatras do nosso grupo de pesquisa utilizaram instrumentos padronizados para avaliação clínica como: escala de sintomas positivos e negativos (*Positive and Negative Syndrome Scale – PANSS*; Kay *et al.*, 1987), escala de impressão clínica global (*Clinical Global Impression – CGI*; Guy, 1976), escala de avaliação global do funcionamento (*Global Assessment Functioning – GAF*; Endicott *et al.*, 1976) escala de gravidade de dependência (*Addiction Severity Index – ASI*; McLellan *et al.*, 1980) para avaliação do uso de substâncias, além de um questionário específico para avaliação do uso de *Cannabis*. Para

definição de pacientes refratários ao tratamento, foram utilizados os critérios do IPAP (The International Psychopharmacology Algorithm Project - <http://www.ipap.org/>).

4.3 Avaliação laboratorial

4.3.1 Extração de DNA

Foram colhidos 10 ml de sangue de cada indivíduo por punção venocubital com material estéril e descartável (tubos *vacutainer*) em tubo contendo EDTA para extração de DNA. Essa extração foi feita com o *kit* para extração de DNA de sangue periférico Genra Puregene (Qiagen-Sciences, Maryland, USA).

4.3.2 Análise da estratificação populacional

O efeito de Estratificação Populacional ocorre quando, em um estudo do tipo caso-controle, as amostras são, como no caso da população brasileira, constituídas de múltiplos subgrupos étnicos. Nesse caso, as associações positivas encontradas podem ser devidas não à patologia em questão, mas sim às diferenças populacionais entre os grupos. Assim, tem-se proposto o uso de informações de marcadores genéticos adicionais como uma ferramenta para a correção desse tipo de viés (Hutchison *et al.*, 2004).

Essa análise foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Sidney Emanuel Santos do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará. A estratificação populacional foi avaliada por 48 marcadores de ancestralidade INDELs (*Insertion-Deletion polymorphisms*), representativos das três principais populações mundiais (africanos, europeus e nativo-americanos; esta última categoria inclui indivíduos asiáticos) e analisada em 3 PCRs *multiplex* seguidas por eletroforese capilar, como descrito anteriormente e validado em população brasileira por Santos *et al.* (2010).

4.3.3 PCR em Tempo Real

Os genótipos para cada polimorfismo foram determinados por PCR em tempo real utilizando o Ensaio Taqman SNP Genotyping® (Applied Biosystems, EUA). Esse método se baseia na utilização de 2 primers (*forward* e *reverse*) e de uma sonda específica pra cada alelo (VIC e FAM). Com a desnaturação do DNA, a sonda e os primers se ligam a fita simples. Durante a polimerização, a sonda marcada com fluorocromo específico de cada alelo é liberada, gerando um sinal que será captado pelo equipamento. Os resultados são dados pela presença ou ausência da amplificação de cada alelo, um marcado com VIC e o outro com FAM, como mostra a Figura 2a. Os resultados são então colocadas em um gráfico que os separa em grupos dos diferentes genótipos (Figura 2b).

Com base na literatura, selecionamos os principais polimorfismos desses genes relacionados à esquizofrenia: rs806380 (A/G) e rs1049353 (C/T) do gene *CNR1* (Gadzicki *et al.*, 1999; Hamdani *et al.*, 2008); e rs1130233 (C/T) e rs2494732 (C/T) do gene *AKT1* (Winkel, 2010).

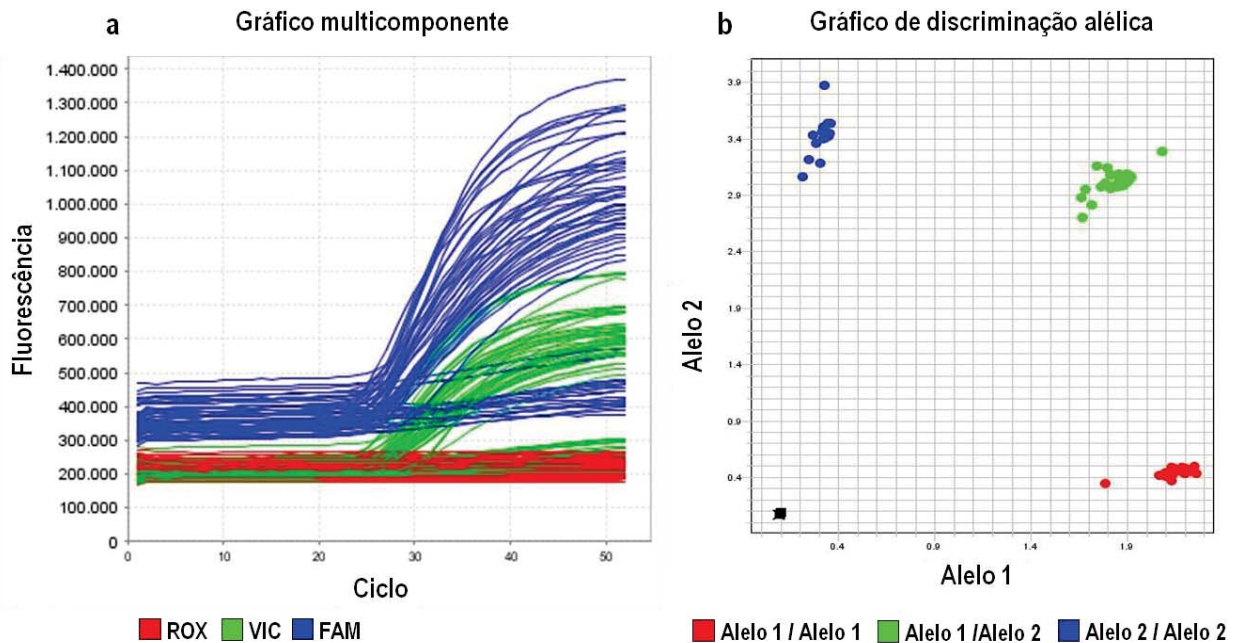


Figura 2: **a)** Amplificação dos alelos marcados com VIC (em verde) e com FAM (em azul) em diferentes amostras. A fluorescência passiva utilizada foi o ROX (em vermelho). **b)** Gráfico mostrando os grupos de genótipos: amostras de pacientes homocigotos para o alelo 1 em vermelho, amostras de pacientes heterocigotos em verde e amostras de pacientes homocigotos para o alelo 2 em azul. Figuras obtidas a partir de uma reação realizada em nosso laboratório.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com diferentes parâmetros do presente estudo foram submetidos a testes estatísticos adequados para cada variável estudada, de forma a avaliar a correlação entre as variantes do gene com os demais achados psiquiátricos e de resposta farmacológica.

De forma geral, primeiramente, foi verificado se existem diferenças em relação a sexo, etnia e idade entre os grupos pelo teste de qui-quadrado (para sexo) e pelo teste t- de *Student* para amostras independentes (para etnia e idade). Para observar se os polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o teste de qui-quadrado.

Utilizamos o teste de regressão logística múltipla binária para verificar se os genótipos do gene *CNR1* e do gene *AKT1*, individualmente e/ou interativamente podem ser fatores de risco/fatores de proteção para a doença. Em seguida, utilizamos o mesmo teste para investigar esses polimorfismos quanto à refratariedade ao tratamento com antipsicóticos. Para a análise de haplótipos, foram considerados apenas os SNPs que se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e os haplótipos com frequência maior que 1%. Para associação entre os haplótipos e a esquizofrenia ou refratariedade foi utilizado o teste qui-quadrado.

Quanto às demais variáveis clínicas, foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) para verificar a associação dos genótipos com a idade de acometimento e o teste de qui-quadrado para a associação com os diferentes diagnósticos e subtipos da esquizofrenia.

A análise estatística foi realizada por meio dos *softwares* SPSS 18.0 e Haploview e foi utilizado o índice de significância $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da Casuística

Foram avaliados 202 pacientes de esquizofrenia e 277 indivíduos controles saudáveis. Todos passaram por exames psiquiátricos, neuropsicológicos e coleta de sangue. A descrição da amostra estudada encontra-se na tabela 1.

Tabela 1: Caracterização da amostra de pacientes e indivíduos controles saudáveis.

Variável	Pacientes		Controles	
	N	Frequência	N	Frequência
Sexo	202		277	
Masculino	138	68,3%	166	59,9%
Feminino	64	31,7%	111	40,1%
Idade na primeira consulta	199		270	
Média (DP)		♂ 35,08 (9,91) ♀ 37,92 (12,34)		♂ 37,35 (12,19) ♀ 37,62 (12,84)
Mediana		♂ 32,5 / ♀ 34		♂ 34 / ♀ 36
Mínimo		♂ 16 / ♀ 18		♂ 16 / ♀ 17
Máximo		♂ 64 / ♀ 68		♂ 74 / ♀ 73
Ancestralidade	172		149	
Européia (DP)		0,67 (0,22)		0,70 (0,19)
Africana (DP)		0,18 (0,17)		0,16 (0,15)
Nativo Americana (DP)		0,15 (0,14)		0,14 (0,11)
Refratariedade	147			
Não	74	50,3%		
Sim	73	49,7%		

Os pacientes diagnosticados com esquizofrenia foram divididos em cinco subtipos de acordo com os critérios do DSM-IV (tabela 2). Os pacientes diagnosticados com transtorno esquizoafetivo foram analisados em um grupo a parte.

Tabela 2: Classificação da amostra quanto ao subtipo de esquizofrenia.

Subtipo de esquizofrenia	Pacientes
	N (Frequência)
Paranoide	♂ 87 (87,9%) ♀ 27 (67,5%)
Desorganizado	♂ 7 (7,1%) ♀ 8 (20%)
Catatônico	♂ 0 (0%) ♀ 2 (5%)
Indiferenciado	♂ 4 (4%) ♀ 1 (2,5%)
Residual	♂ 1 (1%) ♀ 2 (5%)

6.2 Genotipagem

Os resultados das genotipagens por PCR em tempo real são dados de acordo com o sinal de fluorescência emitido pelas sondas. Se ambas as sondas amplificarem, os dois sinais de fluorescência (VIC e FAM) serão emitidos, resultando em um genótipo heterozigoto, se apenas uma fluorescência for emitida, o genótipo resultante será homozigoto para o alelo específico daquela sonda (Figura 3). Após genotipagem, foi calculada a frequência de cada genótipo para cada polimorfismo nos pacientes e controles (Tabelas 3 e 4)

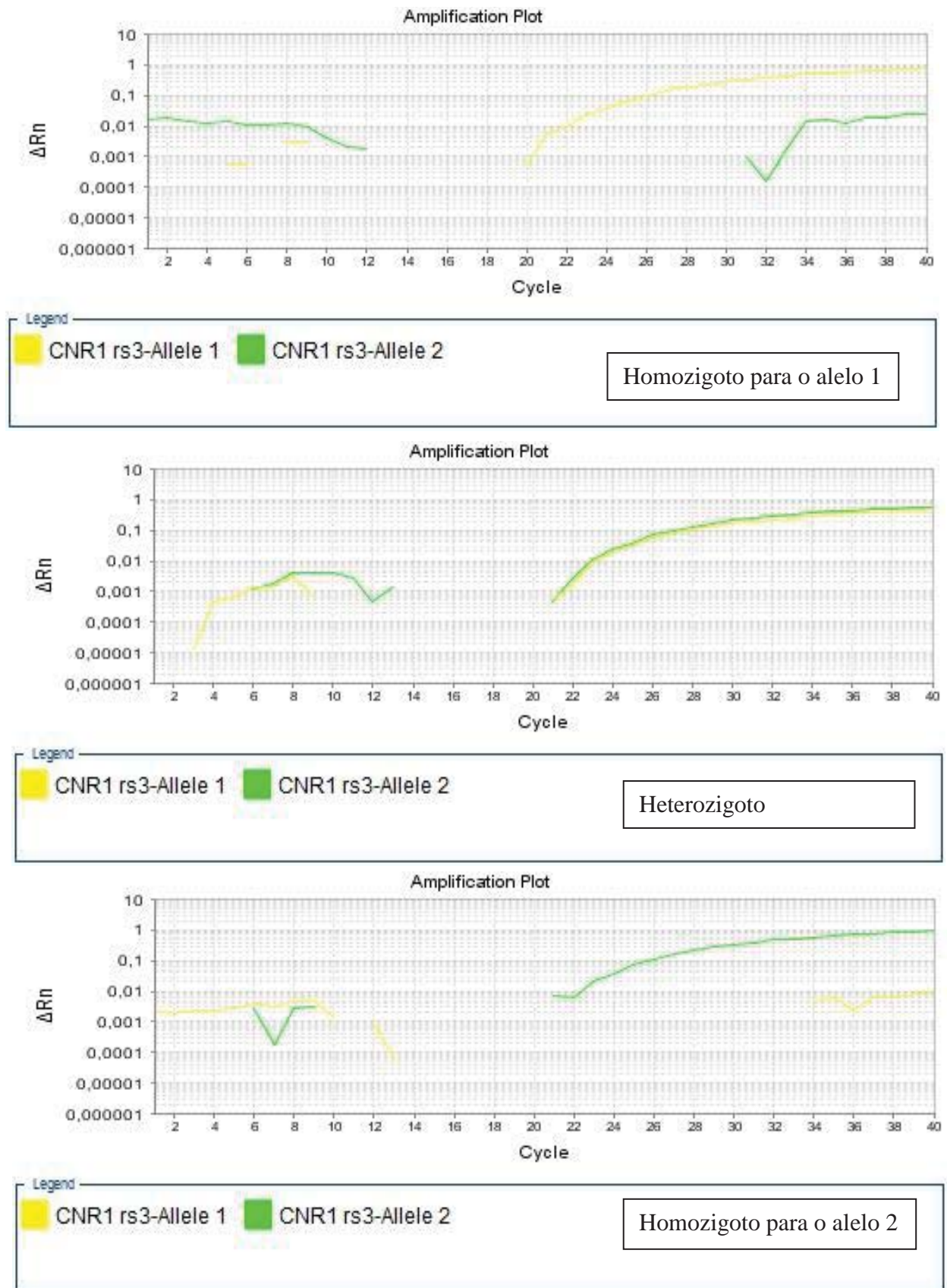


Figura 3: Gráfico de amplificação com o genótipo correspondente.

Tabela 3: Frequências dos polimorfismos dos genes *CNR1* em pacientes e controles.

	Genótipo <i>CNR1</i> rs806380			Genótipo <i>CNR1</i> rs1049353		
	AA	AG	GG	CC	CT	TT
Paciente	94 50,5%	81 43,5%	11 5,9%	119 65,7%	55 30,4%	7 3,9%
Controle	119 53,6 %	85 38,3%	18 8,1%	172 66,9%	78 30,4%	7 2,7%

Tabela 4: Frequências dos polimorfismos dos genes *AKT1* em pacientes e controles.

	Genótipo <i>AKT1</i> rs1130233			Genótipo <i>AKT1</i> rs2494732		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Paciente	101 54,0%	72 38,5%	14 7,5%	40 22,6%	97 54,8%	40 22,6%
Controle	139 54,1%	104 40,5%	14 5,4%	60 25,0%	122 50,8%	58 24,2%

6.3 Análise de covariáveis

Usando o programa SPSS, foi feito o Teste T de *Student* para variáveis contínuas (como idade e ancestralidade) e o teste de qui-quadrado para variáveis categóricas (como sexo e uso de *Cannabis*) para analisar se estas influenciam significativamente em nossa amostra quanto a etiologia da doença e a refratariedade ao tratamento. Foram considerados significativos os valores de p menores que 0,05. A única covariável que se mostrou significativa foi a idade de acometimento da doença entre os pacientes refratários e não refratários (tabela 5). Uso de *Cannabis* não teve diferença estatística entre pacientes refratários e não refratários.

Tabela 5: Associação de covariáveis com a esquizofrenia e com a refratariedade ao tratamento.

Variáveis	Associação com a doença	Associação com a refratariedade
Sexo	$p = 0,068$	$p = 0,720$
Uso de <i>Cannabis</i>	-	$p = 0,862$
Idade na 1ª Consulta	$p = 0,179$	$P = 0,035$
Idade de Acometimento	-	$p = 0,006$
Ancestralidade Africana	$p = 0,319$	$p = 0,607$
Ancestralidade Europeia	$p = 0,190$	$p = 0,590$
Ancestralidade Nativo-Americana	$p = 0,399$	$p = 0,835$

6.4 Associação entre os polimorfismos e a etiologia da doença

6.4.1 Genótipos

Foi utilizado o teste de Regressão Logística Binária pelo SPSS para analisar a associação entre os genótipos dos polimorfismos, individualmente e interativamente, e a etiologia da doença. O resumo dos valores de p das análises individuais dos genes está descrito na tabela 6.

Tabela 6: Associação entre a esquizofrenia e os polimorfismos dos genes *CNR1* e *AKT1* individualmente e a interação entre os polimorfismos do mesmo gene.

Polimorfismos	Associação com a doença
<i>CNR1</i>	Valor de p
rs806380	$p = 0,461$
rs1049353	$p = 0,798$
rs806380*rs1049353	$p = 0,769$
<i>AKT1</i>	Valor de p
rs1130233	$p = 0,666$
rs2494732	$p = 0,720$
rs1130233*rs2494732	$p = 0,780$

Na análise entre combinações genóticas dentro do mesmo gene e a etiologia da esquizofrenia, foi encontrada uma associação positiva para dois genótipos específicos dos polimorfismos do gene *CNR1*, (tabela 7). Não foi encontrada associação positiva na análise das combinação de genótipos dos polimorfismos do gene *AKT1* assim como não foi encontrado resultados significativos na análise das combinações de genótipos entre os polimorfismos dos genes *CNR1* e *AKT1*.

Tabela 7: Associação entre a esquizofrenia e as combinações de genótipos da interação dos polimorfismos do gene *CNR1* em relação aos genótipos homozigotos raros (GG para o rs806380 e TT para o rs1049353).

Polimorfismos	Associação com a doença		
	Valor de <i>p</i>	Exp(B)	I.C. 95%
<i>CNR1</i>			
rs806380*rs1049353	<i>p</i> = 0,769	-	-
rs806380(AA)*rs1049353(CC)	<i>p</i> = 0,150	2,106	0,765 – 5,804
rs806380(AA)*rs1049353(CT)	<i>p</i> = 0,036	0,462	0,225 – 0,951
rs806380(AG)*rs1049353(CC)	<i>p</i> = 0,226	1,891	0,674 – 5,301

6.4.2 Haplótipos e alelos

Foi utilizado o HaploView para analisar a associação de haplótipos de cada polimorfismos com a doença através do teste de Qui-quadrado. Os polimorfismos do gene *CNR1* estavam em fraco desequilíbrio de ligação ($D' = 0,126$), enquanto que os polimorfismos do gene *AKT1* se apresentaram em forte desequilíbrio de ligação ($D' = 0,988$). Assim, foi feita a análise de haplótipos apenas para o gene *AKT1*, porém os resultados não foram significativos ($p > 0,05$).

Para verificar associação entre os alelos com a etiologia da esquizofrenia foi montado um banco específico de alelos a partir da duplicação do banco de genótipos. Para a análise foi utilizado o teste de Regressão Logística Binária no programa SPSS, não havendo diferença estatística significativa.

6.5 Associação entre os polimorfismos e a refratariedade ao tratamento

6.5.1 Genótipos, alelos e haplótipos

Para analisar os dados dos polimorfismos com a refratariedade ao tratamento, foi utilizado como covariável a idade de acometimento da doença e o banco de dados apenas dos pacientes (sem os controles). Para analisar os genótipos e os alelos, foi utilizado o teste de Regressão Logística Binária no programa SPSS. Os resultados das análises individuais de cada polimorfismo e a interação dos polimorfismos do mesmo gene estão na tabela 8.

Foi realizada uma nova análise dos haplótipos, uma vez que o banco de dados utilizado era diferente. Da mesma forma que visto para o banco geral (pacientes e controles), quando analisamos apenas os pacientes, os polimorfismos do gene *CNR1* estavam em fraco desequilíbrio de ligação ($D' = 0,11$), enquanto os polimorfismos do gene *AKT1* se apresentaram em forte desequilíbrio de ligação ($D' = 1,0$). Assim, foi feita a análise de haplótipos apenas para o gene *AKT1*, porém os resultados não foram significativos ($p > 0,05$).

Tabela 8: Associação entre a refratariedade e os polimorfismos dos genes *CNR1* e *AKT1* individualmente e a interação entre os polimorfismos do mesmo gene.

Polimorfismos	Associação com a refratariedade
<i>CNR1</i>	Valor de p
rs806380	$p = 0,215$
rs1049353	$p = 0,668$
rs806380*rs1049353	$p = 0,967$
<i>AKT1</i>	Valor de p
rs1130233	$p = 0,666$
rs2494732	$p = 0,720$
rs1130233*rs2494732	$p = 0,780$

6.6 Associação entre os polimorfismos e os subtipos de esquizofrenia

Após a associação com a etiologia da doença e com a refratariedade ao tratamento, foram feitas análises de associação entre os polimorfismos e os subtipos de esquizofrenia, de modo a identificar um perfil mais específico de pacientes para um determinado polimorfismo. Para essa análise, foi usado o teste de Qui-quadrado.

Primeiramente, foi encontrada uma associação positiva ($p = 0,006$) entre o polimorfismo *CNR1* rs806380 e o diagnóstico da doença (esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo) (tabela 9).

Tabela 9: Frequências dos genótipos do gene *CNR1* rs806380 entre pacientes com esquizofrenia e com transtornos esquizoafetivo e sua significância.

Diagnóstico	Genótipo <i>CNR1</i> rs806380			Valor de p
	AA	AG	GG	
Esquizofrenia	60	62	6	$p = 0,006$
	46,9%	48,4%	4,7%	
Transtorno Esquizoafetivo	6	2	3	
	54,5%	18,2%	27,3%	

Após a primeira análise dos subtipos de esquizofrenia dar associação negativa, agrupamos os subtipos com o transtorno esquizoafetivo para efeito de comparação entre as duas doenças ($p = 0,012$). Considerando que o tamanho amostral dos subtipos paranoide e desorganizado era maior que os outros subtipos, foi feita uma análise com apenas esses 2 principais subtipos (paranoide, desorganizado) e transtorno esquizoafetivo, mantendo a significância ($p = 0,013$). Esses resultados estão ilustrados na tabela 10.

Tabela 10: Frequências dos genótipos do gene *CNR1* rs806380 entre 2 subtipos de esquizofrenia e entre transtorno esquizoafetivo e sua significância.

Diagnóstico	Genótipo <i>CNR1</i> rs806380			Valor de <i>p</i>
	AA	AG	GG	
Esquizofrenia Paranoide	55 52,4%	45 42,9%	5 4,8%	<i>p</i> = 0,013
Esquizofrenia Desorganizada	4 26,7%	10 66,7%	1 6,7%	
Transtorno Esquizoafetivo	6 54,5%	2 18,2%	3 27,3%	

7 DISCUSSÃO

7.1 *CNRI* e etiologia da esquizofrenia

Por ser uma doença de etiologia complexa, a esquizofrenia não apresenta um marcador genético de diagnóstico específico. Diversos estudos na literatura já mostraram indícios da relação de muitos genes com a doença, porém estes estudos são pouco replicados, principalmente em populações diferentes.

Polimorfismos do gene *CNRI*, codificador do receptor CB1 do sistema endocanabinóide, são estudados em diversos trabalhos sobre esquizofrenia, devido à relação com o uso de maconha, à interação com o sistema dopaminérgico e à resposta aos antipsicóticos (Onaivi, 2009). Além disso, é importante saber como os polimorfismos mais estudados desse gene se comportam na população brasileira e quais as possíveis influências que exercem sobre a apresentação clínica e o tratamento da esquizofrenia.

A associação significativa encontrada nesse trabalho ilustra exatamente a somatória de fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Apenas o genótipo de um dos polimorfismos do gene *CNRI* não foi suficiente para indicar uma diferença estatística. No entanto, a interação dos genótipos AA do polimorfismo rs806380 e do CT do polimorfismo rs1049353, em comparação com os homozigotos TT dos dois SNP's apresentou um *Odds Ratio* (O.R.) de 0,462 (I.C. = 0,225 - 0,951), mostrando ser um fator de proteção para a doença. Desse modo, a somatória de vários fatores genéticos, associada com fatores ambientais, mostra-se mais importante na esquizofrenia do que um marcador específico de diagnóstico.

Portanto, achar os marcadores de maior carga genética para a doença é o grande desafio. Tendo esses dados, indivíduos em altíssimo risco de desenvolver psicose podem ser melhor identificados e uma terapia de prevenção pode ser iniciada, no intuito de impedir que a doença se estabeleça.

7.2 *CNR1* rs806380 e Transtorno esquizoafetivo

Em doenças de amplo espectro, como a esquizofrenia, o diagnóstico exato é de extrema importância. As variações de subtipos e as doenças com quadro clínico parecido dificultam muito esse diagnóstico preciso. Sem um bom diagnóstico, podem ocorrer prejuízos na escolha do tratamento e na própria conduta com o paciente.

O genótipo GG do polimorfismo rs806380 do gene *CNR1* foi significativamente mais frequente em pacientes com transtorno esquizoafetivo comparado com os portadores de esquizofrenia. Esses dados sugerem um genótipo de risco para transtorno esquizoafetivo diferente do genótipo de risco para a esquizofrenia propriamente dita, principalmente os subtipos paranoide e desorganizado, grupos nos quais se enquadram a grande maioria dos pacientes da nossa amostra.

Apesar do tamanho amostral pequeno para transtorno esquizoafetivo, esse resultado é relevante devido a grande dificuldade de diagnosticar esses indivíduos e da importância do tratamento específico para cada paciente.

Métodos alternativos de diagnóstico estão sendo avaliados para confirmar e aumentar a precisão e fidedignidade dos diagnósticos por entrevista clínica (SCID-I), como diferenças diagnósticas por neuroimagem (Takayanagi *et al.*, 2011) e por testes cognitivos (Koychev *et al.*, 2011), mostrando a importância e a dificuldade de um bom diagnóstico psiquiátrico.

7.3 Refratariedade e idade de acometimento

Para ajustar e padronizar as análises, foi feita avaliação da população de pacientes e controles e de refratários e não refratários quanto as variáveis sexo, idade de acometimento e ancestralidade. Na análise da refratariedade, também foi usada para correção a variável uso de *Cannabis*.

Não houve influência significativa nas análises de pacientes e controles, não sendo necessária nenhuma correção. Porém, na análise entre pacientes respondedores a antipsicóticos e

não respondedores, a idade de acometimento foi significativa, de modo que esta foi usada como covariável.

Em um estudo americano, portadores de esquizofrenia refratária apresentaram uma idade de acometimento mais precoce do que os não refratários (Meltzer et al, 1997). Devido a ausências de uma dose fixa e as variações do desenvolvimento, como maturação biológica e nível endócrino, a dose ideal e o tempo de tratamento ainda são incertos para crianças e adolescentes, o que também influencia na resposta aos antipsicóticos (Kranzler et al, 2006). Além disso, é sugerido que a esquizofrenia de acometimento precoce esteja relacionada com uma doença mais grave (Kumra e Charles Schulz, 2008), condizendo com os nossos resultados, nos quais os pacientes refratários, ou seja, que não respondem ao tratamento, apresentam uma idade de acometimento mais precoce ($21,17 \pm 6,73$) que os não refratários ($24,32 \pm 6,33$).

7.4 Polimorfismos, refratariedade e uso de *Cannabis*

Nessa amostra, não foi possível identificar associação positiva de nenhum polimorfismo com a refratariedade, assim como não foi encontrada associação da refratariedade com os haplótipos, com os alelos ou com o uso de *Cannabis*.

O grande diferencial do sistema endocanabinóide como alvo de estudo na esquizofrenia é a sua relação com os canabinóides exógenos presentes na *Cannabis sativa* e sua relação com o sistema dopaminérgico. Um estudo mostrou que após tratamento com antipsicóticos, portadores de esquizofrenia apresentaram uma diminuição da expressão de receptores CB1 no córtex pré-frontal, o que leva à diminuição de receptores D2 do sistema dopaminérgico, pois estes dois receptores estão co-expressos no cérebro, levando a uma diminuição da neurotransmissão de GABA, contribuindo para a normalização de funções cognitivas (Urigüen et al., 2009). Para analisar esse efeito, vários polimorfismos do gene *CNR1* deveriam ser estudados juntos, de modo a buscar interações ou haplótipos de risco para a esquizofrenia refratária.

A associação do uso de *Cannabis* na psicose já é reconhecida. Porém, os mecanismos que aumentam o risco de desenvolver a doença ou refratariedade ao tratamento ainda são desconhecidos. Mesmo assim, sabe-se que o tempo de exposição, dose e idade de início do uso

são fatores determinantes, assim como a interação com outros fatores ambientais e fatores genéticos (D'Souza *et al.*, 2009).

8 CONCLUSÃO

A esquizofrenia possui etiologia complexa, resultado da interação de fatores genético e ambientais. Dessa forma, identificar marcadores genéticos de alta suscetibilidade à doença é de extrema importância para identificar indivíduos em alto risco de adquirir psicose e preveni-la. Assim, a interação de genótipos parece ser mais eficiente do que a análise da associação de genótipos isolados, que não é bem replicada na literatura. Neste trabalho, sugerimos a interação dos genótipos AA do polimorfismo rs806380 e do genótipo CT do polimorfismo rs1049353, ambos do gene *CNR1*, como marcador de proteção para esquizofrenia.

Após a estabilização de psicose, é essencial diagnosticá-la corretamente para prosseguir com o melhor tipo de tratamento para cada caso e marcadores biológicos da doença podem ser usados para confirmar o diagnóstico clínico. Este estudo sugere que o genótipo GG do polimorfismo rs806380 do gene *CNR1* possa ser um marcador de suscetibilidade para transtorno esquizoafetivo, sendo necessário mais estudo em populações diferentes com maior tamanho amostral.

Não foi encontrada associação positiva entre os polimorfismos estudados nesse trabalho nem entre as suas interações com a refratariedade ao tratamento, o que sugere um envolvimento de outros genes de modo a aumentar a carga genética de suscetibilidade e conseqüentemente o risco de desenvolver esquizofrenia.

Não houve resultados significativos com os haplótipos ou com os alelos nos estudos com a esquizofrenia nem com a resposta ao tratamento.

A teoria “canabinóide” é um paradigma recente na compreensão fisiopatológica da esquizofrenia. Existem poucos trabalhos publicados sobre a associação entre genes candidatos desse sistema e a doença, particularmente, aqueles trabalhos que abordam a resposta aos antipsicóticos. Além do mais, os resultados obtidos até hoje são controversos, exibindo variações entre populações de diferentes culturas. Não encontramos dados na literatura de estudos na população brasileira referentes ao estudo de mutações e polimorfismos dos genes *CNR1* e *AKT1* relevantes para a esquizofrenia. Assim, esse trabalho é importante e inovador por ter estudado polimorfismos que ainda não foram relacionados à esquizofrenia e polimorfismos bem descritos na literatura internacional, porém que não foram estudados em população brasileira. Além disso,

com a coleta desses dados, estamos montando um banco biológico na Disciplina de Genética da UNIFESP que poderá ser usado para diversos estudos e projetos no futuro.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBATO, A. In: Schizophrenia and public health. World Health Organization (WHO), 1998. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/resources/schizophrenia/en/index.html.

BALLON N, LEROY S, ROY C, BOURDEL MC, CHARLES-NICOLAS A, KREBS MO, POIRIER MF. (AAT)n repeat in the cannabinoid receptor gene (*CNRI*): association with cocaine addiction in an African-Caribbean population. *Pharmacogenomics J*. Mar-Apr;6(2):126-30, 2006.

BOGERTS, B. The neuropathology of schizophrenia diseases: historical aspects and present knowledge. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249(4):2-13, 1999.

BOSSONG, M.G.; VAN BERCKEL, B.N.; BOELLAARD, R.; ZUURMAN, L.; SCHUIT, R.C.; WINDHORST, A.D.; VAN GERVEN, J.M.; RAMSEY, N.F.; LAMMERTSMA, A.A.; KAHN, R.S. Delta-9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. *Neuropsychopharmacology* 34:759-766, 2009.

CAO, Q.; MARTINEZ, M.; ZHANG, J.; SANDERS, A.R.; BADNER, J.A.; CRAVCHIK, A.; MARKEY, C.J.; BESHAI, E.; GUROFF, J.J.; MAXWELL, M.E.; KAZUBA, D.M.; WHITEN, R.; GOLDIN, L.R.; GERSHON, E.S.; GEJMAN, P.V. Suggestive evidence for a schizophrenia susceptibility locus on chromosome 6q and a confirmation in an independent series of pedigrees. *Genomics* 43:1-8, 1997.

CASPI, A.; MOFFITT, T.E.; CANNON, M.; MCCLAY, J.; MURRAY, R.; HARRINGTON, H.; TAYLOR, A.; ARSENEAULT, L.; WILLIAMS, B.; BRAITHWAITE, A.; POULTON, R.; CRAIG, I.W. Moderation of the effect of adolescent-onset *Cannabis* use on adult psychosis by a functional polymorphism in the Catechol-O-Methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene x environment interaction. *Biological Psychiatry* 57: 1117-1127, 2005.

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 M.A. Cannabinoid receptor 1 gene (*CNRI*) and susceptibility to a quantitative phenotype for hebephrenic schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. Apr 5;147(3):279-84, 2008.

COFFER P.J.; JIN J.; WOODGETT J.R. Protein kinase B (c-Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*. 335(Pt 1):1-13, 1998.

DEAN, B.; SUNDRAM, S.; BRADBURY, R.; SCARR, E.; COPOLOV, D. 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* 103:9-15, 2001.

D'SOUZA, D.C.; PERRY, E.; MACDOUGALL, L.; AMMERMAN, Y.; COOPER, T.; WU, Y.T.; BRALEY, G.; GUEORGUIEVA, R.; KRYSTAL, J.H. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-

tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology* 29(8): 15558-72, 2004.

D'SOUZA, D.C.; ABI-SAAD, W.M.; MADONICK, S.; FORSELIUS-BIELEN, K.; DOERSCH, A.; BRALEY, G.; GUEORGUEVA, R.; COOPER, T.B.; KRYSTAL, J.H. Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis and addiction. *Biological Psychiatry* 57(6): 594-608, 2005.

D'SOUZA, D.C.; SEWELL, R.A.; RANGANATHAN M. Cannabis and psychosis/schizophrenia: human studies. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 259(7): 413-431, 2009.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-13, 1988.

ENDICOTT, J.; SPITZER, R.L.; FLEISS, J.L.; COHEN, J. The Global Assessment Scale: a procedure for measuring overall severity of psychiatry disturbance. *Archives of General Psychiatry* 33:766-771, 1976.

FERNANDEZ-ESPEJO E.; VIVEROS M.P.; NÚÑEZ L.; ELLENBROEK B.A.; RODRIGUEZ DE FONSECA F. Role of *cannabis* and endocannabinoids in the Genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. Jul 24, 2009.

FIRST, M.B.; SPITZER, R.L.; GIBSON, M.; WILLIAMS, J.B. - Structured clinical Interview for DSM-IV axis I disorders – Patient edition (SCID I/P, Version 2.0). American Psychiatric Association, Washington DC, 1996. (Tradução: Versiani M. Programa de Ansiedade e Depressão – IPUB/UFRJ).

GADZICKI, D.; MULLER-VAHL, K.; STUHRMANN, M. A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (*CNRI*) gene. *Mol. Cell. Probes* 13:321-323, 1999.

GOFF, D.C.; COYLE, J.T. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158:1367-1377, 2001.

GREEN, A.I.; TOHEN, M.F.; HAMER, R.M.; STRAKOWSKI, S.M.; LIEBERMAN, J.A.; GLICK, I.; CLARK, W.S. HDGH RESEARCH GROUP. First episode schizophrenia-related psychosis and substance use disorders: acute response to olanzapine and haloperidol. *Schizophrenia Research* 66:125-135, 2004.

GRIMES C.A.; JOPE R.S. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J. Neurochem.* 78:1219-1232, 2001.

GUINDALINI, C.; HOWARD, M.; HADDLEY, K.; LARANJEIRA, R.; COLLIER, D.; AMMAR, N.; CRAIG, I.; O'GARA, C.; BUBB, V.J.; GREENWOOD, T.; KELSOE, J.; ASHERSON, P.; MURRAY, R.M.; CASTELO, A.; QUINN, J.P.; VALLADA, H.; BREEN, G. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(12):4552-7, 2006.

GUT-FAYAND, A.; DERVAUX, A.; OLIE, J.P.; LOO, H.; POIRIER, M.F.; KREBS, M.O. Substance abuse and suicidality in schizophrenia: a common risk factor linked to impulsivity. *Psychiatry Research* 102: 65-72, 2001.

GUY, W.; ECDEU. Assessment Manual for Psychopharmacology. *Washington, DC: US Department of Health, Education and Welfare* 338:534-537, 1976.

HAMDANI, N.; TABEZE, J.P.; RAMOZ, N.; ADES, J.; HAMON, M.; SARFATI, Y.; BONI, C.; GORWOOD, P. The *CNR1* gene as a pharmacogenetic factor for antipsychotics rather than a susceptibility gene for schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology* 18(1):34-40, 2008.

HENQUET, C.; KRABBENDAM, L.; SPAUWEN, J.; ET AL. Prospective cohort study of *cannabis* use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *Brit Med J* 330(7481):11, 2005.

HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; DE COSTA, B.R. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiography study. *J Neurosci* 11:563-83, 1991.

HO, B.-C.; WASSINK T.H.; ZIEBELL S.; ANDREASEN N.C. Cannabinoid receptor 1 gene polymorphisms and marijuana misuse interactions on white matter and cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr. Res.* (2011), doi:10.1016/j.schres.2011.02.021.

HUTCHISON, K.E.; STALLINGS, M.; MCGEARY, J.; BRYAN, A. Population stratification in the candidate gene study: fatal threat or red herring? *Psychol Bull.* 130(1): 66-79, 2004.

IDE M.; OHNISHI T.; MURAYAMA M.; MATSUMOTOI; YAMADA K.; IWAYAMA Y.; DEDOVAI; TOYOTA T.; ASADA T.; TAKASHIMA A.; YOSHIKAWA T. Failure to support a genetic contribution of *AKT1* polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia. *J. Neurochem.* 99(1):277-287, 2006.

JOO E.J.; LEE K.Y.; JEONG S.H.; ROH M.S.; KIM S.H.; AHN Y.M.; KIM Y.S. *AKT1* Gene Polymorphisms and Obstetric Complications in the Patients with Schizophrenia. *Psychiatry Invest.* 6:102-107, 2009.

KANE J.M.; LIEBERMAN J. Maintenance pharmacotherapy in schizophrenia. In: Meltzer H.Y. (ed.). *The Emergence of Molecular Biology and Biological Psychiatry. New York: Raven Press*, pp. 1103-9, 1987.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 158: 360-369, 2001.

KAY, S.R.; FISZBEIN, A.; OPLER, L.A. The Positive and Negative Syndrome Scale for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 13: 261-76, 1987.

KENETH O.; JOBSON, M.D. The International Psychopharmacology Algorithm Project (IPAP) – Schizophrenia Algorithm, Schizophrenia Algorithm Modes. Disponível em URL: www.ipap.org.

KOETHE D.; HOYER C.; LEWEKE F.M. The endocannabinoid system as a target for modelling psychosis. *Psychopharmacology (Berl)*. Jun 16, 2009.

KOYCHEV I, EL-DEREDY W, DEAKIN JF New visual information processing abnormality biomarker for the diagnosis of Schizophrenia. *Expert Opin Med Diagn.* 1;5(4):357-368, 2011.

KRAEPELIN, E. *La demencia precoz*, edição em castelhano vol I. Editorial Polemos, Buenos Aires, 1996.

KRANZLER H.N.; KESTER H.M.; GERBINO-ROSEN G.; HENDERSON I.N.; YOUNGERMAN J.; BEAUZILE G.; DITKOWSKY K.; KUMRA S. Treatment-refractory schizophrenia in children and adolescents: an update on clozapine and other pharmacologic interventions. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 15(1):135-59, 2006.

LARA, D.R.; DALL'IGNA, O.P.; GHISOLFI, E.S.; BRUNSTEIN, M.G. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:617-629, 2006.

LARUELLE, M. et al. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9235-9240, 1996.

LEE K.Y.; JOO E.J.; JEONG S.H.; KANG U.G.; ROH M.S.; KIM S.H.; SONG J.Y.; HWANG J.Y.; KIM S.G.; LEE N.; AHN Y.M.; KIM Y.S. No association between *AKT1* polymorphism and schizophrenia: a case-control study in a Korean population and a meta-analysis. *Neurosci. Res.* 66(3):238-45, 2010.

LEROY S.; GRIFFON N.; BOURDEL M.C.; OLIÉ J.P.; POIRIER M.F.; KREBS M.O. Schizophrenia and the cannabinoid receptor type 1 (CB1): association study using a single-base polymorphism in coding exon 1. *Am J Med Genet* 105(8):749-52, 2001.

LEWEKE, F.M.; GIUFFRIDA, A.; WURSTER, U.; EMRICH, H.M.; PIOMELLI, D. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport* 10(8):1665-9, 1999.

LEWIS, D.A.; LEVITT, P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409-432, 2002.

MACLELLAN, A.T.; LUBORSKY, L.; WOODY, G.E.; O'BRIEN, C.P. An improved diagnostic evaluation instrument for substance abuse patients: The Addiction Severity Index. *J Nerv Ment Dis* 168:26-33, 1980.

MANNING B.D.; CANTLEY L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274, 2007.

MARTÍNEZ-GRAS I, HOENICKA J, PONCE G, RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ R, JIMÉNEZ-ARRIERO MA, PÉREZ-HERNANDEZ E, AMPUERO I, RAMOS-ATANCE JA, PALOMO T, RUBIO G. (AAT)_n repeat in the cannabinoid receptor gene, *CNRI*: association with schizophrenia in a Spanish population. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* Oct 256(7):437-41, 2006.

MATHERS, C.D.; LOPEZ, A.D.; MURRAY, C.J.L. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. *Global Burden of Disease and Risk Factors*, LOPEZ, A.D.; MATHERS, C.D.; MAJID, E.; JAMISON, D.T.; MURRAY, C.J.L. (eds.), 45-240. New York: Oxford University Press, 2006.

MCDONALD, C.; MURRAY, R.M. Early and late environmental risk factors for schizophrenia. *Brain Res Rev* 31:130-137, 2000.

MELTZER HY, RABINOWITZ J, LEE MA, COLA PA, RANJAN R, FINDLING RL, THOMPSON PA. Age at onset and gender of schizophrenic patients in relation to neuroleptic resistance. *Am J Psychiatry*. 154(4):475-82, 1997.

NOTO, C.S.; BRESSAN, R.A. Avanços no tratamento multidisciplinar da esquizofrenia. 1ª ed. São Paulo: Casa Leitura Médica, 2010.

ONAIVE E.S. Cannabinoid receptors in brain: pharmacogenetics, neuropharmacology, neurotoxicology, and potential therapeutic applications. *Int Rev Neurobiol*. 88:335-69, 2009.

OZAITA A.; PUIGHERMANAL E.; MALDONADO R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *Journal of Neurochemistry* 102(4):1105-1114, 2007.

SANTOS, N.P.; RIBEIRO-RODRIGUES, E.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; PEREIRA R.; GUSMÃO L.; AMORIM A.; *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human Mutation* 2010;31:184–90.

SCHUMACHER, J.; SCHULZE, T.G.; WIENKER, T.F.; ET AL. Pharmacogenetics of the clozapine response. *Lancet* 356 (9228), 506, 2000.

SCHWAB S.G.; HOEFGEN B.; HANSES C.; HASSENBACH M.B.; ALBUS M.; LERER B.; TRIXLER M.; MAIER W.; WILDENAUER D.B. Further evidence for association of variants in the *AKT1* gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families. *Biol. Psychiatry* 58:446–450, 2005.

SEIFERT J, OSSEGE S, EMRICH HM, SCHNEIDER U, STUHRMANN M. No association of *CNR1* gene variations with susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett*. Oct 9;426(1):29-33, 2007.

TALBOT, P.S; LARUELLE, M. The role of in vivo imaging with PET and SPECT in the elucidation of psychiatry drug action and new drug development. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:503-511, 2002.

TAKAYANAGI Y.; TAKAHASHI T.; ORIKABE L.; MOZUE Y.; KAWASAKI Y.; NAKAMURA K.; SATO Y.; ITOKAWA M.; YAMASUE H.; KASAI K.; KURACHI M.; OKAZAKI Y.; SUZUKI M. Classification of first-episode schizophrenia patients and healthy subjects by automated MRI measures of regional brain volume and cortical thickness. *PLoS One*. 6(6):e21047. Epub 2011 Jun 21, 2011.

THISLTON, D.L.; VLADIMIROV V.I.; KUO P.H.; MCCLAY J.; WORMLEY B.; FANOUS A.; O'NEILL F.A.; WALSH D.; VAN DEN OORD E.J.; KENDLER K.S.; RILEY B.P. *AKT1* is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families. *Biol. Psychiatry* 63:449–457, 2008.

TSAI S.J.; WANG Y.C.; HONG C.J. Association study of a cannabinoid receptor gene (*CNR1*) polymorphism and schizophrenia. *Psychiatric Genetics* 10(3):149-51, 2000.

TURNER, W.M.; TSUANG, M. T. Impact of substance abuse on the course and outcome of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 16 87-95, 1990.

UJIKE, H.; TAKAKI, M.; NAKATA, K.; ET AL. *CNRI*, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7:515-518, 2002.]

URIGÜEN L.; GARCÍA-FUSTER M.J.; CALLADO L.F.; MORENTIN B.; LA HARPE R.; CASADÓ V.; LLUIS C.; FRANCO R.; GARCÍA-SEVILLA J.A.; MEANA J.J. 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):313-24, 2009

VAN WINKEL R.; GENETIC RISK AND OUTCOME OF PSYCHOSIS (GROUP) INVESTIGATORS. *Family-based analysis of genetic variation underlying psychosis-inducing effects of cannabis: sibling analysis and proband follow-up*. *Arch. Gen. Psychiatry* 68(2):148-57, 2010.

VERDOUX, H.; GINDRE, C.; SORBARA, F.; TOURNIER, M.; SWENDSEN, J.D. Effects of *cannabis* and psychosis vulnerability in daily life: an experience sampling test study. *Psychol Med* 33(1):23-32, 2003.

WATCHARASIT P.; BIJUR G. N.; ZMIJEWSKI J. W.; SONG L.; ZMIJEWSKA A.; CHEN X.; JOHNSON G. V.; JOPE R. S. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proc. Natl Acad. Sci.* 99:7951-7955, 2002.

XU M.Q.; XING Q.H.; ZHENG Y.L.; LI S.; GAO J.J.; HE G.; GUO T.W.; FENG G.Y.; XU F.; HE L. Association of *AKT1* gene polymorphisms with risk of schizophrenia and with response to antipsychotics in the Chinese population. *J. Clin. Psychiatry* 68:1358-1367, 2007.

ZHAO Z.; KSIEZAK-REDING H.; RIGGIO S.; HAROUTUNIAN V.; PASINETTI G.M. Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction. *Schizophr. Res.* 84:1-14, 2006.

ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.S; HALLAK, J.E.C.; MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES, F.S. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* 39(4):421-29, 2006.