

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Tema de investigación

ASOCIACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE COPIAS DEL VNTR DEL
PROMOTOR INTERNO DEL EXÓN 3 DEL GEN *MIR137HG* Y LA EDAD DE INICIO
DE LA ESQUIZOFRENIA EN EL VALLE CENTRAL DE COSTA RICA

Informe final de la Investigación Dirigida de Graduación para optar por el grado de
Licenciatura en Genética Humana

Presentado por:

Alejandro Ávila Aguirre

B20696

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2018

HOJA DE APROBACIÓN

ASOCIACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE COPIAS DEL VNTR DEL
PROMOTOR INTERNO DEL EXÓN 3 DEL GEN *MIR137HG* Y LA EDAD DE INICIO
DE LA ESQUIZOFRENIA EN EL VALLE CENTRAL DE COSTA RICA

Dr.rer.nat. Gabriela Chavarría Soley
Directora del Trabajo Final de Graduación

M.Sc. Daniel Briceño Lobo
Presidente del Tribunal Examinador

MSc. Henriette Raventós Vorst
Lectora I

Dr.rer.nat. Alejandro Leal Esquivel
Miembro del tribunal

Dr.sc.hum. Jorge Azofeifa Navas
Lector II

BSc. Alejandro Ávila Aguirre
Postulante

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi familia, particularmente a mi abuelo José Dolores Aguirre Aguirre, el cual no está conmigo físicamente pero sí espiritualmente. Se lo dedico debido a su amor, valores y enseñanzas que me inculcó y a trabajar de manera silenciosa, pero con mucho esfuerzo y constancia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el don de la vida y todas las oportunidades que me brinda

A toda mi familia por todo el amor, cariño, respeto y el apoyo que me brindan. A mi mamá, Evelyn Aguirre Peralta, porque sin ella, no sería lo que soy, tanto personal como en lo académico. A mi abuela Carmen Peralta Vázquez, porque siempre ha confiado en mí en todos aspectos y por los valores que me ha inculcado. A Sol y Emmy, a quienes considero mis sobrinas, por siempre sacarme una sonrisa.

A la Dr.rer.nat. Gabriela Chavarría Soley, por ser mi profesora consejera desde mi segundo año de carrera y ser mi tutora para la presente investigación. También, por ser la persona de la cual obtuve más conocimientos, fundamentales para mi formación académica.

A MSc. Henriette Raventós Vorst, por ser una excelente persona y profesional, por confiar en mi persona y en mi potencial, aun cuando yo no lo creía así. Por ser parte del Comité de Tesis y por sus valiosos aportes en las revisiones. También por permitirme integrar su grupo de investigación, en el cual he aprendido muchísimo.

Al Dr.sc.hum. Jorge Azofeifa Navas, por aceptar formar parte del Comité de Tesis y por todos los comentarios, observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo.

A Patricia Bolaños Palmieri, ya que su trabajo sobre el papel de los microARNs en la etiología de la esquizofrenia, corresponde a la base de la presente investigación.

A Lara Mora Villalobos y a Javier Contreras Rojas por su apoyo, principalmente al inicio de la investigación con las preguntas que tenía sobre la muestra a emplear. También por permitirme trabajar con ellos, lo cual ha sido muy importante para mí.

Doy gracias a mis amigas y compañeras Daniela Ugalde Araya y Carolina Coto Vílchez por todo lo que compartimos, incluido un congreso, por su motivación y cooperación en distintas

momentos prácticos de la tesis. También a María Fernanda Francis Cartín, Ana Marcela Murillo Jiménez y Juan Carlos Bocker Cruz, quienes me ayudaron en distintas etapas prácticas del presente estudio.

A los amigos que he tenido durante este recorrido en la Universidad: Fabiola Jiménez González, Juan Diego Barquero Bolaños, Natalia Jiménez Conejo, Valeria Gallardo Castro y Priscila Quirós Segura, así como mis amigos de siempre de Puntarenas: José Mario Álvarez Matarrita, Eder Méndez Campos, Christian Ramírez Reyes y Esteban Sequeira Castillo por estar conmigo en momentos muy buenos y otros difíciles, siempre he valorado su amistad.

A todos los profesores y asistentes de las distintas asignaturas que cursé, a los compañeros de asistencias y a los estudiantes que tuve a cargo durante las mismas. En general, a cada persona con la que compartí durante este recorrido por la Universidad.

ÍNDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xiii
I. Esquizofrenia	1
II. MicroARNs	3
III. MicroARNs y Sistema Nervioso	5
III.1 MicroARNs y esquizofrenia	6
IV. miR-137 y Sistema Nervioso	8
IV.1 miR-137 y esquizofrenia	9
V. VNTR: Rol en Sistema Nervioso y esquizofrenia	11
VI. VNTR en miR-137	12
VII. Justificación	13
VIII Objetivos	16
VIII. 1. Objetivo General:	16
VIII. 2. Objetivos específicos:	16
IX. Hipótesis	17
X. Predicción	17
XI. MATERIALES Y MÉTODOS	17
XI. 1. Sujetos de estudio	17
XI. 2. Amplificación PCR, purificación y secuenciación	18
XI. 3. Análisis de secuencias	18
XI. 4. Análisis estadístico	19
XII. RESULTADOS	19

XIII. DISCUSIÓN.....	22
XIV. REFERENCIAS	28

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de la edad de inicio de la esquizofrenia según sexo.....	20
Cuadro 2. Frecuencias alélicas y genotípicas del VNTR de miR-137 en la muestra total y por sexo.....	21
Cuadro 3. Distribución de individuos según edad de inicio de la esquizofrenia acorde al genotipo.....	21

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- 5HTTLPR:** Serotonin transporter gene-linked polymorphic region (Región polimórfica ligada al gen del transportador de serotonina)
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- ASCL1:** Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1 (Factor de transcripción 1 de la familia Achaete-Scute BHLH)
- BDNF:** Brain-derived neurotrophic factor (Factor neurotrófico derivado de cerebro)
- C10orf26:** Chromosome 10 Open Reading Frame 26 (Marco de lectura abierto 26 del cromosoma 10)
- CACNA1C** Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C (Subunidad alfa 1 C del canal de calcio voltaje dependiente)
- COMT:** Catechol-O-methyltransferasa (Catecol-O-metiltransferasa)
- CSMD1:** CUB And Sushi Multiple Domains 1 (Múltiples dominios 1 CUB y Sushi)
- CYP2C9:** Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 9 (Citocromo P450, Familia 2, Subfamilia C, Miembro 9)
- DAT1:** Dopamine active transporter 1 gene (Transportador activo de dopamina 1)
- DGCR8:** DiGeorge Syndrome critic region 8 (Región crítica 8 del gen del síndrome de DiGeorge)

DNMT3A: DNA Methyltransferase 3 Alpha (ADN Metiltransferasa 3 alfa)

DPYSL3: Dihydropyrimidinase Like 3 (Similar a Dihidropirimidinasas 3)

DRD4: Dopamine Receptor D4 (Receptor D4 de dopamina)

DTNBP1: Dystrobrevin-binding protein 1 or Dysbindin-1 (Proteína 1 de unión a Distrobrevina o Disbindina 1)

FAT4: FAT Atypical Cadherin 4 (Cadherina 4 atípica FAT)

G: Guanina

GAD₆₇: Glutamic acid decarboxylase₆₇ (Descarboxilasa₆₇ de ácido glutámico)

GATA2: GATA Binding protein 2 (Proteína 2 de unión a GATA)

GRIA2: Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 2 (Subunidad 2 del receptor de glutamato AMPA ionotrópico)

HEK293: Human Embryonic Kidney 293 cells (Células embrionarias de riñón humano 293)

ITGB3: Integrin Subunit Beta 3 (Subunidad integrina- β 3)

kb: kilobase

LSD1: Lysine-specific histone demethylase 1 (histona desmetilasa 1 específica de lisina)

LUZP2: Leucine Zipper Protein 2 (Proteína Zipper de Leucina 2)

MB-COMT: Membrane-bound catechol-O-methyltransferase (Catecol-o-metiltransferasa unida a membrana)

Met: Metionina

miR: microARN

MITF: Microphthalmia-Associated Transcription Factor (Factor de transcripción asociado a microftalmia)

MTFHR: Methylenetetrahydrofolate Reductase (Metilentetrahidrofolato reductasa)

NMDA: N-methyl-D-aspartate (N-metil-D-aspartato)

NPPA: Natriuretic Peptide A (Péptido Natriurético A)

NRG1: Neuregulin 1 (Neuregulina 1)

NRGN: Neurogranin (Neurogranina)

Nrp-2: Neuropilin 2 (Neuropilina 2)

PAST: PAleontological STatistics (Estadística Paleontológica)

PHLDA1: Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 1 (Miembro 1 Familia A miembro homólogo similar a Pleckstrin)

pre-miARN: microARN precursor

pri-miARN: microARN primario

RELN: Reelin (Reelina)

RISC: RNA-Induced Silencing Complex (Complejo de silenciamiento inducido por ARN)

SLC6A4: Solute Carrier Family 6 Member 4 (Miembro 4 Familia 6 Transportador de Solutos)

SNP:	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un único nucleótido)
Sp1:	Specificity protein 1 (Proteína de especificidad 1)
STin2:	Serotonin Transporter Intronic 2 (Transportador de serotonina intrónico 2)
<i>STMN4</i> :	Stathmin 4 (Estatimina 4)
T:	Timina
<i>TCF4</i> :	Transcription factor 4 (Factor de transcripción 4)
<i>TLX</i> :	Nuclear Receptor TLX (Receptor nuclear TLX) o NR2E1 (Nuclear receptor subfamily 2 group E member 1: miembro 1 grupo E subfamilia 2 receptor nuclear)
TRBP:	TAR Binding protein (Proteína de unión a TAR)
UTR:	Untranslated region (región no traducida)
Val:	Valina
VNTR:	Variable Number Tandem Repeat (Repetición en tándem de número variable)
<i>VSNI1</i> :	Visinin like 1 (Similar a Visinina 1)
<i>ZNF804A</i> :	Zinc Finger Protein 804A (Proteína de dedo de zinc 804A)

RESUMEN

La esquizofrenia es una enfermedad neuropsiquiátrica causada por factores genéticos, ambientales y de desarrollo. En el aspecto genético, se han identificado loci cuyo efecto en la esquizofrenia es pequeño, por lo que se han propuesto como factores contribuyentes al fenotipo a mecanismos relacionados con la expresión de los genes como la regulación mediada por microARNs. Debido a que muchos microARNs se expresan en cerebro, participan en múltiples redes de control y tienen efecto pleiotrópico, se han considerado como candidatos de causas genéticas de enfermedades. El microARN miR-137 se ha estudiado a raíz de que variantes de este gen se han asociado con la esquizofrenia. Este ARN no codificante participa en procesos de migración, maduración y diferenciación neuronal e interactúa con otros genes, también asociados a la enfermedad, lo que sugiere un papel en la etiología de la esquizofrenia. Se ha identificado una repetición en tándem de número variable (VNTR) en un promotor interno del exón 3 de *MIR137HG* que influye en la estructura y expresión de miR-137. Recientemente se ha descrito que el VNTR puede afectar la edad de inicio de la enfermedad. Debido a que hay muy pocos estudios al respecto, se propone determinar si el número de repeticiones del VNTR de miR-137 se asocia con edad de inicio de la esquizofrenia en un grupo de 132 costarricenses con la enfermedad. Se amplificó el VNTR del promotor interno del exón 3 de *MIR137HG* en el ADN de los 132 individuos, las muestras se enviaron a purificar y a secuenciar mediante secuenciación de Sanger y se determinó el genotipo para el VNTR según número de repeticiones para cada sujeto mediante el programa Chromas Lite 2.1.1. Se empleó las pruebas U de Mann Whitney y Kruskal Wallis, para determinar si hay diferencias en la edad de inicio de la esquizofrenia entre sexos y probar la hipótesis de que un mayor número de repeticiones se asocia con una edad de inicio promedio más temprana de la enfermedad, respectivamente. La edad de inicio promedio de la esquizofrenia en esta muestra fue menor en hombres que en mujeres (U=1676,

$p=0.04$). Se encontraron 3 y 4 repeticiones para el VNTR de miR-137, sin diferencia de edad de inicio promedio de la enfermedad entre individuos con genotipo 3_3, 3_4 y 4_4 ($H(2)=0.76$, $p=0.68$). Las diferencias entre sexos se puede deber a la definición de edad de inicio entre estudios que complica su comparación, al hecho de que hombres son hospitalizados más temprano, el efecto protector de los estrógenos en las mujeres, presiones sociales distintas y los diferentes subtipos de la esquizofrenia. Estudios indican un patrón general de que a mayor número de repeticiones del VNTR, hay menor expresión de miR-137 y un procesamiento incorrecto de sus precursores. Aunque este trabajo no encontró asociación entre el genotipo del VNTR estudiado y la edad de inicio de la esquizofrenia, dado el importante papel de miR-137 a nivel de sistema nervioso, se requiere mayor investigación para determinar el papel de las variantes de este microARN en los procesos microARN regula.

Palabras clave: esquizofrenia, microARN, miR-137, *MIR137HG*, VNTR, edad de inicio

I. Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico severo que afecta alrededor del 1% de la población mundial (Sartorius et al., 1986). Tradicionalmente, las manifestaciones clínicas se han dividido en positivas y negativas. Las primeras se caracterizan por una exageración de funciones normales y la presencia de algo que debería estar ausente: pérdida de contacto con la realidad, alucinaciones, ilusiones, comportamiento y pensamientos desorganizados (Andreasen, 1995). Las negativas están caracterizadas por la ausencia de lo que debería estar presente: la avolición, reducido sentimiento de placer y disminución en el habla (Andreasen, 1995). Dentro de éstas se presentan alteraciones en la memoria, ejecución, planeamiento y resolución de problemas que forman parte de funciones neurocognitivas (Addington & Addington, 1999; Addington & Addington, 2000). La esquizofrenia presenta comorbilidad con otras enfermedades y trastornos psiquiátricos como ansiedad, abuso de sustancias y depresión (Braga, Reynolds & Siris, 2013; Regier et al., 1990; Sands & Harrow, 1999).

Es una enfermedad que afecta principalmente a personas jóvenes, usualmente individuos en etapa de adolescencia tardía e inicios de la vida adulta (Andreasen, 1995). En algunas investigaciones se ha reportado que la edad de inicio de la esquizofrenia difiere entre sexos, iniciando este trastorno más temprano en hombres (Angermeyer & Kühn, 1988, Takahashi et al., 2000; Tang et al., 2007), sin embargo hay excepciones (Venkatesh et al., 2008). Para el Valle Central de Costa Rica se ha reportado que la edad de inicio promedio de la esquizofrenia es de 21,39 años, sin diferencias entre sexos (Contreras, Montero, Dassori, Escamilla & Raventós, 2008).

Aún no se han descrito todos los factores etiológicos contribuyentes de la esquizofrenia pero se ha asociado con componentes genéticos, ambientales y del desarrollo (Cannon & Jones, 1996; Jones, 1997). En el aspecto ambiental, se han identificado factores de riesgo que incluyen complicaciones obstétricas, exposición materna a infecciones, el

abuso de sustancias, estado migratorio, urbanicidad y eventos adversos (Andréasson, Engström, Allebeck, Rydberg, 1987; Jones, Rantakallio, Hartikainen, Isohanni & Sipila, 1998; McDonald & Murray, 2000; Vassos, Pedersen, Murray, Collier & Lewis, 2012; Ventura, Nuechterlein, Lukoff & Hardesty, 1987; Wessely, Castle, Der & Murray, 1991).

Se ha estimado que los factores genéticos contribuyen hasta en un 81 % a la variancia fenotípica en la susceptibilidad de la esquizofrenia (Sullivan, Kendler & Neale, 2003), lo cual sugiere un papel fundamental de la genética en la etiología de la enfermedad. Mediante meta-análisis, incluyendo 32 estudios independientes de todo el mundo, se identificó a los cromosomas 1, 2q, 3q, 4q, 5q, 8p y 10q, con regiones que contienen loci probablemente asociados con la esquizofrenia (Ng et al., 2009). Otro análisis obtuvo señales significativas en los cromosomas 6p21.3-22.1, 11q24.2 y 18q21.2, comprendiendo el complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6 (Stefansson et al., 2009). Un meta-análisis más reciente, ha identificado al menos 108 loci asociados con esquizofrenia (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014), que explican solo un porcentaje pequeño de la heredabilidad. En Costa Rica, se han realizado estudios de ligamiento, encontrándose posibles regiones con genes de susceptibilidad de esquizofrenia, e incluso estos análisis han sido empleados en otras investigaciones a nivel internacional, obteniendo resultados similares. Algunos loci identificados se localizan en 5p13 (con puntaje sugerente de ligamiento); 8p23.1, 8q13.3 y 13q (Cooper-Casey et al., 2005; Escamilla et al., 2001; Walss-Bass et al., 2006). Por lo tanto, se ha propuesto la existencia de varios loci y genes candidatos distribuidos por todo el genoma, cuyo efecto es pequeño (Picchioni & Murray, 2007), lo cual complica el estudio de este trastorno.

Dentro de las regiones identificadas, destacan ciertos genes como candidatos de la esquizofrenia. Uno de ellos es el gen de la neuregulina 1 (*NRG1*) (Stefansson et al., 2002), importante en la promoción de la migración y diferenciación neuronal, la inducción de receptores N-metil D-aspartato y transmisión glutamatérgica (Buonanno & Fishbach, 2001).

Otro gen asociado es el de la disbindina (*DTNBP1*) (Straub et al., 2002), localizado en 6p22.3, relacionado también con receptores NMDA. La neurogranina (codificada por el gen *NRGN*) participa en la regulación de calcio y calmodulina (Pak et al., 2000).

Se ha propuesto que otros mecanismos que afectan la expresión de genes, como la modulación epigenética y los microARNs, podrían estar involucrados en la etiología de la esquizofrenia. Se ha encontrado que ciertos genes candidatos en esquizofrenia presentan niveles de expresión alterados. Tal es el caso de *NRGN*, con expresión reducida en la corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia, lo cual podría sugerir alteraciones en las rutas dependientes del calcio y calmodulina (Broadbelt, Ramprasaud & Jones, 2006). Los genes de la reelina (*RELN*) y de la descarboxilasa₆₇ de ácido glutámico (*GAD₆₇*), cuya expresión de su ARNm y proteína, respectivamente, en la corteza prefrontal se ve reducida hasta en un 50% en individuos con esquizofrenia o trastorno bipolar (Guidotti et al., 2000). Lo anterior podría deberse a que ciertos genes candidatos están modificados epigenéticamente. Precisamente, el gen *RELN*, importante en procesos de migración neuronal, sinaptogénesis y señalización celular, presenta hipermetilación de su promotor en esquizofrenia, lo cual reduce su expresión (Abdomaleky et al., 2005; Grayson et al., 2005). Con el gen catechol-o-metiltransferasa unida a membrana (*MB-COMT*) sucede lo contrario, ya que su promotor está hipometilado en sujetos con esquizofrenia y trastorno bipolar, sobre-expresándose, lo podría aumentar la degradación de dopamina (Abdomaleky et al., 2006).

II. MicroARNs

Tal y como se mencionó anteriormente, uno de mecanismos genéticos alternativos que se ha propuesto en el estudio de las causas de enfermedades complejas como esquizofrenia es el control de la expresión genética mediante microARNs. Los microARNs son secuencias cortas de ARN no codificantes cuya función primordial es la regulación post-transcripcional. Su estudio se justifica pues regulan varios ARNs mensajeros (ARNm y las proteínas codificadas por ellos) (Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008), por lo que podrían

participar en la etiología de enfermedades con cierta base genética como la esquizofrenia (Wright, Turner, Calhoun & Perrone-Bizzozero, 2013).

Los microARNs corresponden a moléculas pequeñas de ARN de entre 17 y 25 nucleótidos, con un promedio de aproximadamente 22, que son procesados de precursores de mayor longitud (Bartel, 2004). La biogénesis de los mismos se caracteriza por una serie de pasos y distintas proteínas. El ADN se transcribe por la ARN polimerasa II para formar ARN primario largo (pri-miARNs). Éste presenta una estructura de doble banda que es reconocida por el complejo compuesto por Drosha, una ARNasa endonucleasa III, así como por DGCR8, que cortan en la base del bucle lo que libera un ARN precursor (pre-miARN) de 60 a 70 nucleótidos (Melo & Melo, 2013). El pre-miARN es exportado hacia el citoplasma por la acción de la exportina 5 donde es procesado por DICER junto a TRBP (proteína de unión a TAR) (Melo & Melo, 2013). Dichas proteínas junto a una Argonauta, componen RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), el cual es dirigido por el microARN hacia su objetivo.

La clave para la interacción entre el microARN y su ARN mensajero blanco es el emparejamiento de bases, principalmente a través de sitios de unión localizados en el extremo 3' UTR, del ARNm con múltiples copias lo que permite represión de manera efectiva (Filipowicz, Bhattacharyya & Sonenberg, 2008). Hay tres condiciones que se deben cumplir para la interacción: complementariedad contigua y perfecta en la región semilla entre los nucleótidos 2 al 8 del miARN, abultamientos en el centro del dúplex de ambas moléculas que impidan la acción endonucleotídica de proteínas como Argonautas y en ciertos casos, hay sitios suplementarios de complementariedad entre los nucleótidos 13 al 16 para estabilizar la unión (Bartel, 2009; Filipowicz et al., 2008). Según señalización, después de la unión del microARN, se degradan los ARNm complementarios por rompimiento endonucleotídico si la complementariedad es perfecta entre el microARN y el ARNm, pero si no es así, se inhibe la traducción del transcripto y su blanco (Liu, 2008). La unión se ve

afectada por interacción con proteínas accesorias, la estructura secundaria del ARN mensajero, el nivel de apareamiento de la secuencia en la región núcleo y el grado de conservación de las secuencias de unión en los ARN mensajeros objetivos (Nielsen et al., 2007; Robins, Li & Padgett, 2005; Sætrom et al., 2007).

Algunos microARNs presentan una expresión amplia, mientras que otros son específicos de ciertos tejidos, tipos celulares o etapa del desarrollo (Lagos-Quintana, Rauhut, Yalcin, Meyer, Lendeckel & Tuschl, 2002; Houbaviy, Murray & Sharp, 2003; Sempere et al., 2004). Un mismo microARN puede tener varios blancos, en promedio se predicen de 100 a 200 sitios blanco (Brennecke, Stark, Russell & Cohen, 2005; Krek et al., 2005), mientras que un mismo gen puede ser regulado por más de un microARN (Krek et al., 2005). Los microARNs se pueden localizar en exones e intrones, tanto en unidades de transcripción no codificantes como en transcritos que codifican para proteínas (Melo & Melo, 2013). Aunque se han registrado poco menos de 2000 microARNs en humanos (miRBase, <http://www.mirbase.org/>), un estudio sugiere que el número de genes de microARNs es superior, alcanzando los 3000 (Friedländer et al., 2014). Se predice que los microARNs regulan al menos aproximadamente entre un 30% (Lewis, Burge & Bartel, 2005) y un 60% (Friedman, Farh, Burge & Bartel, 2009) de los genes humanos que codifican para proteínas, objetivos de los microARNs. Estos genes se relacionan con distintos procesos como apoptosis, transducción de señales, diferenciación, proliferación y ciclo celular (Bueno & Malumbres, 2011; Ferretti, 2008; Hamada, Masamune, Miura, Satoh & Shimosegawa, 2014).

III. MicroARNs y Sistema Nervioso

El cerebro humano consta de una gran diversidad de distintos tipos celulares que incluyen aproximadamente 86 billones de neuronas (Azevedo et al., 2009), que conforman una red neural compleja de información. Por ende, el estudio de la regulación de los procesos del sistema nervioso y las moléculas involucradas, como los microARNs, permitirían una mejor comprensión del neurodesarrollo. Muchos microARNs son abundantes en cerebro y la

expresión de varios de ellos es específica tanto temporal como espacialmente, en tejidos como corteza prefrontal dorsolateral, cerebelo e hipocampo (Ziat & Rennert, 2014). A nivel nucleotídico, algunos microARNs están conservados entre distintas especies, como miR-124 que presenta 100% de conservación desde nemátodos hasta humanos (Lagos-Quintana et al., 2002; Gao, 2008). Lo mismo sucede con miR-9a de *Drosophila* y vertebrados (Coolen, Katz & Bally-Cuif, 2013). Precisamente, los genes que son regulados por esta clase de ARNs se relacionan con transcripción, sinaptogénesis y neurodesarrollo (Ziat & Rennert, 2014).

El microARN miR-124, con alta expresión en neuronas, modula negativamente la expresión del ARNm de la proteína de especificidad 1 (Sp1) durante la neurogénesis, influyendo en etapas tempranas del proceso de diferenciación neuronal en células troncales mesenquimales (Mondanizadeh, Arefian, Mosayebi, Saidijam, Khansarinejad & Hashemi, 2015). Otros microARNs juegan un papel en la formación dendrítica y plasticidad sináptica, como es el caso de miR-188, el cual tiene como blanco a la proteína neuropilina-2 (Nrp-2) que regula negativamente el desarrollo espinal y estructura sináptica (Lee et al., 2012). Se ha identificado que miR-146a modula negativamente ARNs mensajeros inflamatorios en células astrogliales y microgliales (Li et al., 2011), por lo que el proceso de inflamación del sistema nervioso central, se puede alterar por la función de los microARNs.

III.1 MicroARNs y esquizofrenia

Se ha sugerido que la esquizofrenia podría estar asociada a un aumento global tanto de la biogénesis como de la expresión de los microARNs en distintas áreas de la corteza cerebral (Beveridge, Gardiner, Carroll, Tooney & Cairns, 2010; Santarelli, Beveridge, Tooney & Cairns, 2011). Tal es el caso de miR-181b, cuya expresión está incrementada en el giro temporal superior de individuos esquizofrénicos y ocasiona desregulación de los genes visinina tipo 1 (*VSNLI*), que corresponde a un sensor de calcio; y el gen subunidad 2 del receptor de glutamato AMPA ionotrópico (*GRIA2*) con un papel importante en neurotransmisión excitatoria (Beveridge et al., 2008). Esos cambios en la expresión podrían

ser influenciados por componentes necesarios para la biogénesis de los microARNs. Un aumento en la expresión de DICER, incrementa el procesamiento de ciertos microARNs en el Área 46 de Broadmann de la corteza prefrontal dorsolateral de sujetos con esquizofrenia (Santarelli et al., 2011). Se ha encontrado regulación positiva del ARNm de DGCR8 en el giro temporal superior y la corteza prefrontal dorsolateral, lo que podría explicar cambios en la expresión de microARNs en la enfermedad (Beveridge et al., 2010). Es importante recalcar que el gen que codifica para la proteína DGCR8, se localiza en cromosoma 22q11.2, región que muestra asociación con la esquizofrenia (Stone et al., 2008) y se han encontrado deleciones en esta posición cromosómica en individuos que presentan la enfermedad (Karayiorgou et al., 1995).

Sin embargo, hay microARNs cuya expresión está reducida en la esquizofrenia. Un estudio encontró 16 microARNs expresados diferencialmente, encontrando 15 de ellos regulados negativamente en individuos con esquizofrenia y trastorno esquizoafectivo al comparar con sujetos no afectados (Perkins et al., 2007). Dentro de ellos, miR-30a-5p y miR-195 presentan sitios de unión al ARNm del gen *BDNF*, mostrando una relación inversa con los niveles proteicos del mencionado gen (Mellios, Huang, Grigorenko, Rogaev & Akbarian, 2008), lo que modularía negativamente a ARNm GABAérgicos que se relacionarían con esquizofrenia (Mellios et al., 2009) Otro caso es el de miR-132, cuya desregulación en la corteza prefrontal dorsolateral de individuos afectados, influye en la expresión de sus blancos como *DNMT3A*, *GATA2* y *DPYSL3*, alterando procesos del neurodesarrollo (Miller et al., 2012).

Se ha encontrado asociación entre polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) de microARNs con esquizofrenia. Tal es el caso de rs17578796 y rs1700, correspondientes a miR-206 y miR-198, respectivamente (Hansen et al., 2007). Se ha demostrado que variantes en miR-502, miR-510, miR-890 y miR-892b, resultan en un procesamiento reducido de los mencionados microARNs, mientras que el SNP localizado en pri-miR-510 aumentaría la

producción de microARN maduro (Sun et al., 2009). Otro microARN que presenta una variante asociada con la esquizofrenia es miR-137, que corresponde a la molécula base de la presente investigación.

IV. miR-137 y Sistema Nervioso

El primer registro de miR-137 data del año 2002, en una investigación cuyo enfoque fue la identificación de microARNs tejido-específicos, mediante la clonación de estos ARNs en 9 diferentes tejidos de ratón adulto, en la cual se reportó 34 nuevos microARNs, incluido miR-137 (Lagos-Quintana et al., 2002). El gen que codifica para miR-137 está localizado en el cromosoma 1p21.3 (Yin et al., 2014). La unidad transcripcional consta de 62kb y se predicen cuatro variantes por corte y empalme que van desde poco menos de 1kb hasta poco más de 2.5kb (Mahmoudi & Cairns, 2017). Se predice que alrededor de 1000 genes son potenciales objetivos de miR-137 (Wright et al., 2013). Sin embargo, aproximadamente 50 de estos genes se han estudiado y validado experimentalmente, lo que representa únicamente un 5% (Mahmoudi & Cairns, 2017).

La expresión de miR-137 se da principalmente en cerebro y está particularmente enriquecido en el giro dentado (Smrt et al., 2010). Este microARN influye en el sistema nervioso y neurodesarrollo mediante regulación de morfogénesis dendrítica, neurogénesis adulta, de maduración y migración de células troncales neurales adultas, gliogénesis, sinaptogénesis y maduración de sinapsis (Hill et al., 2014; Siegert et al., 2015; Silber et al., 2008; Smrt et al., 2010; Strazisar et al., 2014; Sun et al., 2011).

En células troncales neurales embrionicas de ratón, la sobreexpresión de miR-137 disminuye la proliferación y aumenta la diferenciación de éstas células mediante un bucle regulatorio con *TLX/LSDI* (Sun et al., 2011). Por el contrario, en células troncales neurales del hipocampo, promueve la proliferación y reprime la diferenciación (Szulwach et al., 2010). Por lo tanto, la proliferación y diferenciación en etapas del desarrollo son sensibles a

la expresión de miR-137, causando un cambio hacia uno u otro proceso, regulando el dinamismo entre estos y siendo contexto-dependiente (Mahmoudi & Cairns, 2017; Yin et al., 2014)

Se han identificado vías controladas por miR-137 relacionadas con regulación del ciclo celular, apertura y cierre de canales de calcio, interacciones célula-célula y funciones sinápticas (Collins et al., 2014). Los procesos y rutas que regula, aunado a otros estudios sobre la función de miR-137 podría sugerir el rol de éste en la etiología de la esquizofrenia, así como en autismo, discapacidad intelectual, síndrome de Rett, Alzheimer, Huntington y varios tipos de cáncer (Balaguer et al., 2010; Chen et al., 2011; Devanna & Vernes, 2014; Geekiyanage & Chan, 2011; Soldati et al., 2013; Willemsen et al., 2011; Wu et al., 2010).

IV.1 miR-137 y esquizofrenia

En una investigación realizada por Ripke y colaboradores (2011) mediante un análisis de asociación de todo el genoma, se encontró asociación significativa de la esquizofrenia con 7 loci, 5 de ellos nuevos, de los cuales, la asociación estadísticamente más significativa correspondió a un polimorfismo de un único nucleótido (rs1625579) localizado dentro de un intrón del transcripto primario de *MIR137HG*, lo que sugiere a este gen como un posible candidato para la enfermedad. Además, 4 de los loci con asociación significativa a este trastorno, incluyen a los genes *TCF4*, *CACNA1C*, *CSMD1* y *C10orf26* que corresponden a blancos potenciales del mencionado microARN (Ripke et al., 2011) y que han sido validados (Kwon, Wang & Tsai, 2013). Mediante un estudio caso control y meta-análisis, Ma y colaboradores (2014) encontraron evidencia convincente de que el polimorfismo rs1625579 está significativamente asociado con un incremento en el riesgo de la esquizofrenia. Otro meta-análisis realizado en China, obtuvo el mismo resultado de asociación entre esta variante y la enfermedad (Zhang et al., 2016).

El SNP rs1625579 ha sido muy estudiado y dentro de los alelos identificados están T y G, siendo éste primero el alelo de riesgo. Un estudio indica que individuos con el genotipo

TT presentan una mayor activación de la corteza prefrontal dorsolateral izquierda, el cual corresponde a un fenotipo de riesgo en la esquizofrenia (van Erp et al., 2014). Se ha encontrado que la edad de inicio de psicosis es más temprana en individuos con esquizofrenia que presentan el genotipo TT comparados con sujetos cuyo genotipo es GT o GG (Lett et al., 2013). Las estructuras cerebrales también son afectadas ya que individuos homocigotos para T presentan mayor volumen del ventrículo lateral izquierdo, menor volumen del hipocampo e integridad reducida de la materia blanca en comparación con sujetos portadores de G (Lett et al., 2013). Estos resultados y la designación del alelo T como el de riesgo, debe manejarse con cautela ya que se ha encontrado que el alelo G en combinación con un incremento en síntomas negativos, predicen deterioro cognitivo en esquizofrenia (Green et al., 2013).

Algunos blancos del miR-137 corresponden a genes asociados a esquizofrenia como *CACNA1C*, *TCF4* y *ZNF804A* (Kim et al., 2012; Ripke et al., 2011; Yin et al., 2014). El primero codifica para la subunidad 1 C de un canal de calcio voltaje dependiente que incrementa la permeabilidad de la membrana lo que permite la activación de rutas de señalización intracelular (Bhat et al., 2012). Si se altera, puede causar procesamiento de información anormal y resultar en trastornos psiquiátricos (Bhat et al., 2012; Yin et al., 2014). *TCF4* corresponde a un factor de transcripción nuclear que regula apertura de canales; la desregulación de este gen causa estímulos excesivos o irrelevantes producto de deterioro sensorial que alteran funciones cognitivas y puede influir en enfermedades neuropsiquiátricas (Brzózka, Radyushkin, Wichert, Ehrenreich & Rossner, 2010). *ZNF804A* funge en la regulación genes involucrados en adhesión celular, lo que sugiere un papel de este gen en migración neural y plasticidad sináptica (Hill, Jeffries, Dobson, Price & Bray, 2011). *ZNF804A* interactúa con catechol-O-methyltransferasa (*COMT*) que participa en la degradación de dopamina (Girgenti, LoTurco & Maher, 2012; Xu et al., 2017). Si se inhibe la expresión de *COMT*, hay hiperactividad de la dopamina lo que puede originar esquizofrenia (Yin et al., 2014).

V. VNTR: Rol en Sistema Nervioso y esquizofrenia

Las repeticiones en tándem de número variable (VNTRs), también denominadas minisatélites hipervariables, consisten en secuencia de ADN de entre mínimo 6 y más de 50 pares de bases, que se repite en el genoma de manera continua (Bennett, 2000). Debido a que el número de repeticiones es variable dentro y entre individuos, los VNTRs corresponden a entidades polimórficas (Nakamura et al., 1987). Estas repeticiones se han identificado en, intrones, en extremos 3' y 5'UTR, en promotores y en regiones intergénicas (Babushkina & Kucher, 2011; Bemis et al., 2008; Lesch et al., 1994; Lichter et al., 1993). Los VNTRs son importantes reguladores tanto a nivel transcripcional, afectando la expresión, como traduccional, influyendo en la estabilidad y/o eficiencia del ARNm (Nakamura, Koyama & Matsushima, 1998). Por lo tanto, se sugiere que podrían participar en la etiología de enfermedades complejas.

En el gen *DRD4*, implicado en trastornos neuropsiquiátricos, se encontró un VNTR que altera la expresión de este gen *in vitro* e *in vivo*, ya que se observó una expresión disminuida del ARN mensajero en presencia de 7 repeticiones (Schoots & Van Tool, 2003; Simpson, Vetuz, Wilson, Brookes & Kent, 2010). Wang y colaboradores (2012) reportan un VNTR que influye en la expresión del gen *CYP2C9*, en el cual el VNTR designado como corto por su secuencia pequeña, reduce los niveles del ARN mensajero de este gen, cuando se compara con el VNTR mediano y largo. En el gen transportador de serotonina se ha identificado un VNTR, cuyo alelo de 9 repeticiones se asocia con depresión unipolar (Ogilvie et al., 1996).

Uno de los VNTRs más estudiados corresponde al localizado en el extremo 3'UTR del gen humano transportador de dopamina *DAT1*. La expresión del *DAT1* se altera, ya que se incrementa con el alelo de 10 repeticiones del VNTR (Fuke et al., 2001), tanto en tejido cerebral como linfocitos (Mill, Asherson, Browes, D'Souza & Craig, 2002). El alelo de 10 repeticiones parece estar asociado con trastorno de hiperactividad con déficit de atención

(Cook et al., 1995), 9 copias con alta prevalencia en individuos con dependencia de alcohol (Sander et al., 1997) y 11 repeticiones aumentan el riesgo de enfermedad de Parkinson (Le Couteur, Leighton, McCann & Pond, 1997), lo que sugiere un papel importante en distintos padecimientos.

En el caso de la esquizofrenia, una investigación determinó que hay interacción entre el VNTR del gen transportador de dopamina *DAT* y el polimorfismo Val158Met del gen catechol-O-metiltransferasa *COMT*, reguladores de la función cortical, la cual está alterada en esquizofrenia (Prata et al., 2009). Se han realizado estudios de polimorfismos en el gen transportador de serotonina (*SLC6A4*), encontrándose una asociación entre el alelo de 12 repeticiones de *STin2* y esquizofrenia (Fan & Sklar, 2005). En una población del sur de la India se encontró asociación de tres variantes del gen, dos de ellos correspondientes a VNTRs, de los cuales el alelo corto de la región 5HTTLPR y nuevamente 12 repeticiones de *STin2* son los alelos de riesgo en esquizofrenia (Vijayan et al., 2009).

VI. VNTR en miR-137

Bemis y colaboradores (2008) identificaron una repetición de nucleótidos en tándem de número variable de 15 pares de bases en el extremo 5' del pre-miR-137, que influye en el procesamiento y funcionamiento correcto de miR-137 en líneas celulares de melanoma. A su vez, este ARN no codificante regula la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (*MITF*) en estas células (Bemis et al., 2008). Este VNTR se encuentra en un promotor interno (Warburton et al, 2014), localizado en el exón 3 del gen *miRNA 137* y cuya secuencia es TAGCAGCGGCAGCGG (Wang et al., 2014). Se ha reportado que el VNTR presenta varios alelos, cuyo rango de tamaño va de 3 a 13 repeticiones (Mamdani et al., 2013; Warburton et al., 2014). La condición homocigota de 3 repeticiones se ha tomado como referencia en varias investigaciones (Bemis et al., 2008; Strazisar et al., 2014) y se ha reportado que variantes altas en número de copias de este VNTR son poco frecuentes (Warburton et al., 2014).

Debido a que éste VNTR se encarga del procesamiento y modificación posttranscripcional de miR-137, se sugiere que el cambio en el número de repeticiones afecta la estructura secundaria y terciaria de pri-miR-137, influyendo en los mencionados procesos (Bemis et al., 2008; Mamdani et al., 2013). Además se ha encontrado que el número de repeticiones del VNTR afecta la expresión de otros genes; 12 de ellos presentaron mayor expresión a más repeticiones, entre los que se incluyen *STMN4*, *PHLDA1* y *NPPA*, mientras que los genes *LUZP2*, *ASCLI* y *FAT4* se expresaron menos a mayor número de repeticiones en comparación con la referencia de 3 repeticiones (Strazisar et al., 2014). Existe un estudio en el que se encontró que el VNTR tiene un efecto en la edad de inicio de la esquizofrenia ya que individuos portadores de repeticiones presentan una edad de inicio más temprana de la enfermedad que los controles sin repeticiones (Wang et al., 2014). También, el polimorfismo de este VNTR se asocia con severidad de síntomas positivos de la esquizofrenia (Wang et al., 2014).

VII. Justificación

La esquizofrenia es un trastorno severo que causa disfunción en una o varias áreas de funcionamiento como relaciones interpersonales, educación, trabajo y cuidado personal, afectando a la persona a nivel ocupacional e individual lo que puede ocasionar aislamiento (American Psychiatric Association, 1994; Evans, Muir, Blackwood & Porteous, 2011). Dentro de las causas genéticas de la enfermedad, los microARNs han tomado fuerza como candidatos ya que presentan alta expresión en el cerebro, tienen efectos pleiotrópicos y participan en muchas vías celulares de regulación (Nelson, Wang & Rajeev, 2008; Selbach et al., 2008; Sempere et al., 2004; Weinberg & Wood, 2009). Su influencia en la proliferación, diferenciación y maduración neuronal (Silber et al., 2008; Smrt et al., 2010), señalan a miR-137 como un candidato importante en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia.

Algunos genes influyen en las características clínicas de una enfermedad, sin alterar la susceptibilidad o riesgo a la misma (Fanous & Kendler, 2005) y esto constituye el objetivo principal de muchas investigaciones ya que analizan el efecto de estos denominados genes modificadores. Uno de estas características corresponde a la edad de inicio. Tal es el caso de la esclerosis lateral amiotrófica, ya que los SNPs rs2279238 y rs7120118 se asocian con la edad de inicio, cuyos genotipos T/T y T/C, aumentan la edad de inicio de la enfermedad en 7.8 años y 6.7 años, respectivamente (Mouzat et al., 2018). En la enfermedad de Huntington, se encontró un locus en el cromosoma 15 con dos efectos distintos, acelerando y retrasando la enfermedad en 6.1 años y 1.4 años, respectivamente y en el cromosoma 8, se obtuvo un locus que acelera la edad de inicio en 1.6 años (Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium, 2015). En trastorno bipolar, la edad de inicio se ha ligado a la región cromosómica 3p14 (Etain et al., 2006). En la enfermedad de Parkinson, se identificaron las regiones 2p13, 9q y en los cromosomas 20 y 21 con puntaje sugerente de ligamiento a edad de inicio y el alelo 174 del marcador D2S1394 localizado en el cromosoma 2, se asocia a una edad de inicio tardía de la enfermedad (DeStefano et al., 2002).

En el caso de la esquizofrenia, se sugiere que la edad de inicio es muy importante en el estudio del origen de esta enfermedad ya que puede brindar indicios de los defectos primarios, si se logra determinar los procesos biológicos asociados (DeLisi, 1992). Además, la edad a la cual inician los síntomas de la esquizofrenia puede ser relevante para definir la etiología de procesos patológicos (DeLisi, 1992). Se ha demostrado que la edad de inicio tiene un fuerte componente genético correlacionando entre hermanos enfermos, mientras que el efecto de factores ambientales es bajo (Crow & Done, 1986; Kendler, Tsuang & Hays, 1987). Una investigación obtuvo ligamiento de la región 2q22.1 con la edad de inicio temprana (Lien et al., 2011) y otro estudio identificó 14 loci asociados también con la edad de inicio temprana de la esquizofrenia (Woolston et al., 2017). Se ha reportado que la edad de inicio podría contribuir a cambios estructurales de cerebro y disfunción cognitiva: individuos cuya edad de inicio de la esquizofrenia es más temprana presentan un menor

tamaño del hemisferio cerebral izquierdo (Crow, Colter, Frith, Johnstone & Owens, 1989) y el volumen de los ventrículos cerebrales es mayor (DeLisi et al., 1991).

Los estudios mencionados anteriormente en cuanto a regulación transcripcional y traduccional son algunos ejemplos sobre el rol de los VNTRs en expresión de genes y estructura de los ARNm, así como en la asociación con trastornos psiquiátricos. Por lo tanto, los VNTRs se pueden considerar como sintonizadores finos de la expresión de los genes, así como potenciales unidades funcionales de variancia y por esto pueden ser muy útiles al estudiar el origen de ciertos padecimientos, en particular de los complejos (Brookes, 2013).

Al tomar en cuenta el VNTR de miR-137, éste no muestra asociación con la edad de inicio de la esquizofrenia (Egawa et al., 2013; Wang et al., 2014). Sin embargo, es posible que la presencia de repeticiones del VNTR influya en la edad de inicio de la esquizofrenia y tenga un efecto protector contra el inicio de síntomas positivos (Wang et al., 2014). En nuestro país, un estudio previo que empleó 52 tríos (padres sanos y un hijo con esquizofrenia), detectó dos variantes de miR-137: el SNP 1625579 y el VNTR de miR-137 y aunque no encontró asociación entre ningún alelo de éste último con la esquizofrenia mediante la prueba de asociación TDT, obtuvo que individuos con el alelo 4 presentan una edad de inicio menor de la enfermedad (Bolaños & Chavarría-Soley, datos no publicados).

En nuestro país se han realizado estudios de caracterización y categorización de individuos que presentan esquizofrenia y las implicaciones que ésta tiene (Contreras et al., 2008; Montero et al., 2002; Pacheco et al., 2010), así como de factores culturales en el contenido de los delirios de personas esquizofrénicas (Morales, Alvarado, Calvo, Contreras & Raventós, 2012). Hay investigaciones enfocadas en genes candidatos de la enfermedad (Marballi et al., 2014; Pacheco & Raventós, 2004; Walss-Bass et al., 2006; Walss-Bass et al., 2006), loci de genes con predisposición a esquizofrenia (Escamilla et al., 2007; Escamilla et al., 2009), análisis de desequilibrio de ligamiento (Walss-Bass et al., 2005) y endofenotipos (Glahn et al., 2007). Con respecto a los microARNs, se ha analizado su papel en la etiología

de la esquizofrenia (Bolaños, 2014) y el mencionado estudio que encontró relación entre los individuos portadores de alelo 4 del VNTR de miR-137 y la edad de inicio de la esquizofrenia (Bolaños & Chavarría-Soley, datos no publicados). Asumiendo similares frecuencias alélicas y genotípicas en individuos sanos y sujetos con esquizofrenia (basado en lo encontrado en otras investigaciones, entre ellas la de nuestro país), la presente investigación pretende ampliar la muestra del estudio preliminar y así conocer si el número de repeticiones de esta región se asocia a una edad de inicio más temprana de la esquizofrenia y permitir una mejor comprensión del papel de esta región del gen. De esta manera, se han planteado los siguientes objetivos, hipótesis y predicción:

VIII Objetivos

VIII. 1. Objetivo General:

Determinar si el número de repeticiones del VNTR localizado en el promotor interno del exón 3 del gen *MIR137HG* se asocia con la edad de inicio de la esquizofrenia en un grupo de 132 individuos del Valle Central de Costa Rica con esquizofrenia.

VIII. 2. Objetivos específicos:

- Comparar la edad de inicio promedio de la esquizofrenia entre sexos para un total de 132 individuos del Valle Central de Costa Rica con esquizofrenia.
- Identificar el genotipo para el número de repeticiones en el VNTR localizado en el promotor interno del exón 3 del gen *MIR137HG* para un total de 132 individuos del Valle Central de Costa Rica que padecen esquizofrenia.
- Determinar la frecuencia de cada uno de los alelos identificados para el número de repeticiones del VNTR situado en el promotor interno del exón 3 del gen *MIR137HG* para un total de 132 individuos del Valle Central de Costa Rica con esquizofrenia.
- Comparar la edad de inicio de la esquizofrenia entre grupos con diferentes genotipos según número de repeticiones del VNTR situado en el promotor interno del exón 3

del gen *MIR137HG* para un total de 132 individuos del Valle Central de Costa Rica con esquizofrenia.

IX. Hipótesis

El número de repeticiones del VNTR de miR-137 está asociado con la edad de inicio de la esquizofrenia en una muestra de 132 individuos del Valle Central de Costa Rica que padecen la enfermedad

X. Predicción

Si el número de repeticiones del VNTR de miR-137 está asociado con la edad de inicio de la esquizofrenia, individuos con mayor número de repeticiones presentarán una edad de inicio más temprana de la enfermedad

XI. MATERIALES Y MÉTODOS

XI. 1. Sujetos de estudio

Se analizaron 132 muestras de ADN genómico de sujetos del Valle Central de Costa Rica con el diagnóstico final de consenso de esquizofrenia por el DSMIV (American Psychiatric Association, 1994). Los participantes tenían padres y abuelos provenientes de diferentes sitios del Valle Central. La región del Valle Central de Costa Rica se extiende desde San Ramón de Alajuela hasta Paraíso de Cartago, de oeste a este, respectivamente y al norte hasta las montañas de Heredia y volcanes Barva e Irazú, limitando con la Cordillera de Talamanca al sur (Campos-Sánchez, Raventós & Barrantes, 2013).

Las muestras son parte del proyecto de Genética de la Esquizofrenia en el Valle Central de Costa Rica realizado por el grupo de Psiquiatría Genética del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular a cargo de la Dra. Henriette Raventós Vorst. Las investigaciones a las cuales pertenecen las muestras fueron debidamente aprobadas por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica y los individuos incluidos en las

mismas, firmaron el respectivo consentimiento informado. Se registraron las características fenotípicas de sexo y edad de inicio de la esquizofrenia que se basa en el diagnóstico de mejor estimado. Éste consiste en el análisis de 3 fuentes de información para el diagnóstico: entrevista diagnóstica para estudios genéticos (DIGS en inglés), registros médicos y entrevistas familiares (FIGS), las cuales son analizadas por dos mejores estimadores que luego de discutir los casos, llegan a un diagnóstico consenso (Contreras et al., 2009).

XI. 2. Amplificación PCR, purificación y secuenciación

De las muestras de ADN disponibles previamente extraídas, se realizó la amplificación del VNTR de miR-137. Se diseñaron los iniciadores con el programa Primer3 Plus y se obtuvieron los siguientes cebadores: “forward” TGGAAATAGAGCGGCCATT y “reverse” AGTGCTACCTTGGCAACCAC. La reacción de amplificación consiste en un volumen total de 25uL que contiene Master Mix 1x (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), 1,6µM de cada iniciador y 90ng de ADN genómico. Las condiciones empleadas incluyen un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido por 10 ciclos de 94°C “touchdown” por 20 segundos, 65°C a 57°C por 1 minuto (“touchdown”) y 72°C por 1 minuto, luego 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto para finalizar con un ciclo de 72°C durante 10 minutos. Las muestras amplificadas se enviaron a Macrogen Korea para la purificación del producto amplificado y secuenciación por el método de Sanger con terminadores BigDye, versión 3.1 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en una sola dirección.

XI. 3. Análisis de secuencias

Se empleó el programa Chromas Lite 2.1.1. (Technelysium, Australia) para analizar la secuencia de cada muestra e identificar el número de repeticiones que presenta cada individuo.

XI. 4. Análisis estadístico

La determinación de las frecuencias alélicas de la muestra se realizó mediante GenAlEx 6.501. Posteriormente, los individuos se dividieron en tres grupos según genotipo: 3_3, 3_4 y 4_4. Para comprobar si la edad de inicio de la esquizofrenia varía según sexo, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, ya que los datos no provienen de distribución normal. Para determinar si la edad de inicio de la esquizofrenia varía según genotipo, se empleó la prueba de Kruskal Wallis. Estos análisis se llevaron a cabo en el programa Past (Hammer, Harper & Ryan, 2001).

XII. RESULTADOS

De los 132 individuos, 77 son hombres (58%) y 55 son mujeres (42%). El rango de edad de inicio en que se encuentran más individuos tanto para hombres (48%) como para mujeres (31%) es entre los 16 y 20 años (Cuadro 1). El 11% de las mujeres y menos del 3% de los hombres presentan edades de inicio superiores a los 35 años (Cuadro 1). El promedio de la edad de inicio de la esquizofrenia en hombres es de 19.79 ± 6.46 años y en las mujeres, la edad de inicio promedio de la enfermedad es de 23.34 ± 9.29 años. La edad de inicio promedio de la esquizofrenia es menor en los hombres que en las mujeres ($U=1676$, $p=0.04$).

Cuadro 1. Distribución de la edad de inicio de la esquizofrenia según sexo

Rango de edades	Sexo	
	Hombres	Mujeres
6-10	1	0
11-15	15	11
16-20	37	17
21-25	14	9
26-30	4	8
31-35	4	4
36-40	0	2
41-45	2	2
46-50	0	2
Total	77	55

Las frecuencias de los genotipos para el VNTR de miR-137 fueron 70.5% 3_3 (n=93), 24.2% 3_4 (n=32) y 5.3% 4_4 (n=7) (Cuadro 2). Las frecuencias de los alelos 3 y 4 fueron de 82.6% y 17.4%, respectivamente (Cuadro 2). En esta muestra, los individuos 3_3 presentan un amplio rango de edad de inicio, desde los 7 años hasta los 49 años. Mientras tanto, los casos 3_4 presentan una edad máxima de inicio de la enfermedad de 32 años y los sujetos con genotipo 4_4 tienen una edad máxima de 29 años (Cuadro 3). La edad de inicio promedio de la esquizofrenia en individuos con genotipo 3_3 es de 21.77 ± 8.68 años, en sujetos 3_4 es de 20.38 ± 5.77 años y en individuos 4_4 es de 18.71 ± 5.31 años. La edad de inicio promedio de la esquizofrenia no difiere entre los tres genotipos para el VNTR de miR-137 ($H(2)=0.76$, $p=0.68$).

Cuadro 2. Frecuencias alélicas y genotípicas del VNTR de miR-137 en la muestra total y por sexo

	Muestra total (n=132)	Hombres (n=77)	Mujeres (n=55)
Genotipos			
3_3	93 (70.5%)	57 (74.0%)	36 (65.5%)
3_4	32 (24.2%)	16 (20.8%)	16 (29.1%)
4_4	7 (5.3%)	4 (5.2%)	3 (5.4%)
Alelos			
3	218 (82.6%)	130 (84.42%)	88 (80.0%)
4	46 (17.4%)	21 (15.58%)	23 (20.0%)

Cuadro 3. Distribución de individuos según edad de inicio de la esquizofrenia acorde al genotipo

Rango de edades	Genotipo		
	3_3	3_4	4_4
6-10	1	0	0
11-15	18	6	2
16-20	38	13	3
21-25	15	7	1
26-30	8	3	1
31-35	5	3	0
36-40	2	0	0
41-45	4	0	0
46-50	2	0	0
Total	93	32	7

XIII. DISCUSIÓN

Se encontró que la edad de inicio de la esquizofrenia es más temprana en hombres que en mujeres, con una diferencia cercana a los 3 años y medio. Lo anterior es consistente con la mayoría de investigaciones (Loranger, 1984; Angermeyer & Kühn, 1988; Faraone, Chen, Goldstein & Tsuang, 1994; Tang et al., 2007). Por ejemplo, en un estudio realizado en China, la edad de inicio fue significativamente menor en hombres y un alto porcentaje de mujeres presentan una edad de inicio igual o superior a los 45 años (Tang et al., 2007). En otra investigación llevada a cabo en Nueva York, se reportó que la edad de inicio en los hombres es aproximadamente cinco años más temprano que en mujeres (Loranger, 1984). Otro estudio encontró que la esquizofrenia inicia tres a cuatro años más tarde en mujeres, comparado con hombres (Häfner, Maurer, Löffler & Riecher-Rössler, 1993). En términos generales, se reportado una diferencia promedio de cinco años (De Lisi, 1992).

Sin embargo, hay estudios que no han encontrado diferencias entre sexos (Contreras et al., 2008; Venkatesh et al., 2008; Naqvi, Murtaza, Nazir & Naqvi, 2010). En la India, no hay diferencias en la edad de inicio de la esquizofrenia entre hombres (29.2 ± 8.8 años) y mujeres (30.8 ± 11.4 años) (Venkatesh et al., 2008). Un estudio realizado en Pakistán, tampoco encontró diferencias entre sexos en ninguna de las tres medidas de edad inicio empleadas: edad de inicio de síntomas psicóticos, edad al primer contacto con un proveedor de salud y edad de la primera hospitalización (Naqvi et al., 2010). En nuestro país, a diferencia de lo que se obtuvo en el presente estudio, otra investigación sobre caracterización de individuos con esquizofrenia del Valle Central de Costa Rica, con una muestra mayor, reporta una edad de inicio promedio de 21.39 años, sin diferencia entre sexos (Contreras et al., 2008).

La mayoría de estudios designan como edad de inicio de la esquizofrenia a la edad de la primera hospitalización y aparición de los primeros síntomas (De Lisi, 1992) o como en este caso, mediante diagnóstico final a través del proceso mejor estimado diagnóstico, lo que

dificulta la comparación de la edad de inicio entre estudios. Las diferencias en la edad de inicio entre sexos puede deberse a que en la distribución de edades, hay valor máximo en frecuencia de hombres a edades tempranas mientras que en mujeres hay dos picos, el primero entre 20 y 29 años y luego un ligero aumento luego de los 40 años (Häfner et al., 1993). Se ha sugerido que los estrógenos tiene un efecto protector que retrasa el inicio de la enfermedad en las mujeres (Seeman & Lang, 1990; Häfner et al., 1998), ya que parece que disminuye la sensibilidad de los receptores de dopamina (Häfner, Behrens, De Vry & Gattaz, 1991). También se ha encontrado que los hombres son hospitalizados a una edad más temprana que las mujeres (Angermeyer & Kühn, 1988). Además, las presiones culturales y sociales eran mayores en hombres para lograr independencia en ciertos ámbitos (Loranger, 1984). Otros estudios indican que las diferencias en la edad de inicio entre sexos, puede deberse a la clasificación y subtipos de la enfermedad. Los hombres presentan una edad de inicio más temprana si padecen el subtipo paranoide (Beratis, Gabriel & Hoidas, 1994; Salokangas, Honkonen & Saarinen, 2003) mientras que lo contrario sucede en el subtipo desorganizado que aparece más temprano en mujeres (Beratis et al., 1994).

En este estudio se encontraron únicamente dos alelos para el VNTR localizado en el promotor interno del exón 3 del gen *MIR137HG* en una muestra del Valle Central de Costa Rica. Éstos fueron 3 y 4 repeticiones, con frecuencia de 83% y 17% respectivamente. Además, el genotipo más frecuente fue 3_3 con 70%. Lo anterior, se diferencia de otras investigaciones en las cuales se han identificado individuos sin el VNTR y sujetos con hasta 13 repeticiones. Sin embargo, los datos son consistentes en cuanto a que el alelo 3 y su condición homocigota en genotipo, son usualmente más frecuentes. Una investigación, que comprendió una muestra de 54 casos con esquizofrenia y 54 controles de la Escuela de Medicina del Mount Sinai, encontró 3 repeticiones como el alelo más frecuente con 72%, seguido de 4 repeticiones, 9 repeticiones y las demás repeticiones con frecuencia de 9%, 6% e inferior al 5%, respectivamente (Mamdani et al., 2013). En Japón, también se encontró que el alelo con mayor frecuencia es el de 3 repeticiones para este VNTR de miR-137 (Egawa et

al., 2013). En individuos que presentan esquizofrenia del Norte de Suecia el alelo de 3 repeticiones tuvo una frecuencia de 74.18%, seguido por 4 con 14.67% y el resto de variantes con porcentaje menor al 4%. En cuanto a frecuencias genotípicas, el genotipo 3_3 estuvo presente en un 58.22% de los casos, luego 3_4 con 18.78%, seguido por otros genotipos con frecuencia menor a 5%. El patrón fue similar tanto en sujetos con trastorno bipolar como en controles (Strazisar et al., 2014).

Sin embargo, para una población de CEU (residentes de Utah con ancestros del Norte y Oeste de Europa), se obtuvo un resultado distinto ya que el alelo de menor número de repeticiones y con mayor frecuencia fue el de 4 repeticiones para el VNTR con un 74.16%, seguido por 6 (9.55%), 5 (6.18%) y el resto de repeticiones (Warburton et al., 2014). Además, la mayoría de individuos fueron homocigotos para el alelo 4 con 55.06% de los casos, seguidos por 4_6 y 4_5 con poco más de 10% de los casos cada uno y los otros genotipos con frecuencias igual o menores al 3.37% (Warburton et al., 2014).

Aunque no se ha encontrado asociación entre las variantes de este VNTR y la esquizofrenia (Bolaños & Chavarría-Soley, datos no publicados; Egawa et al., 2013, Wang et al., 2014) se ha demostrado que el número de repeticiones influye en la expresión de miR-137. En células HEK293 que portan los alelos 9 y 13, se disminuye significativamente la expresión de este microARN y se altera la estructura terciaria de sus precursores (Mamdani et al., 2013). Además, al comparar alelos con 3 y 12 repeticiones, se encontró que éste último altera la estructura secundaria del pri-miR-137 (Bemis et al., 2008). En otro estudio se encontró que la presencia de 4 y 8 número de copias de este VNTR también altera la estructura de miR-137 y disminuye la expresión de este ARN no codificante, al comparar con el tipo silvestre de 3 repeticiones (Strazisar et al., 2014). Se ha encontrado que el número de copias del VNTR influye en la expresión de 15 genes, de los cuales 3 presentan expresión disminuida y la regulación de los otros 12 es positiva al incrementarse la repetición (Strazisar et al., 2014). Un estudio que utilizó la luciferasa como gen reportero, demostró que con 4

repeticiones la actividad se incrementa mientras que disminuye considerablemente en presencia de 12 número de copias (Warburton et al., 2014). Lo anterior indica que a mayor número de repeticiones del VNTR, hay menor expresión de miR-137 y un procesamiento incorrecto de la estructura de sus precursores. En este caso, al haber únicamente dos alelos, los cuales son muy cercanos en número de repeticiones, se podría dificultar la detección de un efecto fenotípico, sin embargo se nota un patrón a la disminución de la edad de inicio hacia el genotipo 4_4. Mamdani y colaboradores (2013) encontraron disminución leve de la expresión de miR-137 con 4 repeticiones al comparar con 3 repeticiones, pero no es significativo. Sin embargo, otro estudio también obtuvo reducción de la expresión con 4 repeticiones, cuyo nivel de cambio fue de 0.42, estadísticamente significativo (Strazisar et al., 2014).

Algunos estudios se han centrado en el papel del componente genético en la edad de inicio de la esquizofrenia. Una investigación realizada con muestras de poblaciones de México y Centroamérica, obtuvo una heredabilidad de 0.33 para la edad de inicio de psicosis en individuos con esquizofrenia (Hare et al., 2010). Un estudio del ligamiento de todo el genoma, obtuvo puntaje sugerente de ligamiento de un marcador localizado en el cromosoma 17q, aunque no alcanzó significancia estadística (Cardno et al. 2001). También se han estudiado polimorfismos, como en el caso del gen de la subunidad integrina- $\beta 3$ (*ITGB3*), ya que ciertas variantes muestran asociación con la edad de inicio de la esquizofrenia (Wang et al., 2013). En el gen *NOTCH4*, el alelo T del polimorfismo T-25C, se relaciona con edad de inicio más temprana en hombres que presentan la enfermedad (Anttila et al., 2003). En el gen *MTHFR*, el genotipo TT del C677T disminuye significativamente la edad de inicio en comparación con CT, aunque ningún alelo se asocia a una edad más temprana en esquizofrenia (El-Hadidy, Abdeen, El-Aziz & Al-Harrass, 2014).

En el caso de miR-137, estudios han encontrado variantes que se asocian con la edad de inicio de la esquizofrenia, como el SNP rs1625579 (Lett et al., 2013). Aunque también se

estudió este SNP en nuestra población y su asociación con la esquizofrenia (Bolaños & Chavarría-Soley, datos no publicados), la baja frecuencia de unos de los dos genotipos obtenidos, dificulta el análisis con edad de inicio. En la presente investigación, al analizar el VNTR de miR-137, no se encontró diferencias en la edad de inicio de la esquizofrenia según el genotipo de la variante. Sin embargo, se nota un patrón en esta muestra ya que a mayor número de repeticiones en el genotipo, es menor la edad de inicio promedio de la esquizofrenia. Un estudio similar realizado con muestras de una población de China, obtuvo que en aquellos individuos sin número de copias de esa secuencia de 15pb (al cual designaron como genotipo silvestre), la edad de inicio de la enfermedad es mayor que en sujetos que presentan diferentes números de repeticiones del VNTR (Wang et al., 2014).

Para futuros estudios, se recomienda aumentar el tamaño de la muestra para determinar si se mantiene la diferencia en la edad de inicio entre sexos. También, incluir la edad de inicio como variable en investigaciones de epidemiología genética de todo el genoma es importante ya que como se mencionó anteriormente, tiene un componente genético y podría reflejar subtipos de la enfermedad, junto a la combinación de factores ambientales y de desarrollo, constituyendo una característica importante en la enfermedad que podría ser modulada por variantes en genes modificadores. El contar con una mayor muestra permitiría detectar la presencia de otros alelos en Costa Rica o si varían las frecuencias de los ya identificados. Además, sería interesante determinar con un mayor número de individuos afectados, si la tendencia no significativa que se observa a una reducción en la edad promedio de la esquizofrenia conforme aumenta el número de repeticiones del VNTR puede llegar a ser significativa. A futuro sería además deseable, incluir individuos control para analizar si las frecuencias alélicas obtenidas, corresponden al patrón de la población general. Finalmente, realizar estudios celulares variando el número de repeticiones permitiría además identificar el grado de afectación de la variante al procesamiento y expresión de miR-137.

En conclusión, la edad de inicio de la esquizofrenia es más temprana en hombres para esta muestra del Valle Central de Costa Rica. Se encontraron dos alelos para el VNTR de miR-137, siendo el más frecuente el alelo 3, lo cual es consistente con la mayoría de estudios realizados en el mundo. Aunque no se encontró efecto de genotipo del VNTR sobre la edad de inicio promedio de la esquizofrenia, ésta continúa siendo un componente considerable en la etiología de la esquizofrenia. A pesar de no encontrar asociación, se observa una tendencia a disminuir la edad de inicio de la enfermedad en presencia del alelo 4, por lo que se requiere más investigación sobre las variantes de miR-137 para determinar si juegan un papel en el desarrollo de la esquizofrenia, particularmente porque este microARN regula procesos fundamentales en el sistema nervioso.

XIV. REFERENCIAS

- Abdomaleky, H. M., Cheng, K-h., Faraone, S. V., Wilcox, M., Glatt, S. J., Gao, F., ... & Thiagalingam, S. (2006). Hypomethylation of *MB-COMT* promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Human Molecular Genetics*, *15*(21), 3132-3145.
- Abdomaleky, H. M., Cheng, K-h., Russo, A., Smith, C. L., Faraone, S. V., Wilcox, M., ... & Tsuang, M. T. (2005). Hypermethylation of the reelin (*RELN*) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, *134B*, 60-66.
- Addington, J., & Addington D. (1999). Neurocognitive and social functioning in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *25*(1), 173-182.
- Addington, J., & Addington D. (2000). Neurocognitive and social functioning in schizophrenia: a 2.5 year follow-up study. *Schizophrenia Research*, *44*, 47-56.
- American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4ta ed). Washington, D. C.: American Psychiatric Association.
- Andreasen, N. C. (1995). Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet*, *346*, 477-481.
- Andréasson, S., Engström, A., Allebeck, P., & Rydberg, U. (1987). Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of swedish conscripts. *Lancet*, *2* (8574), 1483-1486.
- Angermeyer, M. C., & Kühn, L. (1988). Gender Differences in age at onset of schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences*, *237*, 351-364.

- Anttila, S., Kampman, O., Illi, A., Roivas, M., Mattila, K. M., Lassila, V., Lehtimäki, T., & Leinonen, E. (2003). *NOTCH4* gene promoter polymorphism is associated with the age of onset in schizophrenia. *Psychiatric Genetics*, *13*(2), 61-64.
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., ... & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *513*, 532-541.
- Babushkina, N. P., & Kucher, A. N. (2011). Functional role of VNTR polymorphism of human genes. *Genetika*, *47*(6), 725-734.
- Balaguer, F., Link, A., Lozano, J. J., Cuatrecasas, M., Nagasaka, T., Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Research*, *70*(16), 6609-6618.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*, 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNA target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215-233.
- Bemis, L. T., Chen, R., Amato, C. M., Classen, E. H., Robinson, S. E., Coffey, D. G., ... & Robinson, W. A. (2008). MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Research*, *68*(5), 1362-1368.
- Beratis, S., Gabriel, J., & Hoidas, S. (1994). Age at onset in subtypes of schizophrenic disorders. *Schizophrenia Bulletin*, *20*(2), 287-296.
- Beveridge, N. J., Gardiner, E., Carroll, A. P., Tooney, P. A., & Cairns, M. J. (2010). Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Molecular Psychiatry*, *15*(12), 1176-1189.

- Beveridge, N. J., Tooney, P. A., Carroll, A. P., Gardiner, E., Bowden, N., Scott, R. J., ... & Cairns, M. J. (2008). Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, *17*(8), 1156-1168.
- Bhat, S., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Arad, M., Smith, R. J., Soldatov, N. M., & Gould, T. D. (2012). *CACNA1C* (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Progress in Neurobiology*, *99*(1), 1-14.
- Bolaños, P. (2014). *Selección de genes candidatos de miARN, análisis de variantes en la secuencia de ADN y su posible papel en la etiología de la esquizofrenia*. (Tesis para optar por el grado de Maestría Académica en Biología con énfasis en Biología Celular y Molecular). Universidad de Costa Rica, San José Costa Rica.
- Braga, R. J., Reynolds, G. P., & Siris, S. G. (2013). Anxiety comorbidity in schizophrenia. *Psychiatry Research*, *210*, 1-7.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA–target recognition. *PLoS Biology*, *3*(3): e85.
- Broadbelt, K., Ramprasaud, A., & Jones, L. B. (2006). Evidence of altered neurogranin immunoreactivity in areas 9 and 32 of schizophrenic prefrontal cortex. *Schizophrenia Research*, *87*, 6-14.
- Brookes, K. J. (2013). The VNTR in complex disorders: The forgotten polymorphisms? A functional way forward? *Genomics*, *101*, 273-281.
- Brzózka, M. M., Radyushkin, K., Wichert, S. P., Ehrenreich, H., & Rossner, M. J. (2010). Cognitive and sensorimotor gating impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene *Tcf4* in the brain. *Biological Psychiatry*, *68*(1), 33-40.
- Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1812*(5), 592-601.

- Buonanno, A., & Fischbach, G. D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(3), 287-296.
- Campos-Sánchez, R., Raventós, H., & Barrantes, R. (2013). Ancestry informative markers clarify the regional admixture variation in the Costa Rican population. *Human Biology*, *85*(5), 721-740.
- Cannon, M., & Jones, P. (1996). Schizophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *61*, 604-613.
- Cardno, A. G., Holmans, P. A., Rees, M. I., Jones, L. A., McCarthy, G. M., Hamshere, M. L., ... & Owen, M. J. (2001). A genomewide linkage study of age at onset in schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, *105*, 439-445.
- Chen, Q., Chen, X., Zhang, M., Fan, Q., Luo, S., & Cao, X. (2011). MiR-137 is frequently down-regulated in gastric cancer and is a negative regulator of Cdc42. *Digestive Diseases and Sciences*, *56*(7), 2009-2016.
- Collins, A. L., Kim, Y., Bloom, R. J., Kelada, S. N., Sethupathy, P. & Sullivan, P. F. (2014). Transcriptional targets of the schizophrenia risk gene *MIR137*. *Translational Psychiatry*, *4*, 1-8.
- Contreras, J., Dassori, A., Medina, R., Raventós, H., Ontiveros, A., Nicolini, H., ... & Escamilla, M. (2009). Diagnosis of schizophrenia in latino populations: a comparison of direct interview and consensus based multi-source methods. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, *197*(7), 530-535.
- Contreras, J., Montero, P., Dassori, A., Escamilla, M., & Raventós, H. (2008). Caracterización de un grupo de pacientes con esquizofrenia en el Valle Central de Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, *50*(3), 153-159.

- Cook, E. H., Stein, M. A., Krasowsli, M. D., Cox, N. J., Olkon, D. M., Kieffer, J. E., & Leventhal, B. L. (1995). Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *American Journal of Human Genetics*, *56*(4), 993-998.
- Coolen, M., Katz, S., & Bally-Cuif, L. (2013). miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neurosciences*, *7*, 220.
- Cooper-Casey, K., Mésen-Fainardi, A., Galke-Rollins, B., Llach, M., Laprade, B., Rodríguez, C., ... & Byerley, W. (2005). Suggestive linkage of schizophrenia to 5p13 in Costa Rica. *Molecular Psychiatry*, *10*, 651-656.
- Crow, T. J., Colter, N., Frith, C. D., Johnstone, E. C. & Owens, D. G. C. (1989). Developmental arrest of cerebral asymmetries in early onset schizophrenia. *Psychiatry Research*, *29*(3), 247-253.
- Crow, T. J., & Done, D. J. (1986). Age of onset of schizophrenia in siblings: a test of the contagion hypothesis. *Psychiatry Research*, *18*(2), 107-117.
- DeLisi, L. E., Hoff, A. N., Schwartz, J. E., Shields, G. W., Halthore, S. N., Gupta, S.M., ... & Anand, A. K. (1991). Brain morphology in first-episode schizophrenic like psychotic patients: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry*, *29*, 159-175.
- DeLisi, L. E. (1992). The significance of age of onset for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *18*(2), 209-215.
- DeStefano, A. L., Lew, M. F., Golbe, L. I., Mark, M. H., Lazzarini, A. M. Guttman, M., ... & Myers, R. H. (2002). *PARK3* influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study. *American Journal of Human Genetics*, *70*(5), 1089-1095.

- Devanna, P., & Vernes, S. C. (2014). A direct molecular link between the autism candidate gene *RORa* and the schizophrenia candidate *MIR137*. *Scientific Reports*, 4.
- Egawa, J., Nunokawa, A., Shibuya, M., Watanabe, Y., Kaneko, N., Igeta, H. & Someya, T. (2013). Resequencing and association analysis of *MIR137* with schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 67, 277-279.
- El-Hadidy, M. A., Abdeen, H. M., El-Aziz, S. M. A., & Al-Harrass, M. (2014). *MTHFR* gene polymorphism and age of onset of schizophrenia and bipolar disorder. *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/318483
- Escamilla, M., Hare, E., Dassori, A. M., Peralta, J. M., Ontiveros, A., Nicolini, H., ... & Almasy, L. (2009). A schizophrenia gene locus on chromosome 17q21 in a new set of families of Mexican and Central American ancestry: evidence from the NIMH genetics of schizophrenia in latino populations study. *The American Journal of Psychiatry*, 166(4), 442-449.
- Escamilla, M., Ontiveros, A., Nicolini, H., Raventós, H., Mendoza, R., Medina, R., & Almasy, L. (2007). A genome-wide scan for schizophrenia and psychosis susceptibility loci in families of Mexican and Central American ancestry. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatry Genetics)*, 144B, 193-199.
- Escamilla, M. A., Raventós, H., Almasy, L., Montero, P., Balderas, T., Rodríguez, S., & Levinson, D. (2001). Linkage disequilibrium analysis of schizophrenia and schizoaffective disorder in the Costa Rican population: preliminary findings on chromosome 13. *American Journal of Medical Genetics*, 105(7), 599.
- Etain, B., Mathieu, F., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M., Mckeon, P., ... & Leboyer, M. (2006). Genome-wide scan for genes involved in bipolar affective disorder in 70 European families ascertained through a bipolar type I early-onset proband: supportive evidence for linkage at 3p14. *Molecular Psychiatry*, 11(7), 685-694.

- Evans, K. L., Muir, W. J., Blackwood, D. H. R., & Porteous, D. J. (2011). Nuts and bolts of psychiatric genetics: building on the Human Genome Project. *Trends in Genetics*, *17*(1), 35-40.
- Fan, J. B., & Sklar, P. (2005). Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *10*, 928-938.
- Fanous, A. H., & Kendler, K. S. (2005). Genetic heterogeneity, modifier genes, and quantitative phenotypes in psychiatric illness: searching for a framework. *Molecular Psychiatry*, *10*(1), 6-13.
- Faraone, S. V., Chen, W. J., Goldstein, J. M., & Tsuang, M. T. (1994). Gender differences in age at onset of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, *164*, 625-629.
- Ferretti, E., De Smaele, E., Miele, E., Laneve, P., Po, A., Pelloni, M., ... & Gulino, A. (2008). Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *The EMBO Journal*, *27*(19), 2616-2627.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, *9*, 102-114.
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J. S., Bezdan, D., Bález-Coronel, M., Kudla, G., ... & Estivill, X. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*, *15*(4), R57.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, *19*(1), 92-105.

- Fuke, S., Suo, S., Takahashi, N., Koike, H., Sasagawa, N., & Ishiura, S. (2001). The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (*DAT1*) gene affects gene expression. *The Pharmacogenomics Journal*, *1*, 152–156.
- Gao, F-B. (2008). Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks. *Trends in Neurosciences*, *31*(1), 20-26.
- Geekiyanage, H., & Chan, C. (2011). MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid beta, novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, *31*(41), 14820-14830.
- Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium. (2015). Identification of genetic factors that modify clinical onset of Huntington's Disease. *Cell*, *162*, 516-526.
- Girgenti, M. J., LoTurco, J. J., & Maher, B. J. (2012). *ZNF804a* regulates expression of the schizophrenia-associated genes *PRSS16*, *COMT*, *PDE4B*, and *DRD2*. *PloS One*, *7*(2), e32404.
- Glahn, D., Almas, L., Blangero, J., Burk, G. M., Estrada, J., Peralta, J. M., ... & Escamilla, M. A. (2007). Adjudicating neurocognitive endophenotypes for schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatry Genetics)*, *144B*, 242-249.
- Grayson, D. R., Jia, X., Chen, Y., Sharma, R. P., Mitchell, C. P., Guidotti, A., & Costa E. (2005). Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(26), 9341-9346.
- Green, M. J., Cairns, M. J., Wu, J., Dragovic, M., Jablensky, A., Tooney, P. A., Scott, R. J., & Carr, V. J. (2013). Genome-wide supported variant MIR137 and severe negative

symptoms predict membership of an impaired cognitive subtype of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 18, 774-780.

- Guella, I., Sequeira, A., Rollins, B., Morgan, L., Torri, F., van Erp, T. G. M., ... & Vawter, M. P. (2013). Analysis of miR-137 expression and rs1625579 in dorsolateral prefrontal cortex. *Journal of Psychiatric Research*, 47(9), 1215-1221.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J. M., Gerevini, V. D., Dwivedi, Y., Grayson, D. R., ... & Costa, E. (2000). Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase₆₇ (GAD₆₇) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Archives of General Psychiatry*, 57(11), 1061-1069.
- Häfner, H., an der Heiden, W., Behrens, S., Gattaz, W. F., Hambrecht, M., Löffler, W., ... & Stein, A. (1998). Causes and consequences of the gender difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 24(1), 99-113.
- Häfner, H., Behrens, S., De Vry, J., & Gattaz, W. F. (1991). Oestradiol enhances the vulnerability threshold for schizophrenia in women by an early effect on dopaminergic neurotransmission. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 241, 65-68.
- Häfner, H., Maurer, K., Löffler, W., & Riecher-Rössler, A. (1993). The influence of age and sex on the onset and early course of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, 162, 80-86.
- Hamada, S., Masamune, A., Miura, S., Satoh, K., & Shimosegawa, T. (2014). MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX. *Cellular Signaling*, 26, 179-185.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica*, 4(1), 9.

- Hansen, T., Olsen, L., Lindow, M., Jakobsen, K. D., Ullum, H., Jonsson, E., ... & Werge, T. (2007). Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology. *PLoS ONE*, 2(9), e873.
- Hare, E., Glahn, D. C., Dassori, A., Raventos, H., Nicolini, H., Ontiveros, A., ... & Escamilla, M. A. (2010). Heritability of age of onset of psychosis in schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 153B, 298-302.
- Hill, M. J., Donocik, J. G., Nuamah, R. A., Mein, C. A., Sainz-Fuertes, R., & Bray, N. J. (2014). Transcriptional consequences of schizophrenia candidate miR-137 manipulation in human neural progenitor cells. *Schizophrenia Research*, 153, 225-230.
- Hill, M. J., Jeffries, A. R., Dobson, R. J. B., Price, J., & Bray, N. J. (2011). Knockdown of the psychosis susceptibility gene *ZNF804A* alters expression of genes involved in cell adhesion. *Human Molecular Genetics*, 21(5), 1018-1024.
- Houbaviy, H. B., Murray, M. F., & Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Developmental Cell*, 5, 351-358.
- Jones, P. (1997). The early origins of schizophrenia. *British Medical Bulletin*, 53(1), 135-155.
- Jones, P. B., Rantakallio P., Hartikainen, A-L., Isohanni, M., & Sipila, P. (1998). Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: a 28-year follow-up of the 1966 north Finland general population birth cohort. *The American Journal of Psychiatry*, 155(3), 355-364.
- Karayorgou, M., Morris, M. A., Morrow, B., Shprintzen, R. J., Goldberg, R., Borrow, J., ... & Housman, D. E. (1995). Schizophrenia susceptibility associated with interstitial

deletions of chromosome 22q11. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 7612-7616.

- Kendler, K. S., Tsuang, M. T., & Hays, P. (1987). Age at onset in schizophrenia. A familial perspective. *Archives of General Psychiatry*, 44(10), 881-890.
- Kim, A. H., Parker, E. K., Williamson, V., McMichael, G. O., Fanous, A. H., & Vladimirov, V. I. (2012). Experimental validation of candidate schizophrenia gene *ZNF804A* as target for hsa-miR-137. *Schizophrenia Research*, 141, 60-64.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., ... & Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5), 495-500.
- Kwon, E., Wang, W., & Tsai, L-H. (2013). Validation of schizophrenia-associated genes *CSMD1*, *C10orf26*, *CACNA1C* and *TCF4* as miR-137 targets. *Molecular Psychiatry*, 18, 11-12.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, 12, 735-739.
- Le Couteur, D. G., Leighton, P. W., McCann, S. J., & Pond, S. M. (1997). Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 12(5), 760-763.
- Lee, K., Kim, J-H., Kwon, O-B., An, K., Ryu, J., Cho, K., Suh, Y-H., & Kim, H-S. (2012). An activity-regulated microRNA, miR-188, controls dendritic plasticity and synaptic transmission by downregulating neuropilin-2. *The Journal of Neuroscience*, 32(16), 5678-5687.

- Lesch, K. -P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B. L., Murphy, D. L., & Riederer, P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission*, *95*, 157-162.
- Lett, T. A., Chakavarty, M. M., Felsky, D., Brandl, E. J., Tiwari, A. K., Goncalves, V. F., ... & Voineskos, A. N. (2013). The genome-wide supported microRNA-137 variant predicts phenotypic heterogeneity within schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *18*, 443-450.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15-20.
- Li, Y. Y., Cui, J. G., Dua, P., Pogue, A. I., Bhattacharjee, S., Lukiw, W. J. (2011). Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. *Neuroscience Letters*, *499*(2), 109-113.
- Lichter, J. B., Barr, C. L., Kennedy, J. L., Van Tol, H. H. M., Kidd, K. K., & Livak, K. J. (1993). A hypervariable segment in the human dopamine receptor D₄ (*DRD4*) gene. *Human Molecular Genetics*, *2*(6), 767-773.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garret-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., ... & Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, *433*, 769-773.
- Liu, J. (2008). Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*, 214-221.
- Loranger, A. W. (1984). Sex difference in age at onset of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *41*(2), 157-161.

- Ma, G., Yin, J., Fu, J., Luo, X., Zhou, H., Tao, H., ... & Li, K. (2014). Association of a miRNA-137 polymorphism with schizophrenia in a Southern Chinese Han population. *Biomed Research International*, 2014:751267. doi: 10.1155/2014/751267.
- Mahmoudi, E., & Cairns, M. J. (2017). MiR-137: an important player in neural development and neoplastic transformation. *Molecular Psychiatry*, 22, 44-55.
- Mamdani, M., McMichael, G. O., Gadepalli, V., Williamson, V., Parker, E. K., Haroutunian, V. & Vladimirov, V. (2013). Differential regulation of schizophrenia-associated microRNA gene function by variable number tandem repeats (VNTR) polymorphism. *Schizophrenia Research*, 151(1-3), 284-286.
- Marballi, K. K., McCullumsmith, R. E., Yates, S., Escamilla, M. A., Leach, R. J., Raventós, H., & Walss-Bass, C. (2014). Global signaling effects of a schizophrenia-associated missense mutation in neuregulin 1: an exploratory study using whole genome and novel kinome approaches. *Journal of Neural Transmission*, 121(5), 479-490.
- McDonald, C., & Murray, R. M. (2000). Early and late environmental risk factors for schizophrenia. *Brain Research Reviews*, 31, 130-137.
- Melo, C. A., & Melo, S. A. (2013). Biogenesis and physiology of microRNAs. En Fabbri, M. (Ed.), *Non-coding RNAs and Cancer*, (1-284). Nueva York: Springer Science & Business Media.
- Mellios, N., Huang, H. -S., Baker, S. P., Galdzicka, M., Ginns, E., & Akbarian, S. (2009). Molecular determinants of dysregulated GABAergic gene expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 65(12), 1006-10014.
- Mellios, N., Huang, H. -S., Grigorenko, A., Rogaev, E., & Akbarian, S. (2008). A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional

- inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Human Molecular Genetics*, 17(19), 3030-3042.
- Miller, B. H., Zeier, Z., Xi, L., Lanz, T. A., Deng, S., Strathmann, J., ... & Wahlestedt, C. (2012). MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3125-3130.
- Mill, J., Asherson, P., Browes, C., D'Souza, U., & Craig, I. (2002). Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, 114, 975-979.
- Mondanizadeh, M., Arefian, E., Mosayebi, G., Saidijam, M., Khansarinejad, B., & Hashemi, S. M. (2015). MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(6), 943-953.
- Montero, A. P., Balderas, T., Pereira, M., Lizano, A., Armas, R., Medina, R., & Raventós, H. (2002). Resultados de la categorización de una muestra de pacientes con diagnóstico de egreso de esquizofrenia. *Acta Médica Costarricense*, 44(2), 74-78.
- Morales, A., Alvarado, S., Calvo, M., Contreras, J., & Raventós, H. (2012). Un acercamiento al contenido cultural de los delirios de personas con esquizofrenia de Costa Rica. *Cuadernos de Antropología*, 22(1).
- Mouzat, K., Molinari, N., Kantar, J., Polge, A., Corcia, P., Couratier, P., ... & Camu, W. (2018). Liver X receptor genes variants modulate ALS phenotype. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 1959-1965.

- Nakamura, Y., Koyama, K., & Matsushima, M. (1998). VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulators. *Journal of Human Genetics*, *43*, 149-152.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., ... & White, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, *235*(4796), 1616-1622.
- Naqvi, I., Murtaza M., Nazir, M. R., & Naqvi, H. A. (2010). Gender difference in age at onset of schizophrenia: a cross sectional study from Pakistan. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, *60*(10), 886-889.
- Nelson, P. T., Wang, W. X., & Rajeev, B. W. (2008). MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathology*, *18*(1), 130-138.
- Ng, M. Y., Levinson, D. F., Faraone, S. V., Suarez, B. K., DeLisi, L. E., Arinami, T., ... & Lewis, C. M. (2009). Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *14*(8), 774-785.
- Nielsen, C. B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., & Burge, C. B. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*, *13*, 1894-1910.
- Ogilvie, A. D., Battersby, S., Bubb, V. J., Fink, G., Harmar, A. J., Goodwin, G. M., & Smith, C. A. (1996). Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet*, *347*(9003), 731-733.
- Pacheco, A., & Raventós, H. (2004). Genética de la esquizofrenia: avances en el estudio de genes candidatos. *Revista de Biología Tropical*, *52*(3), 467-473.
- Pacheco, A., Barguil, M., Contreras, J., Montero, P., Dassori, A., Escamilla, M. A., & Raventós, H. (2010). Social and clinical comparison between schizophrenia and

- bipolar disorder type I with psychosis in Costa Rica. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 45, 675-680.
- Pak, J. H., Huang, F. L., Li, J., Balschun, D., Reymann, K. G., Chiang, C., Westphal, H., & Huang, K. P. (2000). Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 97(21), 11232–11237.
- Perkins, D. O., Jeffries, C. D., Jarskog, L. F., Thomson, J. M., Woods, K., Newman, M. A., ... & Hammond, S. M. (2007). MicroRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biology*, 8(2), R27.
- Prata, D. P., Mechelli, A., Fu, C. H. Y., Picchioni, M., Touloupoulou, T., Bramon, E., ... & McGuire, P. (2009). Epistasis between the DAT 3' UTR VNTR and the COMT Val158Met SNP on cortical function in healthy subjects and patients with schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 106(32), 13600-13605.
- Regier, D. A., Farmer, M. E., Rae, D. S., Locke, B. Z., Keith, S. J., Judd, L. L., & Goodwin, F. K. (1990). Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) study. *JAMA*, 264(19), 2511-2518.
- Ripke, S., Sanders, A. R., Kendler, K. S., Levinson, D. F., Sklar, P., Holmans, P. A., ... & Gejman, P. V. (2011). Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature*, 43(10), 969-976.

- Robins, H., Li, Y., & Padgett, R. W. (2005). Incorporating structure to predict microRNA targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(11), 4006-4009.
- Sætrom, P., Heale, B. S. E., Snøve, O., Aagaard, L., Alluin, J., & Rossi, J. J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Research*, *35*(7), 2333-2342.
- Salokangas, R. K. R., Honkonen, T., & Saarinen, S. (2003). Women have later onset than men in schizophrenia—but only in its paranoid form. Results of the DSP project. *European Psychiatry*, *18*(6), 274-281.
- Sanders, T., Harms, H., Podschus, J., Finckh, U., Nickel, B., Rolfs, A., Rommelspacher, H., Schmidt, L. G. (1997). Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism in alcohol dependence with withdrawal seizures or delirium. *Biological Psychiatry*, *41*(3), 299-304.
- Sands, J. R., & Harrow, M. (1999). Depression during the longitudinal course of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *25*(1), 157-171.
- Santarelli, D. M., Beveridge, N. J., Tooney, P. A., & Cairns, M. J. (2011). Upregulation of dicer and microRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex Brodmann area 46 in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *69*(2), 180-187.
- Sartorius, N., Jablensky, A., Korten, A., Ernberg, G., Anker, M., Cooper, J. E., & Day, R. (1986). Early manifestations and first-contact incidence of schizophrenia in different cultures. *Psychological Medicine*, *16*, 909-928.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, *511*, 421-427.

- Schoots, O., & Van Tol, H. H. M. (2003). The human dopamine D4 receptor repeat sequences modulate expression. *The Pharmacogenomics Journal*, 3(6), 343-348.
- Seeman, M. V., & Lang, M. (1990). The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophrenia Bulletin*, 16(2), 185-194.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455, 58-63.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, 5(3), R13.
- Siegert, S., Seo, J., Kwon, E. J., Rudenko, A., Cho, S., Wang, W., ... & Tsai, L. H. (2015). The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, 18(7), 1008-1016.
- Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., ... & Hodgson, J. G. (2008). MiR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BCM Medicine*, 6:14.
- Simpson, J., Vetuz, G., Wilson, M., Brookes, K. J., & Kent, L. (2010). The *DRD4* receptor exon 3 VNTR and 50 SNP variants and mRNA expression in human post-mortem brain tissue. *American Journal of Medical Genetics*, 153B(6), 1228-1233.
- Smrt, R. D., Szulwach, K. E., Pfeiffer, R. L., Li, X., Guo, W., Pathania, M., ... & Zhao, X. (2010). MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase Mind Bomb-1. *Stem Cells*, 28(6), 1060-1070.

- Soldati, C., Bithell, A., Johnston, C., Wong, K. Y., Stanton, L. W., & Buckley, L. J. (2013). Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a cellular model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, *124*, 418-430.
- Stefansson, H., Ophoff, R. A., Steinberg, S., Andreassen, O. A., Cichon, S., Rujescu, D., ... & Collier, D. A. (2009). Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*, *460*(7256), 744-747.
- Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., ... & Stefansson, K. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, *71*(4), 877-892.
- Straub, R. E., Jiang, X., MacLean, C. J., Ma, Y., Webb, B. T., Myakishev, M. V., ... & Kendler, K. S. (2002). Genetic variation in the 6p22.3 gene *DTNBP1*, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, *71*(2), 337-348.
- Strazisar, M., Cammaerts, S., van der Ven, K., Forero, D. A., Lenaerts, A. S., Nordin, A., ... & Del-Favero, J. (2014). *MIR137* variants identified in psychiatric patients affect synaptogenesis and neuronal transmission gene sets. *Molecular Psychiatry*, *20*, 472-481.
- Stone, J. L., O'Donovan, M. C., Gurling, H., Kirov, G. K., Blackwood, D. H. R., Corvin, A., ... & Purcell, S. M. (2008). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature*, *455*, 237-241.
- Sullivan, P. F., Kendler, K. S., & Neale, M. C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of General Genetics*, *60*(12), 1187-1192.

- Sun, G., Yan, G., Noltner, K., Feng, J., Li, H., Sarkis, D. A., Sommer, S. S., & Rossi, J. J. (2009). SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*, *15*(9), 1640-1651.
- Sun, G., Ye, P., Murai, K., Lang, M. F., Li, S., Zhang, H., ... & Shi, Y. (2011). miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nature Communications*, *2*, 529.
- Szulwach, K. E., Li, X., Smrt, R. D., Li, Y., Luo, Y., Lin, L., ... & Jin, P. (2010). Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *Journal of Cell Biology*, *189*(1), 127-141.
- Takahashi, S., Matsuura, M., Tanabe, E., Yara, K., Nonaka, K., Fukura, Y., ... & Kojima, T. (2000). Age at onset of schizophrenia: Gender differences and influence of temporal socioeconomic change. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *54*, 153-156.
- Tang, Y. -I., Gillespie, C. F., Epstein, M. P., Mao, P. -x., Jiang, F., Chen, Q., ... & Mitchell, P. B. (2007). Gender differences in 542 Chinese inpatients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *97*, 88-96.
- van Erp, T. G. M., Guella, I., Vawter, M. P., Turner, J., Brown, G. G., McCarthy, G., ... & Potkin, S. G. (2014). Schizophrenia miR-137 locus risk genotype is associated with DLPFC hyperactivation. *Biological Psychiatry*, *75*(5), 398-405.
- Vassos, E., Pedersen, C. B., Murray, R. M., Collier, D. A., & Lewis, C. M. (2012). Meta-analysis of the association of urbanicity with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *38*(6), 1118-1123.
- Venkatesh, B. K., Thirthalli, J., Naveen, M. N., Kishorekumar, K. V., Arunachala, U., Venkatasubramanian, G., ... & Gangadhar, B. N. (2008). Sex difference in age of

- onset of schizophrenia: findings from a community-based study in India. *World Psychiatry*, 7, 173-176.
- Vijayan, N. N., Iwayama, Y., Koshy, L. V., Natarajan, C., Nair, C., Allencherry, P. M., Yoshikawa, T., & Bnerjee, M. (2009). Evidence of association of serotonin transporter gene polymorphisms with schizophrenia in a South Indian population. *Journal of Human Genetics*, 54, 538-542.
- Walss-Bass, C., Escamilla, M. A., Raventós, H., Montero, A. P., Armas, R., Dassori, A., ... & Almasy, L. (2005). Evidence of genetic overlap of schizophrenia and bipolar disorder: linkage disequilibrium analysis of chromosome 18 in the Costa Rican population. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatry Genetics)*, 139B, 54-60.
- Walss-Bass, C., Liu, W., Lew, D. F., Villegas, R., Montero, P., Dassori, A., ... & Raventós, H. (2006). A novel missense mutation in the transmembrane domain of neuregulin 1 is associated with schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 60(6), 548-553.
- Walss-Bass, C., Montero, A. P., Armas, R., Dassori, A., Contreras, S. A., Liu, W., ... & Escamilla, M. A. (2006). Linkage disequilibrium analyses in the Costa Rican population suggests discrete gene loci for schizophrenia at 8p23.1 and 8q13.3. *Psychiatric Genetics*, 16(4), 159-168.
- Walss-Bass, C., Raventós, H., Montero, A. P., Armas, R., Dassori, A., Contreras, S., ... & Escamilla, M. A. (2006). Association analyses of the neuregulin 1 gene with schizophrenia and manic psychosis in a Hispanic population. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 113, 314-321.
- Wang, D., Sun, X., Gong, Y., Gawronski, B. E., Langae, T. Y., Shahin, M. H. A., ... & Johnson, J. A. (2012). *CYP2C9* promoter variable number tandem repeat

- polymorphism regulates mRNA expression in human livers. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(5), 884-891.
- Wang, K. S., Liu, X., Arana, T. B., Thompson, N., Weisman, H., Devargas, C., ... & Xu, C. (2013). Genetic association analysis of *ITGB3* polymorphisms with age at onset of schizophrenia. *Journal of Molecular Neuroscience*, 51(2), 446-453.
- Wang, S., Li, W., Zhang, H., Wang, X., Yang, G., Zhao, J., ... & Lv, L. (2014). Association of microRNA137 gene polymorphisms with age at onset and positive symptoms of schizophrenia in a Han Chinese population. *International Journal of Psychiatry in Medicine*, 47(2), 153-168.
- Warburton, A., Breen, G., Rujescu, D., Bubb, V. J., & Quinn, J. P. (2014). Characterization of a REST-regulated internal promoter in the schizophrenia genome-wide associated gene *MIR137*. *Schizophrenia Bulletin*, 41(3), 698-707.
- Weinberg, M. S., & Wood, M. J. A. (2009). Short non-coding RNA biology and neurodegenerative disorders: novel disease targets and therapeutics. *Human Molecular Genetics*, 18(1), R27-R39.
- Wessely, S., Castle, Y., Der, G., & Murray, R. (1991). Schizophrenia and Afro-Caribbeans. A case-control study. *British Journal of Psychiatry*, 159, 795-801.
- Willemsen, M. H., Valles, A., Kirkels, L. A. M. H., Mastebroek, M., Loohuis, N. O., Kos, A., ... & Kleefstra, T. (2011): Chromosome 1p21.3 microdeletions comprising *DPYD* and *MIR137* are associated with intellectual disability. *Journal of Medical Genetics*, 48, 810-818.
- Woolston, A. L., Hsiao, P. C., Kuo, P. H., Wang, S. H., Lien, Y. J., Liu, C. M., ... & Chen, W. J. (2017). Genetic loci associated with an earlier age at onset in multiplex schizophrenia. *Scientific Reports*, 7(1), 6486.

- Wright, C., Turner, J. A., Calhoun, V. D., & Perrone-Bizzozero, N. (2013). Potential impact of miR-137 and its targets in schizophrenia. *Frontiers in Genetics, 4*.
- Wu, H., Tao, J., Chen, P. J., Shahab, A., Ge, W., Hart, R. P., ... & Sun, Y. E. (2010). Genome-wide analysis reveals methyl-CpG-binding protein 2-dependent regulation of microRNAs in a mouse model of Rett syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107*(42), 18161-18166.
- Xu, Q., Xiong, Y., Yuan, C., Liu, F., Zhao, F., Shen, J., ... & Yu, C. (2017). *ZNF804A* rs1344706 interacts with *COMT* rs4680 to affect prefrontal volume in healthy adults. *Brain Imaging and Behavior*. doi:10.1007/s11682-016-9671-x
- Yin, J., Lin, J., Luo, X., Chen, Y., Li, Z., Ma, G., & Li, K. (2014). MiR-137: A new player in schizophrenia. *International Journal of Molecular Sciences, 15*, 3262-3271.
- Zhang, P., Bian, Y., Liu, N., Tang, Y., Pan, C., Hu, Y., & Tang, Z. (2016). The SNP rs1625579 in miR-137 gene and risk of schizophrenia in Chinese population: a meta-analysis. *Comprehensive Psychiatry, 67*, 26-32.
- Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Molecular Psychiatry, 19*(7), 848-852.