



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA

TESIS DOCTORAL

***DISC1* y psicosis no afectiva: variaciones en endofenotipos y características clínicas en primeros episodios de psicosis**

*DISC1 and non-affective psychosis: effect on endophenotypes and clinical characteristics in first episode psychosis*

Tesis Doctoral realizada por:

**Javier Vázquez Bourgon**

Dirigida por:

**Prof. Benedicto Crespo Facorro**

Santander 2015



*A ANA*

*A ALBA, LUCIA Y NICOLAS*



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a Benedicto Crespo-Facorro por la inestimable oportunidad que me ha brindado de formar parte del equipo de investigación del Programa PAFIP. Por sus orientaciones, recomendaciones y apoyo durante estos años de programa de doctorado y en la realización de la presente tesis doctoral.

Quiero agradecer también a todos los miembros del equipo PAFIP por su valiosa ayuda y colaboración en la elaboración de los estudios de investigación que componen esta tesis. Sin su labor, clínica e investigadora, incluyendo la recogida y procesamiento de datos, este trabajo no habría sido posible.

De la misma manera, quisiera transmitir un agradecimiento afectuoso a los pacientes y sus familias, que de manera generosa han accedido a ser objeto de estudio, favoreciendo así nuestros esfuerzos en el avance del conocimiento de las psicosis.

Debo expresar mi gratitud de forma muy especial hacia mis padres, José Luis y Pilar, por haberme educado de esta manera, por haberme ayudado a ser quién hoy soy, por su apoyo y cariño en los momentos difíciles y sus ganas de compartir los momentos felices.

En último lugar, mi más sentido agradecimiento a Ana. Por su amor, su cariño, su apoyo y su comprensión incondicional durante todos estos años. Por ser el pilar principal de nuestro proyecto de presente y futuro, nuestra familia. Por hacerme feliz cada día. Y a mis niños, Alba, Lucía y Nicolás, por ser la alegría de mi vida, por ayudarme en este intento de ser cada día mejor, y por esas horas de vida familiar dedicadas a esta tesis.

## **FINANCIACIÓN Y APOYO INSTITUCIONAL**

La realización de los estudios de investigación que componen esta tesis doctoral se han realizado en el contexto del Programa de Atención de las Fases Iniciales de Psicosis de Cantabria (PAFIP), el cual está integrado en el Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM, Grupo 26), así como en el Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL).

Estos estudios de investigación han sido posibles gracias al apoyo de financiación externa procedente de procesos competitivos del CIBERSAM, el Instituto de Salud Carlos III (PI020499, PI050427, PI060507), la SENY Fundació Research Grant 2005-0308007 y la Fundación Marqués de Valdecilla (API07/011).

Así mismo, los estudios han contado con la colaboración técnica del Centro Nacional de Genotipado (CEGEN), y el Laboratorio de Neuroimagen y el Biobanco Valdecilla, ambos pertenecientes al IDIVAL.

# TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	La esquizofrenia .....	3
1.1.1.	Aspectos conceptuales y clínicos de la esquizofrenia .....	3
1.1.2.	Etiopatogenia de la esquizofrenia .....	5
1.1.3.	Formulación del concepto de endofenotipo en su aplicación al estudio de la causalidad genética de la esquizofrenia.....	11
1.1.4.	Estudio de las bases genéticas de endofenotipos y rasgos clínicos de la esquizofrenia .....	14
1.1.5.	Aportaciones de la genética a un modelo biológico de la esquizofrenia.....	20
1.2.	El gen <i>Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)</i> .....	21
1.2.1.	El gen <i>DISC1</i> .....	21
1.2.2.	La proteína DISC1 y su función.....	21
1.2.3.	El papel de <i>DISC1</i> en el modelo del neurodesarrollo en esquizofrenia .....	23
1.2.4.	Polimorfismos <i>DISC1</i> y endofenotipos de esquizofrenia .....	25
2.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	33
2.1.	Justificación del estudio .....	35
3.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	37
3.1.	Hipótesis.....	39
3.2.	Objetivos .....	40
3.2.1.	Objetivo principal .....	40
3.2.2.	Objetivos específicos.....	40
4.	MATERIAL Y METODOS .....	41
4.1.	Ámbito de estudio .....	43
4.2.	Poblaciones muestrales.....	44
4.2.1.	Muestra de pacientes.....	44
4.2.2.	Muestras de controles sanos .....	45
4.3.	Evaluación clínica .....	46
4.4.	Definición de respuesta clínica.....	48
4.5.	Variables sociodemográficas y premórbidas .....	49
4.6.	Evaluación cognitiva.....	50
4.7.	Adquisición de imágenes mediante resonancia magnética .....	51
4.8.	Procesamiento de imágenes .....	52

4.9.	Técnicas de genotipado.....	53
4.10.	Análisis estadístico .....	55
5.	RESULTADOS .....	59
5.1.	Descripción de la población muestral .....	62
5.1.1.	Características sociodemográficas y consumo de sustancias .....	62
5.1.2.	Características clínicas basales.....	64
5.1.3.	Medidas de estructura cerebral.....	66
5.1.4.	Medidas de funcionamiento neurocognitivo .....	66
5.1.5.	Frecuencias genotípicas y alélicas. Riesgo de psicosis .....	67
5.2.	Resultados de estudios ya publicados.....	69
5.2.1.	Publicación 1: Asociación de una variación en el gen <i>Disrupted-in-Schizophrenia 1</i> con sintomatología clínica en pacientes con un primer episodio de psicosis.....	69
5.2.2.	Publicación 2: Efecto de polimorfismos <i>DISC1</i> sobre el curso a largo plazo de déficits neurocognitivos en psicosis no afectiva. ....	71
5.2.3.	Publicación 3: Variaciones en el gen <i>Disrupted-in-Schizophrenia 1</i> modulan las diferencias longitudinales de la corteza cerebral a largo plazo en pacientes con un primer episodio de psicosis.....	73
5.3.	Resultados de estudios en proceso de publicación .....	75
5.3.1.	Variaciones del gen <i>DISC1</i> y su implicación en la respuesta farmacológica. ....	75
6.	PUBLICACIONES.....	87
7.	DISCUSION.....	115
7.1.	<i>DISC1</i> y riesgo de psicosis del espectro de la esquizofrenia y otras variables clínicas relevantes.....	117
7.2.	<i>DISC1</i> y presentación clínica.....	117
7.3.	<i>DISC1</i> y respuesta clínica .....	118
7.4.	<i>DISC1</i> y déficit cognitivo .....	121
7.5.	<i>DISC1</i> y variaciones en el grosor cortical.....	125
7.6.	Visión integral del efecto de polimorfismos <i>DISC1</i> sobre la psicosis no afectiva .....	128
7.7.	Fortalezas y debilidades de los trabajos .....	131
7.8.	Futuras líneas de investigación .....	134
8.	CONCLUSIONES / CONCLUSIONS .....	137
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	141

## LISTADO DE ABREVIATURAS

ANCOVA:	Análisis de la CoVarianza.
DALYs:	Disability-adjusted life years.
DISC1:	Disrupted-in-schizophrenia 1.
DNA:	Deoxyribonucleic acid.
DSM-IV:	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition.
DTI:	Diffusion tensor imaging.
DUP:	Duration of Untreated Psychosis.
GWAS:	Genome Wide Association Study.
HUMV:	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
LCR:	Líquido cefalorraquídeo.
mRNA:	messenger Ribonucleic Acid.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
PAFIP:	Programa de Atención de las Fases Iniciales de Psicosis de Cantabria.
PET:	Positron Emission Tomography.
PCR:	Polymerase Chain Reaction.
PD:	Proton Density.
RDoC:	Research Domain Criteria.
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear.
SANS:	Scale for the Assessment of Negative Symptoms.
SAPS:	Scale for the Assessment of Positive Symptoms.
SB:	Sustancia blanca.
SCID-I:	Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders.
SG:	Sustancia gris.
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism.
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences.
T1:	Tiempo de relajación longitudinal.
T2:	Tiempo de relajación transversal.
YLDs:	Years lived with disability.
WHO:	World Health Organization.



## SUMMARY

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder, characterized by a heterogeneous clinical presentation with a marked variability along the course of the illness and between subjects.

The most accepted etiopathological model proposes the schizophrenia as a neurodevelopmental disorder, resulting from the joint interaction of multiple environmental and genetics factors of a small size effect, with an overall estimated heritability of 60-80%. In the last decade, the characterization of the genetic bases of schizophrenia has evolved through the study of endophenotypes. The most studied endophenotypes in schizophrenia (e.g., neurocognitive function and brain morphology) have been suggested to be mediated by genes implicated in neurodevelopment processes.

Among those genes implicated in neurodevelopment pathways, *Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)* stands out due to its relevance in the disorder. The biological function of the DISC1 is not completely understood. However, there is strong evidence showing that DISC1 interacts with a range of proteins forming the DISC1-Interactome. Through its interactions with these proteins, DISC1 gets involved in neurodevelopment and neuronal signalling processes. Currently there is substantial evidence supporting *DISC1* as one of the main candidate genes for schizophrenia. Moreover, variations in several *DISC1* polymorphisms have been associated in schizophrenic patients to brain structure abnormalities, altered brain activation when performing cognitive tasks, cognitive impairment, and lately to clinical severity. However, there is a lack of studies on the effect of *DISC1* on the longitudinal changes in these endophenotypes, and on first-episode samples.

The aim of this thesis was to explore the possible effect of changes in three *DISC1* gene polymorphisms (rs821616, rs1000731, and rs6675281) on non-affective psychosis and its endophenotypes (clinical presentation and response, brain structure, and cognition), both transversely and after three years of treatment, in a well-characterized sample of patients with a first episode of psychosis, which were drug-naïve.

Two hundred and twenty-six Caucasian drug-naive patients experiencing a first episode of non-affective psychosis were genotyped for rs821616 (Ser704Cys), rs6675281 (Leu607Phe) and rs1000731 SNPs of the *DISC1* gene. The clinical severity of the illness was assessed using BPRS, SAPS and SANS scales at baseline and after 6 weeks of initiating the treatment. Likewise, neurocognitive examinations and brain MRIs (cortical thickness –CT–) were carried out at baseline and 3 years after initiating the treatment. Other clinical and socio-demographic variables were recorded to eliminate potential confounding effects. A control group of healthy subjects (n=303) was recruited by public advertising.

Our results failed to show an association between the *DISC1* polymorphisms studied and risk of suffering from psychosis. However, we found that the patients homozygous for the Ser allele of the Ser704Cys had significantly higher rates at the positive symptoms dimension and hallucinations item, compared to Cys carriers.

When studying the relation between *DISC1* and the endophenotype neurocognition we observed that the patients carrying the A allele of rs1000731 exhibited a significant improvement in Working Memory and Attention domains, while the patients homozygous for the A allele of rs821616 showed a significant improvement in Motor Dexterity performance over 3 years of follow-up.

The examination of the effect of *DISC1* variations on cortical thickness showed that those patients homozygous for the Leu allele of the rs6675281 SNP had a significant descend in cortical thickness (CT) over the 3-years period, while those carrying the Phe allele presented an increase in CT. When combining the two SNPs we found a synergic effect on CT progression, presenting those patients homozygous for Leu607+Ser704 a more pronounced cortical thinning.

And finally, when studying the possible effect of *DISC1* polymorphisms on treatment response we found that those patients homozygous for the G allele of rs1000731 were more frequently non-responders, measured with SANS after 6 weeks of treatment. When analyzing the clinical improvement longitudinally, we observed that those patients carrying the A allele for the rs1000731 presented a greater improvement in positive symptoms dimension.

In summary, we found *DISC1* gene polymorphisms associated with differences at the first break of the illness, in symptoms' severity and cognitive function. Moreover, we observed an effect on treatment response after 6 weeks of treatment. When analysing the longitudinal course of the illness, we observed that the *DISC1* polymorphisms were associated to differences in the course of cognitive deficits and in the rate of cortical thinning after 3 years of treatment. Most of these results, obtained in the publications included in this thesis, are in line with those previously described, supporting the hypothesis that the *DISC1* gene, perhaps through its effect on neurodevelopmental processes, has an implication in the pathophysiology of non-affective psychosis.



# **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1. La esquizofrenia**

### **1.1.1. Aspectos conceptuales y clínicos de la esquizofrenia**

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico notablemente heterogéneo que, incluido dentro del grupo de las psicosis, presenta como núcleo central la pérdida de contacto con la realidad, junto al que se da una psicopatología extremadamente problemática y muy variable, que afecta a la cognición, las emociones, la percepción y otros aspectos del comportamiento (Sadock y Sadock, 2009). La expresión de estas alteraciones es diferente en cada paciente y varía con el tiempo manifestándose habitualmente a través de alucinaciones, creencias delirantes, síntomas negativos y deficitarios, desorganización de la conducta y del pensamiento y disfunción social.

Mientras que su prevalencia-año se sitúa en torno al 0,5%, el riesgo de presentar esquizofrenia a lo largo de la vida afecta a cerca del 1% de la población (Saha et al., 2005). A su vez la incidencia anual de la psicosis varía entre un 7 y un 20,1 por cada 100.000 habitantes en función de si medimos los primeros episodios de esquizofrenia en sentido estricto, o de forma más amplia los primeros episodios de psicosis no afectiva (Baldwin et al., 2005). En los estudios realizados por nuestro equipo, sobre la incidencia de primeros episodios de psicosis no afectivas en la población en edad de riesgo de Cantabria, se encontró una incidencia anual del 1,38 por 100.000 (Pelayo-Terán et al., 2008). Se ha visto también, por ejemplo en los meta-análisis realizados por Aleman y colaboradores (2003) y por McGrath y colaboradores (2004), que los varones tienen una mayor probabilidad de desarrollar esquizofrenia a lo largo de la vida, con un riesgo relativo de 1,4 frente a las mujeres, hecho que también fue confirmado por nosotros en Cantabria donde se encontró un riesgo relativo del 1,6 (Pelayo-Terán et al., 2008). Es más, la ratio varón mujer en el riesgo de padecer esquizofrenia se incrementa conforme se establecen criterios más restrictivos para el diagnóstico de esquizofrenia (Beauchamp y Gagnon, 2004; Tandon et al., 2008). Finalmente decir que, como se evidencia en distintos meta-análisis, los datos de la literatura revelan de manera inequívoca que existe una asociación muy significativa entre una serie de variables sociales que, como la emigración o la residencia en zonas urbanas, están potencialmente vinculadas a

factores psicológicos, sociales y biológicos negativos generadores de estrés y desintegración social, y el riesgo de desarrollar esquizofrenia (McGrath et al., 2004; Cantor-Graae y Selten, 2005; van Os et al., 2010).

Los primeros síntomas del trastorno suelen aparecer en la edad adulta temprana, normalmente coincidiendo con una etapa importante para el definitivo desarrollo personal del individuo. Así, la edad de presentación suele situarse entre los 15 y los 35 años (50% por debajo de los 25 años), siendo infrecuente después de los 40 años (Saha et al., 2005). Numerosos estudios, entre los que se encuentra el realizado por nosotros en Cantabria, han demostrado que en los varones la esquizofrenia aparece entre 3 y 5 años antes que en las mujeres (Pelayo-Terán et al., 2008), hecho que parece asociarse a un mejor ajuste social y familiar, así como a un curso evolutivo más favorable, en dicho sexo (Aleman et al., 2003, McGrath et al., 2004; Atalay y Atalay, 2006).

Históricamente las psicosis, y de manera especial la esquizofrenia, han sido descritas como trastornos caracterizados por un curso crónico, y en el que eran frecuentes las recaídas y la tendencia a desarrollar resistencia al tratamiento y notables déficits en el funcionamiento tanto psíquico como social. Este punto de vista quedó reflejado en una amplia serie de estudios en los que se demostró que presentaban un curso evolutivo caracterizado por la baja proporción (20-50%) de pacientes que experimentaban una recuperación o mejoría significativa. Este hecho fue confirmado de manera más categórica en un exhaustivo meta-análisis de toda la literatura del siglo veinte sobre el *outcome* y en el que se demostró que tan solo un 40% de los pacientes habían experimentado mejoría después de 5-6 años de seguimiento (Hegarty et al., 1994). Sin embargo, este negativo punto de vista ha sido más recientemente revisado en el meta-análisis desarrollado por Menezes y colaboradores (2006) en el que, analizando los estudios desarrollados sobre muestras de primeros episodios de psicosis, se evidencia que la presencia de un curso evolutivo malo se daba en tan solo el 27,1% de los pacientes, presentando por el contrario el 42,2% de ellos un buen *outcome*. Sin embargo y pese a esta visión más optimista reflejada en la literatura reciente sobre el *outcome* de la esquizofrenia, todavía persiste en ella una tendencia a presentar un curso evolutivo crónico y recidivante con claros déficits en el funcionamiento psico-social. Como consecuencia de ello esta enfermedad causa un alto grado de discapacidad (Ertugrul y Ulug, 2002), siendo considerada globalmente como la tercera causa de discapacidad en un estudio internacional multicéntrico (Ustun et al., 1999) y una de las más importantes

según la OMS (WHO World Health Report, 2001). Así, la esquizofrenia es responsable del 1,1% de los DALYs y del 2,8% de los YLDs (Murray y López, 1996; Rossler et al., 2005). Además, se sabe que también las familias de las personas afectadas por dicha enfermedad sufren una considerable sobrecarga a causa de los síntomas de la enfermedad (Schulze y Rossler, 2005).

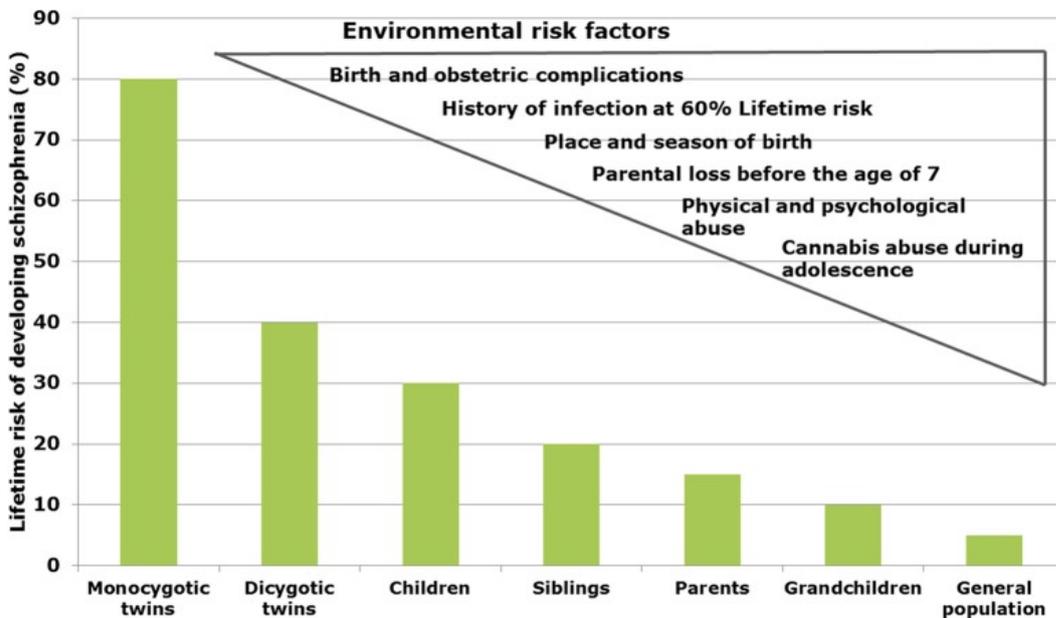
Junto a estas consecuencias devastadoras para los pacientes y sus familias, la esquizofrenia produce además un importante coste para la comunidad. Así, en su revisión de la literatura sobre los costes de la esquizofrenia, Knapp y colaboradores (2004) muestran la importante carga que supone la enfermedad, tanto a través de los costes directos como de los indirectos, aunque siendo estos últimos los principales responsables de este elevado gasto (Wu et al., 2005, Andlin-Sobocki y Rossler, 2005). Se estima que dichos gastos podrían alcanzar hasta un 2% del PIB en países occidentales (Black y Andreasen, 1999). De la misma forma, esta enfermedad produce un alto coste en España, donde los factores que determinan su alto coste son similares a los encontrados en estudios realizados en otros países (Vázquez-Polo et al., 2005).

### **1.1.2. Etiopatogenia de la esquizofrenia**

La esquizofrenia es un trastorno cerebral de naturaleza multifactorial en el que se combinan de manera extremadamente compleja factores ambientales y la acción conjunta de múltiples genes (Greenwood et al., 2007; Gratten et al., 2014). A través de la realización de estudios con gemelos y de asociación se ha estimado una heredabilidad del trastorno situada entre el 60% y el 80% (Sullivan et al., 2003), lo cual evidencia que si bien el impacto de la carga genética en su origen es esencial no deja también de ser relevante el influjo de los factores ambientales. En el mismo sentido Ripke y colaboradores (2013), en un reciente estudio del genoma completo (GWAS), han estimado que en la esquizofrenia 8.300 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) contribuyen a un riesgo conjunto del 32%, sugiriendo también que los factores ambientales interactuando con el *background* genético contribuyen a la fisiopatología de la esquizofrenia, y confirmando así el punto de vista expresado por otros autores (Manolio et al., 2009, Schmitt et al., 2014).

Estos hechos resultan coherentes con el modelo etiopatogénico más aceptado hoy en día que propone la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo resultado de la interacción de múltiples factores ambientales y genéticos con efectos de pequeño tamaño (Harrison y Weinberger, 2005). La relevancia y naturaleza de la interacción gen ambiente en el origen de la esquizofrenia queda claramente ejemplarizada en la Figura 1, procedente del trabajo de Schmitt y colaboradores (2014), en la que se describen de manera gráfica tanto el riesgo de heredabilidad para distintos niveles de parentesco como la contribución de distintos factores ambientales en dicho riesgo.

**Figura 1. Interacción factores genéticos y ambientales en el riesgo de esquizofrenia\***



\*Reproducida de Schmitt et al., 2014, con autorización.

La formulación inicial de la hipótesis del neurodesarrollo por Murray y Lewis (1987) y por Weinberger (1987) se basó en tres líneas fundamentales de evidencia. Primera, que existía una clara asociación entre el desarrollo de esquizofrenia y la presencia de afectaciones o “impactos” prenatales y perinatales; segunda, que en aquellos niños que posteriormente iban a desarrollar la enfermedad se daba un número excesivo de marcadores de afectación neuromotora, déficits físicos y cognitivos y alteraciones del desarrollo; y tercera, que los estudios de neuroimagen demostraban que al inicio de la enfermedad se daban ya alteraciones estructurales del cerebro. Desde entonces

numerosos estudios han confirmado la relevancia de estas líneas de evidencia clarificando la naturaleza de los factores de riesgo pre-y-perinatal, así como de los factores premórbidos de riesgo (Rapoport et al., 2005; Howes y Murray, 2014).

Desde el punto de vista de los factores de riesgo pre y peri-natal existe en el momento actual, como se evidencia en distintos meta-análisis, una amplia serie de datos demostrando la asociación entre las complicaciones obstétricas y el incremento del riesgo de desarrollar esquizofrenia. Así, se ha visto que la *odds ratio* acumulada del efecto de la exposición a complicaciones obstétricas en el ulterior desarrollo de esquizofrenia se sitúa en torno al 2,0 (IC 95%: 1,6-2,4) (Geddes et al., 1999; Cannon et al., 2002). Aunque dichas complicaciones parecen tener un efecto causal directo existe también la posibilidad de que sean meros marcadores de procesos causales o mecanismos biológicos subyacentes. Tal sería, por ejemplo, la presencia de una respuesta inmunológica materna alterada en el caso de la asociación de esquizofrenia y la presencia de infecciones virales en el embarazo (Brown et al., 2004; Rapoport et al., 2005). Finalmente, en relación con estos factores de riesgo existe una creciente evidencia de que interactúan en dichos pacientes con las alteraciones neurocerebrales y con los factores genéticos (Rapoport et al., 2005).

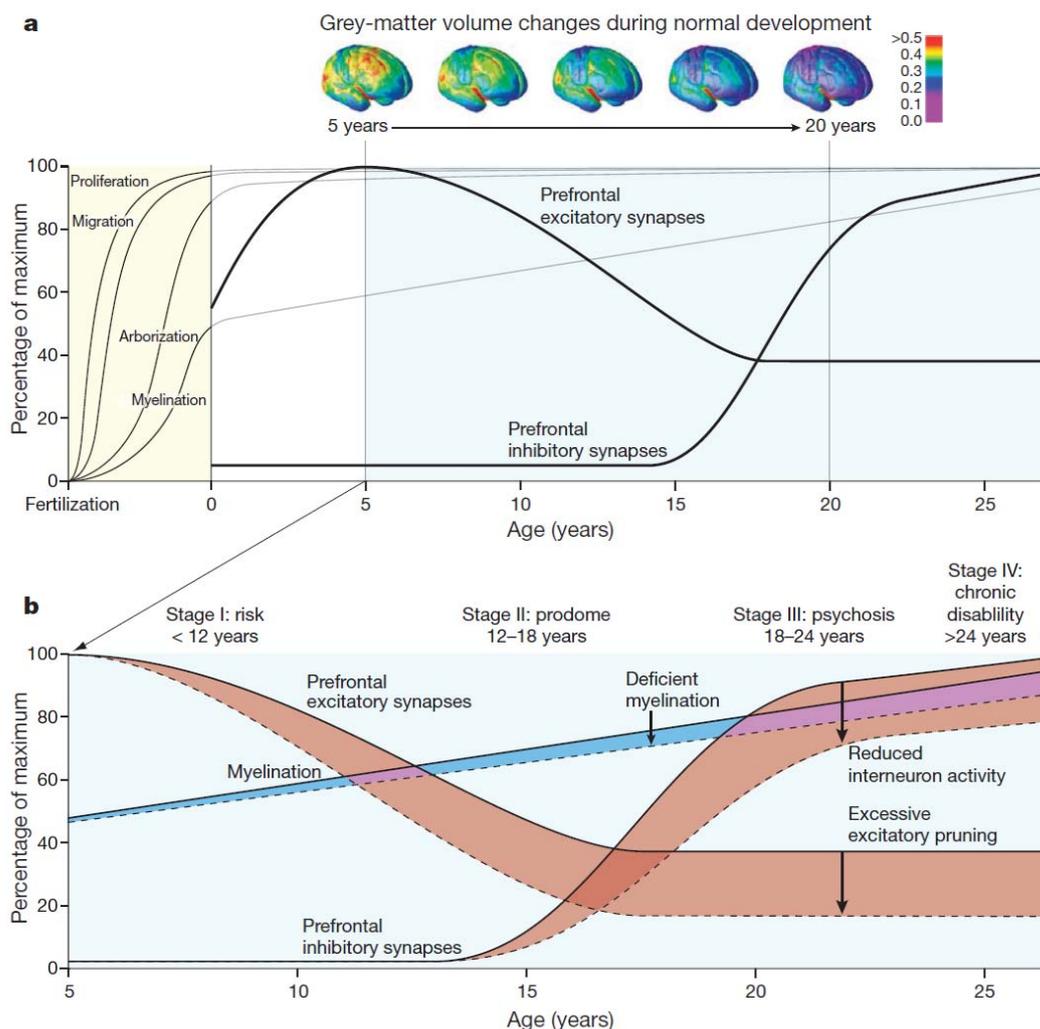
La presencia de factores premórbidos de riesgo, en pacientes afectos de esquizofrenia ha sido confirmada a través, por ejemplo, de estudios retrospectivos de cohortes y poblacionales (Cannon et al., 2002). Dichos factores abarcan desde las alteraciones motoras y los déficits en el desarrollo neuropsicológico y social hasta las manifestaciones psicopatológicas premórbidas (Cannon et al., 2002; Rapoport et al., 2005; Howes y Murray, 2014).

Finalmente, en relación con la presencia de alteraciones neuroanatómicas en el cerebro con anterioridad al desarrollo de la esquizofrenia lo cierto es que existe ya una amplia evidencia, demostrada en distintos meta-análisis, de que la enfermedad se asocia a alteraciones anatómicas cerebrales, como es el caso del incremento del volumen de los ventrículos laterales, o la disminución del volumen de la corteza cerebral, del hipocampo, del tálamo y del lóbulo frontal (Wright et al., 2000; Konick y Friedman, 2001; Davidson y Heinrichs, 2003). Dichas alteraciones han sido también confirmadas por Pantelis y colaboradores (2003) quienes examinando, en un mismo grupo de pacientes con un primer episodio psicótico, la existencia de alteraciones estructurales

cerebrales antes y después del desarrollo de la psicosis han demostrado que la transición a la psicosis se asociaba a una reducción bilateral significativa de la circunvolución cingulada, así como del córtex orbitofrontal. Incluso en pacientes catalogados como de “alto riesgo para desarrollar psicosis” se ha detectado, al ser comparados con un grupo control, una disminución de la sustancia gris en las regiones prefrontales e hipocampales del cerebro, siendo dicha disminución todavía más marcada en el subgrupo que posteriormente desarrollo una psicosis (Witthaus et al., 2009; Wood et al., 2010).

La teoría del “doble impacto”, desarrollada por Knudson en 1971 para explicar el origen de una enfermedad multifactorial como el cáncer y el papel de los supresores tumorales, tiene especial aplicación para integrar en una explicación etiológica de la esquizofrenia el modelo del neurodesarrollo con las complejidades de sus bases genéticas y ambientales (Knudson, 1971). En dicha teoría, las alteraciones tempranas que se dan a nivel biológico fruto de los insultos pre y peri natales, catalogados como “primer impacto”, generarían una alteración en el desarrollo temprano del sistema nervioso, a través de provocar alteraciones en la morfogénesis y diferenciación del cerebro, y en los *pathways* o rutas de señalamiento celular. Dichas alteraciones tempranas producirían una especial vulnerabilidad a largo plazo para el “segundo impacto” que, dándose en la adolescencia, coincidiendo con un periodo crítico del desarrollo cerebral, generaría ya las manifestaciones psicopatológicas (Maynard et al., 2001; Schmitt et al., 2014). Los mecanismos a través de los que este “segundo impacto” interfiere con la estructura cerebral tiene que ver con un incremento patológico de la “poda sináptica” (*synaptic pruning*) con eliminación excesiva de sinapsis, así como con una pérdida de plasticidad neuronal (Maynard et al., 2001; Schmitt et al., 2014) (ver Figura 2). Nos permite así esta teoría entender la presencia de alteraciones anatómicas y funcionales en el cerebro de personas que posteriormente desarrollarán la esquizofrenia, pero también que se de en ellas un determinado patrón de cambios progresivos en la estructura y funcionamiento cerebral, con posterioridad al desarrollo del trastorno (Rapoport et al., 2005).

**Figura 2. Modelo del neurodesarrollo de la esquizofrenia\***



**a.** El desarrollo cortical normal implica proliferación, migración, arborización (formación de circuitos) y mielinización, ocurriendo los dos primeros procesos principalmente durante la etapa prenatal, y los dos últimos continuando a lo largo de las 2 primeras décadas de vida. Se cree que la combinación de los efectos del pruning del árbol neuronal y de la deposición de mielina es la causa de la reducción progresiva de volumen de sustancia gris observado en estudios longitudinales de neuroimagen. **b.** La trayectoria en niños desarrollando esquizofrenia podría incluir una reducción en la elaboración de vías inhibitorias y un aumento del pruning de vías excitatorias llevando a una alteración del equilibrio excitatorio-inhibidor en el córtex prefrontal. Una reducida mielinización podría alterar la conectividad. \* Reproducida de Insel, 2010, con autorización.

La relevancia de la teoría del neurodesarrollo radica en que permite además integrar en ella la presencia de alteraciones en los neurotransmisores y los fundamentos genéticos. Se ha demostrado, por ejemplo, que los daños pre y perinatales que se dan en la fase del neurodesarrollo conllevan también cambios a nivel de neurotransmisores, como es el caso por ejemplo de los neurotransmisores dopaminérgicos, cuya presencia se ve alterada en distintas regiones cerebrales (Howes y Murray, 2014). A su vez, un alto

número de genes de susceptibilidad para la esquizofrenia parecen estar implicados en estos procesos. Entre aquellos sobre los que existe una mayor evidencia relativa a su efecto, se encuentran la *neuroregulina*, la *disbindina*, *CF4*, *mir137*, *neuroxin 1* y de manera especial el *DISC1* (Rapoport et al., 2012; Howes y Murray, 2014). La evidencia preclínica parece indicar que variaciones en genes como el *DISC1* impactan sobre el sistema dopaminérgico alterándolo (Niwa et al., 2010). De manera similar también se ha detectado que alteraciones de la *neuroregulina* y la *disbindina* afectan dicho sistema (Kato et al., 2011; Papaleo et al., 2012). Todo lo cual nos permite postular como posible vía de mecanismo causal la combinación de dichos genes de susceptibilidad con alteraciones en el neurodesarrollo y disfunciones dopaminérgicas.

Hasta aquí nos hemos centrado en la hipótesis del neurodesarrollo. No obstante, distintos estudios han demostrado la presencia de procesos degenerativos evidenciados, por ejemplo, a través de una pérdida progresiva de masa neuronal a lo largo del tiempo en pacientes que han desarrollado esquizofrenia (Chiapponi et al., 2013). Así, por ejemplo, en el metaanálisis elaborado por Shenton y colaboradores (2001) se demostró la existencia, en estos pacientes, de diferencias volumétricas en áreas cerebrales, como el hipocampo o los ganglios basales, a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad. En el mismo sentido estudios más recientes, sobre todo en primeros episodios de psicosis, han demostrado la presencia de cambios estructurales progresivos en los pacientes con esquizofrenia (Olabi et al., 2011; Andreasen et al., 2011).

El origen de dicho proceso degenerativo podría deberse, por ejemplo, a un posible “efecto tóxico” de la enfermedad o a procesos de pérdida y/o afectación funcional neuronal derivados de la presencia a lo largo del curso de la enfermedad de factores ambientales negativos como pueden ser el consumo de sustancias ilegales, o el propio tratamiento farmacológico. Existe en el momento actual evidencia de que dichos mecanismos patógenos interferirían en los procesos de mielinización con el resultado de generar una pérdida de sustancia blanca y también provocarían una disminución de la sustancia gris, a través de la reducción de la formación de sinapsis inhibitorias así como de un acortamiento excesivo de las sinapsis excitatorias (Andreasen et al., 2011; Bartzoskis et al., 2011). Otros mecanismos que se han planteado como responsables de dicho proceso degenerativo presente a lo largo del curso de la enfermedad, serían los relacionados con una pérdida progresiva de los procesos de plasticidad neuronal derivada del efecto tóxico de dichos factores (Glantz et al., 2006; Andreasen et al.,

2011). También se postula como mecanismo causal para los procesos de neurodegeneración el basado en las alteraciones en los neurotransmisores. Así, se ha visto que la dopamina se encuentra también involucrada en los procesos de proliferación, migración y poda neuronal, como también lo hace en los procesos de estrés oxidativo y excitotoxicidad que causa la neurodegeneración (Glanzt et al., 2006).

Aunque con frecuencia la teoría de la neurodegeneración ha sido vista como contrapuesta a la del neurodesarrollo, lo cierto es que ambas pueden actuar como complementarias superponiéndose a lo largo del curso evolutivo, idea que por lo demás sería coherente con la teoría del “doble impacto” mencionada. Apoyo a esta hipótesis lo tenemos en el trabajo de Bose y colaboradores (2009) en el que, comparando pacientes con esquizofrenia y controles sanos, obtienen datos consistentes con una reducción inicial premórbida del volumen de sustancia gris (posiblemente secundaria a una anomalía en el neurodesarrollo), que se acompaña de una acelerada e intensa reducción de sustancia blanca conforme progresa la enfermedad. Se evidencia así, en el curso evolutivo de la esquizofrenia, la presencia de un proceso neurodegenerativo que, combinándose con una alteración del neurodesarrollo, sigue una distinta trayectoria para la sustancia blanca y la sustancia gris. Se podría postular como mecanismo explicativo de esta concatenación y superposición de procesos de neurodesarrollo y neurodegeneración que es posible que, en combinación con los efectos tóxicos de la enfermedad y el ambiente, la propia alteración del neurodesarrollo se manifieste de forma progresiva no solo en la fase pre y peri-natal sino también todo a lo largo del ulterior curso evolutivo de la enfermedad, afectando de distinta manera a la sustancias gris y blanca (Nour y Howes, 2015). Es esta una teoría que, aunque plausible, queda pendiente de ser contrastada en estudios posteriores.

### **1.1.3. Formulación del concepto de endofenotipo en su aplicación al estudio de la causalidad genética de la esquizofrenia**

A pesar de los avances ocurridos en el campo de la genética, expresados por ejemplo en la exitosa caracterización del genoma humano y en la masiva presencia de estudios de ligamento y de asociación, se ha obtenido un éxito muy limitado en la identificación de genes o estructuras genéticas causales para el desarrollo de la esquizofrenia, tanto como

entidad global como categorizada a través de los diagnósticos tradicionales. Las razones para esta falta de éxito se deben: en primer lugar, a la inherente complejidad de la enfermedad, caracterizada por su naturaleza multifactorial y poligénica; en segundo término, a la relativa falta de fiabilidad y replicabilidad de los sistemas de evaluación; y por último, a la imprecisión de los actuales sistemas de clasificación. Este último aspecto es especialmente relevante en la medida en que, como plantean Gottesman y Gould (2003), el sistema de diagnóstico y clasificación psiquiátrico actual, basado en la identificación e integración “por consenso” de estructuras sintomatológicas y sindrómicas y no en marcadores objetivos de naturaleza contrastable como los biológicos, no parece suficientemente válido para el estudio de la compleja causalidad genética de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia. En línea con este planteamiento recientemente el NIMH americano ha propuesto la sustitución, para la investigación de aspectos complejos de las enfermedades psiquiátricas, del sistema tradicional de clasificación por el *Reseach Domain Criteria (RDoC)* que pretende catalogar la enfermedad mediante categorizaciones taxonómicas dimensionales del funcionamiento que integren datos de la neurociencia con aspectos genéticos y conductuales (Insel y col., 2010).

De manera coherente con la propuesta de aplicación de los RDoC, en los últimos tiempos, una serie de estrategias han sido adoptadas, con mayor o menor éxito, para intentar resolver esta problemática. La primera, radica en sustituir el estudio de las bases genéticas de la enfermedad definida por su diagnóstico clínico, por el estudio de categorías sindrómicas más limitadas o incluso de síntomas psicóticos aislados. Tal es, por ejemplo, el caso de las alucinaciones (Sanjuan, 2006), los trastornos del lenguaje (Tolosa y col., 2010), el aislamiento emocional (Haram et al., 2015), el síndrome deficitario (Pelka-Wysieka et al., 2013), o los síntomas negativos y desorganizados (Fanous et al., 2012). En el mismo sentido se podrían enmarcar, como más adelante veremos, el estudio de las bases genéticas de aspectos clave de la enfermedad como son los de su presentación clínica y respuesta terapéutica. Sin embargo la estrategia que está resultando más prometedora es la de la aplicación a la enfermedad mental por Gottesman y Shields (1972) del concepto de endofenotipo desarrollado originalmente por John y Lewis (1966) para el estudio de las características biológicas de los insectos. Desde entonces el estudio de las bases genéticas de la esquizofrenia a través de sus

endofenotipos ha mostrado ser muy útil para la caracterización de genes candidatos (Cannon, 2005).

Los endofenotipos son biomarcadores medibles que correlacionan con la enfermedad debido a influencias genéticas subyacentes compartidas. Conviene que clarifiquemos aquí desde un punto de vista conceptual la diferenciación entre el concepto de biomarcador y el de endofenotipo. Como indica Lenzeweger (2013), la presencia de los criterios de heredabilidad y cosegregación diferencian el endofenotipo de un biomarcador, que puede ser cualquier característica biológica que está influenciada por la salud, la enfermedad o un factor exógeno. Así, los endofenotipos son en realidad un subconjunto de biomarcadores que se caracterizan por estar influenciados por el mismo factor genético que confiere el riesgo para la enfermedad. De esta forma, los endofenotipos pueden mejorar nuestra capacidad para detectar genes con un efecto sobre el riesgo de presentar la enfermedad o sobre las características de la enfermedad. Esto se debe principalmente a que son constructos genéticamente más sencillos que la enfermedad, que están en una posición más cercana al nivel de acción del gen y poseen un mayor tamaño de efecto genético o aportan un poder estadístico extra gracias a su capacidad para clasificar a los individuos cuantitativamente dentro de categorías diagnósticas (Glahn et al., 2014). Además los endofenotipos aportan un mayor conocimiento de los mecanismos que subyacen a la enfermedad.

Según Gottesman y Gould (2003) para que un rasgo de la enfermedad sea considerado como endofenotipo debe cumplir las siguientes premisas: 1. Estar asociado a la enfermedad en la población; 2. Ser heredable; 3. Ser estado-independiente (debe manifestarse independientemente de que la enfermedad esté activa o no); 4. Co-segregar con la enfermedad en los familiares; y 5. Que el endofenotipo se encuentre en familiares no afectados en una proporción mayor que en la población general.

En psiquiatría se han acometido una amplia serie de intentos para identificar y desarrollar endofenotipos candidatos que reúnan las condiciones previamente señaladas para su delimitación y que además posean un alto nivel de fiabilidad y validez. En relación con esto, es de reseñar el reciente intento de Glahn y colaboradores (2012) de desarrollar de manera empírica un método para ordenar jerárquicamente endofenotipos candidatos basándose en el grado de similitud genética con la enfermedad objeto de estudio. A través de dicho método es posible adjudicar a cada endofenotipo candidato

un valor de rango, que facilita los estudios comparativos (*Endophenotype Ranking Value -ERV-*). Valor que puede ser aplicado tanto a un diagnóstico específico como a cualquier rasgo de la enfermedad, potencialmente relevante. Entre los endofenotipos identificados para la esquizofrenia sobre los que existe un mayor consenso en la literatura acerca de su relevancia se encuentran los déficits cognitivos y las alteraciones estructurales cerebrales (Cannon y Keller, 2006). Así, se ha demostrado que, por ejemplo, el funcionamiento neurocognitivo (y cuando está presente, el déficit neurocognitivo) es un fenotipo con una marcada influencia genética a lo largo de toda la vida tanto en individuos sanos (Deary et al., 2012; Plomin y Deary, 2015) como en pacientes con un trastorno psicótico (Bilder et al., 2011; McIntosh et al., 2013). Respecto a los endofenotipos morfológicos cerebrales, estudios multicéntricos recientes, como los desarrollados por el consorcio ENIGMA, están aportando una robusta evidencia sobre los factores genéticos que subyacen a las diferencias estructurales cerebrales en la esquizofrenia (Thomson et al., 2014). En este sentido, Panizzon y colaboradores (2009) encontraron, en un estudio realizado en gemelos, que ciertas medidas cerebrales, como la superficie y el grosor de la corteza cerebral, son también altamente heredables. Y Hariri y Weinberger (2003), en su estudio resumen toda la evidencia hallada en estudios de genómica de la neuroimagen funcional.

#### **1.1.4. Estudio de las bases genéticas de endofenotipos y rasgos clínicos de la esquizofrenia**

A continuación analizaremos las bases genéticas de algunos aspectos clínicos clave de la esquizofrenia, así como aquellos endofenotipos sobre los que existe en la literatura un amplio consenso sobre su utilidad para profundizar en el conocimiento de dicho trastorno.

##### ***1.1.4.1. Presentación clínica***

Una de las principales características de la esquizofrenia es la notable variabilidad de su presentación clínica, no solo entre individuos sino también a lo largo de la evolución de la enfermedad en cada paciente. Así, vemos como la presentación clínica de la

esquizofrenia en el debut de la enfermedad, su curso y evolución, e incluso su outcome, son marcadamente variables. Mientras la mayoría de los pacientes se recuperarán de la fase aguda inicial, tan solo el 14-20% lo harán completamente. Otros pacientes mejorarán pero presentarán episodios recurrentes o recaídas, o sintomatología crónica o déficits funcionales (Davidson y McGlashan, 1997; Huber, 1997).

Esta variabilidad en la presentación clínica es dependiente de diversos procesos, tanto a nivel ambiental como de factores biológicos. Los factores más observables que afectan a la variabilidad clínica son de tipo ambiental, como por ejemplo la adherencia al tratamiento o el consumo de tóxicos. Sin embargo, estudios recientes aportaron evidencias sobre el efecto de diferentes genes sobre la presentación clínica o su progresión, sugiriendo que diversos factores genéticos contribuyen de forma conjunta a la existencia de estas diferencias individuales sobre la presentación clínica, curso y progresión (Fanous and Kendler, 2008).

#### **1.1.4.2. Respuesta clínica**

Las personas diagnosticadas de esquizofrenia presentan una importante variabilidad en la respuesta terapéutica al tratamiento antipsicótico (Kane, 1999). A pesar de la disponibilidad en la práctica clínica de una amplia variedad de fármacos antipsicóticos, así como de diversas estrategias de optimización y potenciación terapéutica, alrededor del 20-33% de los pacientes responden mal al tratamiento, pudiendo incluso ser clasificada su enfermedad como resistente al tratamiento. Esta heterogeneidad en la respuesta terapéutica está influenciada, al igual que en el caso de la presentación clínica, por diversos factores, tanto biológicos como ambientales. La edad, el sexo, la raza, los factores genéticos, el consumo de tóxicos, determinadas condiciones sociales y la comorbilidad, son algunos de ellos (Tandom et al., 2010). Aunque no es abundante, existe actualmente evidencia científica sobre la heredabilidad de la respuesta a fármacos antipsicóticos (Mata et al., 2001; Emsley et al., 2002).

Dada esta significativa variabilidad inter-individual, y el limitado éxito en la búsqueda de otros factores biológicos que puedan predecir la respuesta terapéutica, en los últimos años se han llevado a cabo estudios de farmacogenética que han aportado creciente evidencia científica acerca de la implicación de polimorfismos de genes, principalmente

de las vías serotoninérgicas y dopaminérgicas en las variaciones de la respuesta terapéutica (Malhotra et al., 2004; Vázquez-Bourgon et al., 2010; Blanc et al., 2010; Brandl et al., 2014). Se ha propuesto así, que esta variabilidad individual en la respuesta a fármacos antipsicóticos, en pacientes con esquizofrenia, podría estar relacionada con diferencias genéticas en diversos genes implicados en procesos de neurotransmisión (Arranz y de Leon, 2007).

El fenotipo más comúnmente estudiado en farmacogenética, debido a su mayor validez y fiabilidad, es el de respuesta temprana, en el cual la eficacia es evaluada en base a cambios clínicos en periodos que van de 3 semanas a unos pocos meses (Malhotra et al., 2004).

#### ***1.1.4.3. Déficit neurocognitivo en esquizofrenia***

El déficit neurocognitivo es muy común en la esquizofrenia siendo uno de los elementos clínicos centrales de la enfermedad (Heaton et al., 2001). Este déficit está presente desde los estadios iniciales del trastorno, incluso bastante antes de que aparezcan los síntomas psicóticos (Bora et al., 2009; Mesholam-Gately et al., 2009). Además, su presencia tiene no solo implicaciones importantes para el nivel de funcionamiento del paciente, sino que además determina una peor evolución del cuadro con niveles de discapacidad mayores (Allot et al., 2011; Ayesa-Arriola et al., 2013).

Esta hoy en día establecido que tanto la esquizofrenia como el déficit cognitivo que suele acompañarla son entidades con una alta heredabilidad (Sullivan et al., 2003; Greenwood et al., 2007). Así, el funcionamiento neurocognitivo se ha instituido como un endofenotipo con una marcada influencia genética a lo largo de toda la vida de los individuos, tanto cuando se mide en sujetos sanos (Deary et al., 2012; Plomin y Deary, 2015), como en pacientes con psicosis (Bilder et al., 2011; McIntosh et al., 2013). De esta forma, podemos entender que, al menos en parte, la vulnerabilidad individual al déficit neurocognitivo que aparece en la esquizofrenia pueda ser explicado por alteraciones en procesos del neurodesarrollo mediadas genéticamente (Bilder et al., 2011).

Existe cierta controversia sobre si el déficit cognitivo se mantiene estable a lo largo del curso de la enfermedad (Addington et al., 2005; Becker et al., 2010) o si por el

contrario lo hace a lo largo de la vida del paciente (Hoff et al., 2005; Albus et al., 2006). Sin embargo, un estudio previo realizado en nuestra muestra de pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva, sobre la progresión del funcionamiento cognitivo a largo plazo, con un seguimiento a lo largo de 3 años, demostró que los pacientes afectados por un trastorno psicótico presentaban una peor evolución que los sujetos sanos (grupo control) en los dominios cognitivos de memoria verbal y memoria visual (Rodríguez-Sánchez et al., 2013). Además, otro estudio realizado por nuestro grupo en la misma muestra, identifica en estos pacientes con un primer episodio de psicosis, diferentes patrones de curso de los déficits cognitivos observados al inicio de la enfermedad (Ayesa-Arriola et al., 2013), apoyando de manera clara la existencia de una marcada variabilidad individual en la progresión de los déficits neuropsicológicos en la esquizofrenia (Heinrichs and Zakzanis, 1998).

Las diferentes pruebas cognitivas realizadas para el estudio de los déficits cognitivos se han asociado de manera clara a áreas cerebrales concretas. Por ejemplo, el córtex prefrontal ha sido asociado de forma repetida y consistente con déficits cognitivos concretos en los dominios de *memoria de trabajo* y *atención* en la esquizofrenia (Manoach, 2003; Rosier et al., 2013). De esta forma podríamos especular que determinadas alteraciones morfológicas cerebrales podrían explicar determinados daños o déficits cognitivos (Liu et al., 2013).

#### ***1.1.4.4. Diferencias morfológica cerebrales***

##### ***Cambios volumétricos cerebrales***

Al comparar a los pacientes con esquizofrenia y otras psicosis con sujetos sanos, se han descrito de forma repetida en los diferentes estudios realizados hasta la fecha una serie de alteraciones morfológicas (Shenton et al., 2001). Entre estos cambios se encuentran un menor volumen cerebral global y un aumento del volumen de los ventrículos. Además se han encontrado modificaciones en estructuras subcorticales como son la reducción de los volúmenes del hipocampo y del tálamo, así como un incremento del volumen del globo pálido (Wright et al., 2000; Vita et al., 2006; Steen et al., 2006; Ellison-Wright et al., 2008). Por último, a nivel de corteza cerebral se observa una

reducción del volumen y del grosor de la corteza cerebral globalmente, y más pronunciados en los lóbulos temporal y frontal (Haukvik et al., 2013).

### ***Elección del grosor cortical como endofenotipo de estudio***

Como en el resto de áreas de estudio en la esquizofrenia, la elección del fenotipo correcto de neuroimagen es crítica para conseguir una identificación exitosa de aquellos genes que modulan la estructura o función cerebral. Aunque en el caso de la esquizofrenia, uno de los fenotipos más utilizados ha sido el volumen de diferentes estructuras (Shenton et al., 2001), hoy en día se propone el uso del grosor de la corteza cerebral frente al uso del volumen de la sustancia gris en el caso de estudios de neuroimagen-genética (Winkler et al., 2010). Aunque el volumen cortical resulta de la combinación de la superficie y del grosor de la corteza, se ha observado que los cambios en el volumen de la corteza se deben principalmente a cambios en el grosor de la misma (Rimol et al., 2012). Así, en los estudios de neuroimagen-genética se propone de forma preferente como endofenotipo de estudio la medida de grosor de la corteza (Panizzon et al., 2009).

### ***Cambios en el grosor de la corteza cerebral***

Diversos estudios comparativos entre pacientes con esquizofrenia y sujetos sanos sobre el grosor de la corteza cerebral han encontrado un adelgazamiento bilateral y global de la corteza cerebral, el cual se muestra de forma generalizado, aunque más marcado en las áreas frontal y temporal, en los pacientes con esquizofrenia al compararlos con sujetos sanos (Goldman et al., 2009; Rimol et al., 2012). Además, al estudiar la corteza cerebral en muestras de pacientes con un primer episodio de psicosis vemos que estas diferencias en el grosor de la corteza están presentes incluso desde los estadios iniciales de la enfermedad (White et al., 2003; Narr et al., 2005a,b; Venkatasubramanian et al., 2008; Roiz-Santiáñez et al., 2010; Crespo-Facorro et al., 2011). Este dato apoya la idea de que las diferencias morfológicas cerebrales observadas en la esquizofrenia podrían ser utilizadas como marcadores biológicos de la enfermedad. Se puede además postular la hipótesis de que este endofenotipo pueda estar determinado por alteraciones en los procesos de neurodesarrollo. En línea con esta hipótesis, diversos estudios realizados en

familias de pacientes con esquizofrenia, comparando a los pacientes con sus familiares sanos y con individuos sanos no relacionados con los pacientes (Goldman et al., 2009; Yang et al., 2010; Byun et al., 2012), demuestran una graduación en el adelgazamiento cortical entre los 3 grupos, lo cual apoya la idea del carácter de heredabilidad de este endofenotipo. Todo esto indicaría por tanto que este fenómeno no es consecuencia del curso de la enfermedad (cronicidad, uso de fármacos, teoría de la neurotoxicidad) sino que puede estar en el origen de la misma.

Sin embargo, hay cierta controversia acerca de si la reducción de la corteza cerebral observada en la esquizofrenia se produce en estadios muy tempranos de los procesos de neurodesarrollo, o por el contrario de forma progresiva a lo largo del curso de la enfermedad. Así, estudios recientes en pacientes con un primer episodio de psicosis no encontraron cambios significativos en el grosor de la corteza cerebral a largo plazo, tras seguimientos de 3 y 5 años respectivamente (Nesvåg et al., 2012; Roiz-Santiáñez et al., 2015). Mientras que otros estudios sí describen un adelgazamiento progresivo de la corteza cerebral en pacientes con psicosis (Cobia et al., 2012; van Haren et al., 2011).

Además, varios estudios previos sobre diferencias estructurales cerebrales en esquizofrenia sugieren que las anomalías estructurales presentes al inicio de la enfermedad podrían ser restauradas a lo largo del curso evolutivo (Keshavan et al., 1998; Schaufelberger et al., 2011). En línea con esta hipótesis, Goghari y colaboradores (2013) en un estudio longitudinal sobre los efectos a corto plazo de fármacos antipsicóticos atípicos sobre la corteza cerebral, encuentra que los pacientes estudiados presentaban un incremento significativo del grosor de la corteza cerebral tras 8 semanas de tratamiento al compararlos con un grupo control. El estrés crónico (Blix et al., 2013), ciertas dietas (Sizonenko et al., 2013), y la actividad cognitiva (Engvig et al., 2010) han sido descritas también como factores que podrían influir también sobre cambios en la corteza cerebral.

Teniendo en cuenta todas estas evidencias científicas podríamos concluir que existe una importante variabilidad en la progresión del grosor de la corteza cerebral en la esquizofrenia, probablemente debido al efecto conjunto de múltiples factores, tanto ambientales como genéticos.

### 1.1.5. Aportaciones de la genética a un modelo biológico de la esquizofrenia

En las últimas décadas se ha conseguido un avance importante en el conocimiento de la neurobiología de la esquizofrenia (Sawa y Snyder, 2002), habiéndose realizado un progreso importante en la identificación de genes candidatos a través de estudios de asociación y ligamiento (Owen et al., 2005). Más recientemente, estudios de asociación del genoma completo (GWAS en sus siglas en inglés) a gran escala realizados respectivamente sobre muestras de esquizofrenia y muestras de psicosis más amplias (psicosis no afectiva) identifican nuevos marcadores de riesgo para la psicosis (Ripke et al., 2013; Bramon et al., 2014).

Aunque la causalidad es difícil de probar, el estudio genético de la esquizofrenia está aportando luz sobre la implicación de cadenas o vías biológicas (*pathways*) posiblemente asociadas a la patología de la enfermedad (Jaaro-Peled et al., 2009).

Los principales genes candidatos para la esquizofrenia, por haber sido más consistentemente replicados, así como por otras características a nivel de su funcionalidad, o hallazgos citogenéticos, o de su expresión en muestras de cerebro post-mortem son los genes *Catechol-O-methyl transferase (COMT)*, *Neuregulin 1 (NRG1)*, *Dysbindin (DTNBP1)*, *Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)*, *Regulator of G-protein signalling 4 (RGS4)*, *D-amino acid oxidase activator (DAOA-G72)*, o el *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* (Harrison y Weinberger, 2005; Owen et al., 2007).

Algunos de estos genes, que se han encontrado asociados a la esquizofrenia o a endofenotipos de la enfermedad, están implicados en procesos de neurodesarrollo. Así, al menos parte de la vulnerabilidad individual en los endofenotipos de la esquizofrenia, como son la presentación clínica, las diferencias morfológicas cerebrales, o los déficits cognitivos, podrían explicarse por alteraciones de procesos de neurodesarrollo mediadas por variaciones genéticas comunes (Chubb et al., 2008; Bilder et al., 2011). Apoyando así la hipótesis de la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo (Lewis y Levitt, 2002).

De entre los genes implicados en el neurodesarrollo destaca el gen *DISC1* como uno de los principales en el estudio de la esquizofrenia, por su repetida asociación con la enfermedad y sus endofenotipos como veremos a continuación. Además, recientemente ha sido identificado como uno de los genes candidatos con más relevancia en la

esquizofrenia, gracias al estudio con realizado por Ayalew y colaboradores (2012) utilizando una metodología de genómica funcional convergente.

## **1.2. El gen *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)***

### **1.2.1. El gen *DISC1***

El gen *DISC1* fue por primera vez descrito a través de la observación de una translocación balanceada en t(1q42.1;11q14.3), la cual segregaba con esquizofrenia y otros trastornos mentales mayores en una familia escocesa amplia (Millar et al., 2000; Blackwood et al., 2001). A partir de este hallazgo, diversos estudios independientes de ligamiento, caso-control, y de asociación en familias, realizados en diferentes poblaciones étnicas, han aportado mayor evidencia de la implicación del locus *DISC1* en 1q42.1 en la aparición de trastornos del espectro de la esquizofrenia (Bradshaw y Porteous, 2012; Chubb et al., 2008). Sin embargo, a pesar de esta creciente acumulación de evidencia científica, varios artículos y dos recientes estudios de asociación del genoma completo (GWAS) a gran escala realizados respectivamente sobre muestras de esquizofrenia y muestras de psicosis más amplias (psicosis no afectiva) no encontraron asociación significativa entre variaciones en el gen *DISC1* y riesgo de sufrir psicosis (Ripke et al., 2013; Bramon et al., 2014).

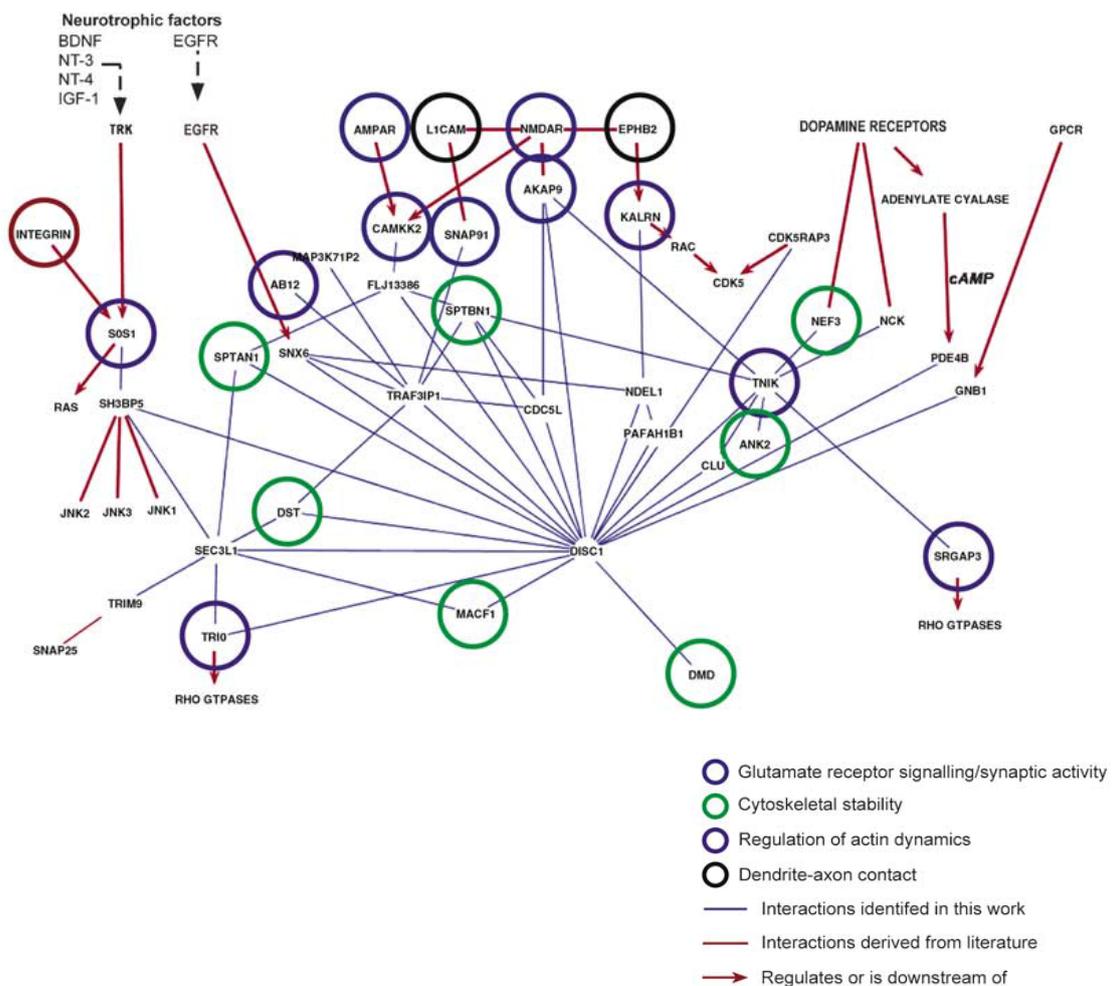
### **1.2.2. La proteína *DISC1* y su función**

La función biológica de la proteína que codifica el gen *DISC1* no es del todo conocida, y todavía no tenemos un conocimiento amplio de cómo variaciones en el gen *DISC1* podrían incrementar el riesgo de padecer un trastorno mental como la esquizofrenia o modular esta enfermedad.

Actualmente, es conocido que el gen *DISC1* codifica una proteína de andamiaje que interactúa con múltiples proteínas, dando lugar al complejo conocido como *DISC1*

Interactome (Camargo et al., 2007) (ver Figura 3). Este complejo está compuesto por diversas proteínas que están implicadas en procesos de neurogénesis, crecimiento neuronal y desarrollo cortical, así como en procesos de señalamiento neuronal (Randall et al. 2014; Bradshaw y Porteous, 2012; Jaaro-Peled et al. 2009; Chubb et al., 2008; Camargo et al., 2007; Millar et al., 2003; Sawa et al., 2003). Algunas de estas proteínas con las que interactúa la proteína DISC1 son: la proteína fasciculation and elongation zeta 1 (FEZ1), nuclear distribution gene E homolog-like 1 (NDEL1), lissencephaly-1 (LIS1), phosphodiesterase 4B (PDE4B), glycogen synthasekinase3b (GSK3b), DIX domain-containing1 (DIXDC1), o PSD-95 (Muraki y Tanigaki, 2015; Hennah et al., 2009; Mackie et al., 2007).

Figura 3. DISC1 interactome\*



\* Reproducida de Camargo et al., 2007

Estudios realizados en modelos animales han demostrado una relación entre mutaciones en el gen *DISC1* y cambios histológicos y morfológicos cerebrales reminiscentes de la esquizofrenia. Este hecho, por lo tanto apoya la implicación del gen *DISC1* en los procesos de desarrollo y maduración cortical (Lee et al., 2011; Niwa et al., 2010).

La proteína DISC1 se expresa en neuronas, de forma amplia en el cerebro, pero predominantemente en el hipocampo y en la corteza cerebral (Wang et al., 2008). Estudios recientes han demostrado como esta expresión de la proteína DISC1, a nivel periférico en linfocitos, se ve reducida en pacientes diagnosticados de esquizofrenia (Millar et al., 2005; Trossbach et al., 2014; Rampino et al., 2014). Adicionalmente, se ha demostrado como niveles bajos de expresión de la proteína DISC1 correlaciona con niveles bajos de expresión de alguna de las proteínas que integran el complejo DISC1-Interactome en las áreas cerebrales hipocampo y corteza cerebral (Lipska et al., 2006).

### **1.2.3. El papel de *DISC1* en el modelo del neurodesarrollo en esquizofrenia**

Existe hoy en día extensa evidencia científica, obtenida de estudios animales y celulares, apoyando el papel del gen *DISC1* en el modelo de neurodesarrollo para la esquizofrenia. En una reciente revisión Muraki y Tanigaki (2015) resumen las evidencias científicas más notables de la implicación de *DISC1* en el neurodesarrollo, a partir de estudios en modelos animales. Así por ejemplo, se ha demostrado que el knockdown de *DISC1* afecta a la migración de interneuronas tangenciales (Steinecke et al., 2012, 2014), e inhibe la migración neuronal en la corteza cerebral (Kamiya et al., 2005; Kubo et al., 2010), así como a cambios en la generación, posicionamiento y maduración de nuevas neuronas en el hipocampo (Chandran et al., 2014). Además, los estudios animales con mutación del gen *DISC1* (Disc1 L100P/L100P) han mostrado una reducción en el volumen cerebral, una reducción del número y en la distribución de las neuronas en la corteza cerebral, déficits en la migración interneuronal, así como anomalías conductuales reminiscentes de la esquizofrenia (Clapcote et al., 2007; Lee et al., 2011, 2013; Shoji et al., 2012). En línea con estos hallazgos, los ratones portadores de una variante con una delección de 25 pares de bases en el gen *DISC1* (*DISC1*<sup>Δ25bp/Δ25bp</sup>mice) mostraron aumentados los ventrículos y déficits en la memoria de trabajo (Koike et al., 2006; Juan et al., 2014). Además la sobre-expresión de esta DISC1 truncada en las

neuronas produce aumento del ventrículo lateral, reducción de las interneuronas parvoalbumin-positivas y alteraciones conductuales reminiscentes de la esquizofrenia (Hikida et al., 2007; Pletnikov et al., 2008; Shen et al., 2008; Ayhan et al., 2011). Es más, a través de un sistema transgénico reversible y transitorio, se observa como alteraciones en la funcionalidad de la proteína DISC1 (inducción de una porción C-terminal) en la fase temprana postnatal, pero no en fases adultas, produce varios fenotipos reminiscente de la esquizofrenia, entre los que se incluye una menor complejidad dendrítica en hipocampo, rasgos depresivos, deficiencias en la memoria de trabajo, y una menor sociabilidad (Li et al., 2007). Ayhan y colaboradores (2011), utilizando esta misma técnica, observan que las alteraciones en la expresión de DISC1 produce una reducción en los niveles de dopamina en la corteza cerebral y un menor número de neuronas en la corteza cerebral. Pero además, dependiendo de si la expresión de la proteína truncada se produce en diferentes fases del neurodesarrollo (prenatal, postnatal, o ambas) se observan diferentes alteraciones en fenotipos neuroconductuales.

Se ha observado que las alteraciones en el gen *DISC1* en fases tempranas del neurodesarrollo conlleva la aparición de fenotipos del tipo de la esquizofrenia en edad adulta. Así, Niwa y colaboradores (2010) describen como una inactivación transitoria del gen *DISC1* en el córtex prefrontal en el cerebro pre- y perinatal en roedores, conduce a alteraciones neuroquímicas y conductuales en el adulto. Y Nakata y colaboradores (2009) describen como variaciones en la proteína DISC1, son expresados más frecuentemente durante el neurodesarrollo fetal que en fases más tardías, son más expresados en cerebros de pacientes con esquizofrenia que en controles, y están asociados a variaciones genéticas de *DISC1* previamente asociadas a la enfermedad. Greenhill y colaboradores (2015) encuentran como la alteración postnatal de la proteína DISC1 en ratones afectando la formación de sinapsis, produce variaciones en la plasticidad cortical en el adulto.

Hoy en día existe también creciente evidencia científica apoyando la localización de la proteína DISC1 en diversos compartimentos subcelulares (Chubb et al., 2008; Brandon et al., 2009; Jaaro-Peled et al., 2009; Thomson et al., 2013), lo cual sugiere que podría desempeñar múltiples funciones en diferentes localizaciones en la célula. Así, se ha detectado la expresión de DISC1 en el citoesqueleto, la mitocondria y el centrosoma. Algunas variantes truncadas de DISC1 pueden mostrar variaciones en la distribución subcelular, frecuentemente localizadas difusamente en el citoplasma sin asociarse

eficazmente a estructuras subcelulares. En otras ocasiones, sí presentan una distribución correcta, incluso en mitocondria y centrosoma, pero mostrando niveles más bajos de expresión (revisado en Chubb et al., 2008). A nivel de estudios celulares, se ha encontrado en el cultivo de precursores neuronales del epitelio olfatorio de pacientes con psicosis (esquizofrenia y trastorno bipolar), alteraciones en los niveles y distribución de DISC1, que modifican negativamente la homeostasis cAMP, la organización de microtúbulos, y la migración celular. Estos resultados sugieren que su presencia en estadios tempranos del desarrollo cerebral podrían impactar en la maduración y función cerebral (Muñoz-Estrada et al., 2015).

Este papel de DISC1 en el centrosoma y microtúbulos es importante ya que las redes de microtúbulos organizados desde el centrosoma cumplen funciones importantes a nivel celular en el cerebro, incluyendo la proliferación de progenitores celulares, o la migración y diferenciación neuronal (Feng y Walsh, 2001; Badano et al., 2005). La proteína DISC1 a su vez, juega un papel en la cascada microtúbulo/centrosoma, en la cual se ha descrito su interacción con NDEL1 y otras proteínas del complejo DISC1-Interactome, y su importancia en el crecimiento de la neurita (Ozeki et al., 2003). Estas interacciones se producen a través del dominio C-terminal de DISC1, facilitando la asociación con el centrosoma de las proteínas del complejo DISC1-Interactome (revisado en Brandon et al., 2009).

#### **1.2.4. Polimorfismos *DISC1* y endofenotipos de esquizofrenia**

Durante la última década, el estudio de la relación entre el gen *DISC1* y diversos endofenotipos de la esquizofrenia (ej.: presentación clínica, alteraciones morfológicas estructurales cerebrales, diferencias funcionales cerebrales, y déficit neurocognitivos) han aportado evidencia de la asociación entre variaciones en el gen *DISC1* y diferencias en la presentación clínica de las psicosis, diferencias estructurales cerebrales, diferencias en la función cerebral e incluso alteraciones en el funcionamiento cognitivo, en pacientes con psicosis del espectro de la esquizofrenia.

A continuación describimos la evidencia científica existente hasta el momento sobre la relación del gen *DISC1* con diferentes endofenotipos de la esquizofrenia.

#### **1.2.4.1. *DISC1* y presentación clínica en la esquizofrenia**

Hasta la fecha solo unos pocos estudios han explorado la posible relación entre este gen y la presentación clínica en la esquizofrenia (Hennah et al., 2003; DeRosse et al., 2007; Szeszko et al., 2008; Tomppo et al., 2009; Lepagno-Bestel et al., 2010). Estos estudios han hallado asociaciones entre diferentes polimorfismos *DISC1* y diferencias en la gravedad de la clínica psicótica positiva, es decir en la intensidad de las alucinaciones y delirios (Szeszko et al., 2008; DeRosse et al., 2007). En un estudio reciente, Lepagno-Bestel y colaboradores (2010), encuentran en una muestra de pacientes franceses el alelo C del rs6675281 asociado a la sintomatología psicótica tanto positiva como negativa, medido por las escalas SAPS y SANS, así como a otras variables clínicas de interés como son la edad de inicio y la duración de la psicosis sin tratar (DUP). No encuentran, sin embargo, diferencias en ningún otro de los polimorfismos estudiados (rs821616, rs3738401, rs1984895). Además, también se ha descrito una asociación entre este gen y rasgos de personalidad relacionados con la psicosis en individuos sanos, no afectados de un trastorno psicótico (Hennah et al., 2003; Tomppo et al., 2009). Sin embargo cabe destacar que ninguno de los artículos descritos fueron realizados en muestras de pacientes con un primer episodio psicótico, por lo que se puede entender que en dichos estudios no fue posible controlar los factores de confusión derivados de la cronicidad de la enfermedad y de los posibles efectos de los tratamientos antipsicótico de larga duración, sobre el efecto de los polimorfismos *DISC1* sobre la presentación clínica.

#### **1.2.4.2. *DISC1* y déficit cognitivos**

Recientemente varios estudios han demostrado evidencia científica de la asociación entre variaciones en el gen *DISC1* y diferencias en el funcionamiento cognitivo tanto en sujetos sanos como en pacientes con un trastorno psicótico del espectro de la esquizofrenia (Hennah et al., 2003, 2005; Cannon et al., 2005; Callicot et al., 2005; Burdick et al., 2005; Thomson et al., 2005; Liu et al., 2006; Palo et al., 2007; Kim et al., 2008; Nicodemus et al., 2014).

Además otros estudios, a través de técnicas de RMN funcional y de modelos de neuroimagen funcional, han señalado la existencia de una relación entre este gen y deficiencias en la activación cerebral durante la realización de pruebas cognitivas (Callicot et al., 2005, 2013; Prata et al., 2008), lo cual se ha propuesto como una prueba de que subyacen ineficiencias neuronales.

Kim y colaboradores (2008) encuentran una relación significativa, en un muestra coreana, entre el rs821616 y el subgrupo de pacientes con pobre nivel de concentración, medido por la escala *Operational Criteria Checklist*, sin encontrar diferencias en la sintomatología psicótica negativa, medida con la escala SANS.

Asimismo, el funcionamiento cognitivo y la actividad cerebral producida por pruebas cognitivas en el córtex prefrontal han demostrado que correlacionan con la expresión periférica de la DISC1 (Rampino et al., 2014).

Por otra parte, en lo referente al posible efecto de las variaciones en este gen sobre la variabilidad longitudinal en el funcionamiento cognitivo a largo plazo, Thomson y colaboradores (2005) informan de la asociación entre este gen con el envejecimiento cognitivo en sujetos sanos.

Sin embargo, no existen estudios hasta la fecha que exploren este posible efecto del gen *DISC1* sobre el curso que sigue el déficit cognitivo que suele aparecer al principio de la enfermedad en la esquizofrenia.

De entre los diversos polimorfismos del gen *DISC1* hay 3 SNPs de un alto interés (rs821616, rs6675281, y el rs1000731) debido a la relevancia que han mostrado en estudios previos sobre cognición.

El alelo Ser (A) del rs821616 ha sido asociado con una peor función cognitiva en pacientes con un trastorno psicótico (Callicot et al., 2005; Palo et al., 2007), y con el envejecimiento cognitivo en sujetos sanos (Thomson et al., 2005). Asimismo, estudios de neuroimagen funcional (Callicot et al., 2005; Burdick et al., 2005; Di Giorgio et al., 2008) has mostrado la asociación de este alelo con datos que sugieren una menor eficacia de los circuitos neuronales.

Respecto al polimorfismo rs6675281, recientes estudios lo relacionan con diferencias en el funcionamiento cognitivo en pacientes con esquizofrenia (Cannon et al., 2005), y en

sujetos sanos (Nicodemus et al., 2014). De la misma manera, aquellos pacientes portadores del alelo Phe de este polimorfismo presentaban un incremento en la actividad neuronal durante la realización de pruebas cognitivas, lo cual sugería una vez más una ineficiencia neuronal durante la actividad cognitiva (Brauns et al., 2011).

Y finalmente, el alelo G del polimorfismo rs1000731 se ha encontrado asociado con diferencias en la memoria verbal y de aprendizaje en pacientes con esquizofrenia (Cannon et al., 2005). También este polimorfismo se ha relacionado con diferencias de activación cerebral durante la realización de pruebas cognitivas en estudios de neuroimagen funcional, y de manera más concreta con diferencias en la activación del hipocampo durante pruebas de memoria de reconocimiento (Callicott et al., 2013).

Teniendo en cuenta todas las evidencias descritas podríamos hipotetizar que variaciones en el gen *DISC1*, quizás a través de alteraciones en procesos de neurodesarrollo neuronal, podrían producir diferencias en procesos funcionales y estructurales cerebrales, que conduzcan al establecimiento de circuitos cerebrales menos eficientes. Finalmente, esta menor eficiencia cerebral podría ser puesta en evidencia a través de un menor rendimiento en pruebas cognitivas, o a través de una mayor activación cerebral para alcanzar niveles “normalizados” de rendimiento cognitivo, en pacientes con un cuadro psicótico. Así, variaciones en el gen *DISC1* podrían explicar, en parte, la variabilidad en los déficits cognitivos que se observan en la psicosis.

En este sentido, dos estudios recientes encuentran variaciones en el gen *DISC1* asociadas a diferencias significativas en la integridad de la sustancia blanca, medida a través de resonancia magnética de tensor de difusión (Sprooten et al., 2011; Whalley et al., 2015), sugiriendo que dichos cambios en la sustancia blanca podrían producir deficiencias en la transmisión de información entre aéreas cerebrales, y por consiguiente facilitar la aparición de variaciones en el funcionamiento cognitivo (Jung and Haier, 2007).

#### **1.2.4.3. *DISC1* y corteza cerebral**

El gen *DISC1*, probablemente debido al papel de la proteína para la que codifica y que está implicado en la regulación de múltiples aspectos de la neurogénesis embrionaria y adulta, así como en el crecimiento de las neuritas y desarrollo cortical, tiene un efecto

sobre la estructura cerebral y en concreto sobre diferencias en la corteza cerebral (Duff et al., 2013; Randall et al. 2014). En este sentido, Raznahan y colaboradores (2011) describen en su trabajo una asociación significativa entre polimorfismos del gen *DISC1* y diferencias en el ritmo de adelgazamiento de la corteza cerebral en una muestra de sujetos sanos. Vemos por lo tanto como variaciones en el gen *DISC1* se han asociado de forma repetida y consistente con diferencias en estructura cerebral tanto en sujetos sanos como en pacientes con esquizofrenia.

En el caso del polimorfismo rs6675281, el alelo Phe se ha asociado con cambios en el volumen de la sustancia gris (Trost et al., 2013), y con un adelgazamiento de la corteza cerebral en la circunvolución supramarginal izquierda, al compararlo con sujetos homocigotos para el alelo Leu (Brauns et al., 2011).

Respecto a la relación entre el polimorfismo rs821616 y los cambios en la estructura cerebral, existe cierta controversia en la literatura. Aunque dos estudios previos no encuentran esta asociación (Chakravarty et al., 2012; Kahler et al., 2012), otros estudios posteriores de neuroimagen y genética aportan evidencias de la asociación entre el alelo Ser y diferencias estructurales en áreas de la corteza motora (Stacey et al., 2014; Knickmeyer et al., 2014).

Por último el rs1000731 ha sido descrito asociado a reducciones en la sustancia gris en la circunvolución frontal superior e izquierda (Cannon et al., 2005).

Por lo tanto, es relevante realizar nuevas investigaciones sobre el posible efecto de las variaciones en el gen *DISC1* sobre cambios en la corteza cerebral, ya que estos polimorfismos pueden contribuir a la variabilidad en la progresión de los cambios en la corteza cerebral observados en pacientes con esquizofrenia.

#### **1.2.4.4. *DISC1* y respuesta terapéutica**

Estudios recientes sugieren la posibilidad de que el gen *DISC1* pueda modular la respuesta terapéutica a fármacos antipsicóticos en pacientes con esquizofrenia y otros trastornos psicóticos del espectro de la esquizofrenia, principalmente a través de su actuación sobre el sistema glutamatérgico (Hennah y Porteous, 2009).

En línea con esta hipótesis, Sawa y Snyder (2003) proponen que la *DISC1* podría convertirse en diana terapéutica gracias a su implicación en la vía glutamatérgica, a través de su interacción con la proteína Citrón, la cual es una proteína citoesqueleto en posible asociación con la PSD-95, que es a su vez una proteína anclaje de receptor NMDA. Millar y colaboradores (2003) describen también la interacción de DISC1 con otras proteínas del complejo DISC1 interactome como son las proteínas A-kinase anchoring protein 9/AKAP450 (AKAP9), GRIPAP1, y ARHGEF11, las cuales interactúan a su vez directamente con los receptores NMDA, AMPA y el transportador de glutamato (EAAT4), respectivamente. De esta forma, el gen DISC1 podría influir indirectamente en la neurotransmisión NMDA. En línea con esta idea, se ha descrito recientemente que el nivel de expresión de la proteína DISC1 a nivel presináptico regula la descarga de glutamato a nivel de terminales neuronales presinápticas (Maher y LoTurco, 2012).

Otros estudios apoyarían la implicación del gen *DISC1* en la respuesta al tratamiento antipsicótico a través de su participación en el sistema dopaminérgico. Así, en un estudio realizado en roedores adultos, en los que se había bloqueado la expresión de DISC1 durante el periodo fetal, se mostraron conductas reminiscentes de la esquizofrenia, así como alteraciones en el sistema dopaminérgico (Niwa et al., 2010). Resulta interesante además comprobar que dichas conductas mejoraron tras tratar a los roedores con sustancias que re-establecían la vía de la *DISC1* de señalamiento celular (Mao et al., 2009). Otros estudios sobre ratones con mutación inducida de *DISC1* (ratones Disc1-L100P), encuentran fenotipos conductuales reminiscentes de la esquizofrenia, que eran favorecidos por la administración de anfetaminas y revertidos con la administración de fármacos antipsicóticos (Lipina et al., 2004). Y Su y colaboradores (2014) describen una interacción proteica DISC1-DR2 asociada también a conductas reminiscentes de esquizofrenia en ratones Disc1-L100P que eran revertidas al fraccionar dicho complejo. Además encuentran una elevada interacción D2R-DISC1 en el tejido cerebral de ratones Disc1-L100P y en tejido cerebral post-mortem de pacientes con esquizofrenia.

Otros estudios realizados en roedores apoyan la implicación del gen *DISC1* en la farmacorrespuesta. Así, Clapcote y colaboradores (2007) muestran como la mutación en el gen *DISC1* producía un fenotipo de comportamiento reminiscente de esquizofrenia, pero con una respuesta modificada a la clozapina. Mientras que Chiba y

colaboradores (2006) describen un aumento de la expresión de mRNA de *DISC1* en áreas del cerebro en roedores, tras recibir tratamiento crónico con antipsicóticos atípicos.

A nivel de investigación en farmacogenética en humanos sobre el gen *DISC1*, existe hasta la fecha tan solo un número limitado de estudios. Tres estudios aportan datos de la implicación del gen *DISC1* en la respuesta terapéutica en esquizofrenia (Mouaffak et al., 2007; Hotta et al., 2011; Terzic et al., 2014). Los dos estudios más recientes (Terzic et al., 2014; Hotta et al., 2011) comparan un grupo de pacientes resistentes al tratamiento con otro de respondedores en sendas muestras de pacientes con esquizofrenia, de origen centroeuropeo y japonés respectivamente. Ninguno de los estudios haya diferencias genéticas entre estos grupos para los polimorfismos estudiados (rs6675281 y rs821616 en Terzic et al., 2014; y rs751229, rs3738401, rs821597 y rs821616 en Hotta et al., 2011).

Sin embargo, Mouaffak y colaboradores (2007), al comparar una muestra de pacientes con psicosis ultra-resistente y un grupo de respondedores, sí encuentran que el alelo A del rs3738401 es significativamente más frecuente en el grupo de pacientes ultra-resistentes que en el de respondedores. Y aunque no encuentran diferencias para el rs821616, sí observan que el alelo T del rs6675281, es más frecuente en el grupo de respondedores.

Existe por último, otro estudio relacionando variaciones en el gen *DISC1* y la respuesta terapéutica en una muestra de trastorno depresivo (Arias et al., 2014). En este estudio los autores encuentran una tendencia a la asociación entre los polimorfismos rs6675281 y rs1000731 y la eficacia del escitalopram en una muestra de pacientes con depresión mayor.



## **2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



## **2.1. Justificación del estudio**

En los últimos años, gracias a los datos aportados por numerosos estudios de ligamiento, caso-control, y de asociación en familias, realizados en diferentes poblaciones, el gen *DISC1* se ha asociado de manera significativa al riesgo de presentar esquizofrenia. Se ha acumulado además con dichos estudios una creciente evidencia acerca del efecto que variaciones en este gen ejercen sobre diversos endofenotipos de la enfermedad, incluyendo de manera específica aquellos relativos a la neurocognición y a las variaciones cerebrales tanto estructurales como funcionales, e incluso a las diferencias en la presentación clínica.

Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha sobre el gen *DISC1* y su relación con las psicosis se han llevado a cabo en muestras sesgadas y escasamente representativas de pacientes con cuadros crónicos de esquizofrenia, y no en muestras representativas de pacientes en las fases tempranas de la enfermedad. La importancia de realizar este tipo de investigación en muestras de pacientes con un primer episodio de psicosis estriba en que de esta manera se limita la presencia de factores de confusión derivados de la cronicidad de la enfermedad y del hecho de haber recibido un tratamiento farmacológico previo durante periodos largos de tiempo. Al mismo tiempo, la condición de que dichos pacientes constituyan una muestra representativa del conjunto de los individuos que en una comunidad concreta desarrollan la enfermedad se convierte en un factor metodológicamente relevante.

Por todo ello la existencia, en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, de un Programa de Atención a las Fase Iniciales de las Psicosis (programa PAFIP) que incluye todos (o al menos una gran mayoría) de los pacientes que en la comunidad de Cantabria desarrollan la enfermedad nos brinda la oportunidad de investigar dicha asociación limitando en gran medida las deficiencias metodológicas previamente mencionadas.

Como segundo elemento principal que justifica la realización de este estudio, hemos de reseñar la no existencia hasta el momento de estudios que hayan explorado los posibles efectos de variaciones del gen *DISC1* sobre las modificaciones longitudinales que se producen a lo largo del tiempo en las características y endofenotipos de la enfermedad. Tal es el caso del déficit neurocognitivo y de las variaciones en el grosor de la corteza

cerebral en las psicosis y de manera más específica en la esquizofrenia. Todo ello delimita un área relevante y todavía inexplorada de investigación, que puede en gran medida ser subsanada a partir de la metodología de seguimiento a largo plazo que se incorpora en el programa PAFIP previamente mencionado.

Resulta por lo tanto pertinente que, en el contexto del programa de Atención a las Fase Iniciales de las Psicosis (programa PAFIP), continuemos investigando acerca de los posibles efectos en la patología psicótica de las variaciones del gen *DISC1*. Resulta ello especialmente relevante dado que resulta previsible que variaciones en este gen podrían contribuir a la variabilidad en la progresión de la enfermedad, a través de modificaciones en la presentación clínica psicopatológica y de cambios longitudinales en los endofenotipos propuestos. Todo lo cual podrá contribuir de manera significativa a mejorar nuestro conocimiento de los factores que condicionan el origen de la enfermedad, su respuesta a las intervenciones y en última instancia su curso evolutivo.

### **3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



### **3.1. Hipótesis**

En base al estado actual del conocimiento en este área, es posible formular las siguientes hipótesis:

- i) Que los polimorfismos del gen *DISC1* tienen un efecto significativo sobre la gravedad, curso y pronóstico de la esquizofrenia. Por lo tanto planteamos como hipótesis que en nuestra muestra los polimorfismos del gen *DISC1* estarán asociados a:
  - a. la presencia de esquizofrenia
  - b. la existencia de diferencias en la gravedad de la psicopatología al inicio de la enfermedad.
  - c. la respuesta terapéutica temprana a fármacos antipsicóticos.
  
- ii) Que los polimorfismos rs821616, rs1000731 y rs6675281 del gen *DISC1* estarán asociados a variaciones significativas en la neurocognición y en el grosor cerebral de los pacientes afectados de psicosis.
  
- iii) Que diferencias identificadas en los endofenotipos objeto de estudio (neurocognición y estructura cerebral) evolucionarán de formas diferentes a largo plazo (3 años) en función de dichos polimorfismos del gen *DISC1*.

## **3.2. Objetivos**

### **3.2.1. Objetivo principal**

El objetivo general de los estudios incorporados en esta tesis doctoral es el de explorar la relación entre los polimorfismos del gen *DISC1* y la variabilidad individual en la presentación y curso de la esquizofrenia en pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva, a través del estudio de determinadas características clínicas y endofenotipos intermedios de la enfermedad.

### **3.2.2. Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de los trabajos que componen esta tesis doctoral son:

- i) Analizar la asociación del polimorfismo rs821616 del gen *DISC1* y el riesgo de presentar esquizofrenia.
- ii) Explorar el efecto de los polimorfismos de *DISC1* (rs821616) sobre las características clínicas y sociodemográficas de pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva.
- iii) Estudiar la influencia de los polimorfismos de *DISC1* (rs821616, rs1000731 y rs6675281) sobre los déficits cognitivos al inicio de la enfermedad, así como la evolución de los mismos a largo plazo (3 años).
- iv) Estudiar la relación entre los polimorfismos de *DISC1* (rs821616 y rs6675281) y el grosor de la corteza cerebral, así como su evolución tras 3 años en una muestra de pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva.
- v) Explorar el efecto de los polimorfismos de *DISC1* (rs821616, rs1000731 y rs6675281) sobre las variaciones en respuesta terapéutica tras 6 semanas de tratamiento en pacientes con un primer episodio de psicosis.

## **4. MATERIAL Y METODOS**



#### **4.1. Ámbito de estudio**

Los trabajos de investigación que constituyen objeto de esta tesis han sido llevados a cabo en el contexto del Programa de Atención a las Fases Iniciales de las Psicosis (PAFIP), que está en marcha en el Servicio de Psiquiatría del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Se trata de un programa de intervención clínica e investigación centrado en los primeros episodios de psicosis que se presentan en Cantabria. Sus objetivos son múltiples y abarcan tanto la prevención, como la atención sanitaria, como la investigación, de dicha patología. Desde el punto de vista de la prevención el programa incorpora estrategias de diagnóstico e intervención precoz así como de identificación de personas en riesgo. Desde el punto de vista asistencial puede ser definido como un “Programa de Atención Clínica as Usual” constituyendo la alternativa terapéutica que el Servicio de Psiquiatría oferta a dichos pacientes. Tiene como objetivo dar atención clínica personalizada, intensiva y multidisciplinar a dichos pacientes desde las fases tempranas de la enfermedad y durante el “periodo crítico” de la enfermedad, que se extiende durante los tres primeros años de su curso evolutivo. Persigue la recuperación psicopatológica y funcional precoz, la promoción de la adherencia y evitación de recaídas, la prevención de la discapacidad y el estigma y la reintegración social y laboral. Para ello incorpora una fase de intervención aguda intensiva precoz, que se extiende durante las seis primeras semanas y en la que el énfasis se hace sobre el tratamiento farmacológico y una fase de seguimiento a largo plazo que se prolonga durante los tres primeros años e incorpora además estrategias de intervención psicológica y social. Desde el punto de vista de la investigación el programa, que incorpora fundamentalmente estrategias de investigación clínica, neurocognitiva, de imagen cerebral, inmunológica y genética, persigue profundizar en el conocimiento del origen de la enfermedad y en los factores que condicionan su curso evolutivo y recuperación psicopatológica y funcional, investigando también la efectividad, aceptabilidad y relación coste-efectividad de las intervenciones y estructuras asistenciales que son utilizadas para su tratamiento.

Los estudios y proyectos de investigación del programa PAFIP, y que han sido incorporados en esta tesis, se realizaron de acuerdo a los estándares internacionales de ética en investigación clínica y fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación

Clínica (CEIC) de Cantabria. Tanto los pacientes como sus familiares dieron su consentimiento escrito para participar en las áreas de investigación del programa.

## **4.2. Poblaciones muestrales**

Los sujetos incorporados en los estudios presentados en esta tesis pertenecen a los dos grupos poblacionales constituidos por pacientes y controles sanos.

### **4.2.1. Muestra de pacientes**

La muestra de pacientes objeto de estudio está constituida por el conjunto de personas que, entre febrero de 2001 y febrero 2008, fueron referidos para tratamiento al programa PAFIP y cumplieron criterios de inclusión en el mismo. Los criterios de inclusión utilizados fueron los siguientes: 1) presentar un primer episodio de psicosis no afectiva; 2) cumplir criterios diagnósticos de esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno psicótico breve, trastorno esquizotípico de la personalidad o psicosis no especificada; 3) poseer una edad comprendida entre los 15 y los 65 años; 4) residir de manera habitual en Cantabria; 5) no haber recibido, con anterioridad a la inclusión en el programa, tratamientos con medicación antipsicótica durante más de 6 semanas; 6) presentar, en el momento de inclusión en el programa, síntomas psicóticos de gravedad entre moderada y severa, según al menos uno de los cinco ítems de la escala de síntomas positivos de Andreasen (1984).

Todos aquellos pacientes que, habiendo reunido los criterios previamente mencionados, presentaron un diagnóstico de retraso mental o de dependencia a sustancias diferentes a nicotina, según criterios DSM-IV, fueron derivados a sus centros de salud mental sin ser incluidos en el programa, tras recibir tratamiento durante la fase de intervención aguda y hasta la remisión sintomatológica.

Un total de 311 pacientes fueron incluidos en el programa PAFIP entre febrero 2001 y febrero 2008. De estos, 22 pacientes fueron posteriormente excluidos del estudio por no satisfacer el criterio diagnóstico a los 6 meses (según SCID-I), y 17 pacientes fueron excluidos de los estudios aquí presentados por ser pacientes de origen no caucásico, para evitar que diferencias genéticas de población pudiesen suponer un factor de

confusión. De esta forma la población objeto de estudio está compuesta de 272 sujetos de origen caucásico y residentes en Cantabria, con un primer episodio de psicosis no afectiva. De esta muestra de 272 pacientes, obtuvimos datos de los genotipados del gen *DISC1* de suficiente calidad para su estudio, en 226 casos. Así, la muestra final utilizada para los estudios presentados en esta tesis está constituida por 226 sujetos residentes en Cantabria y de origen caucásico, que presentaron un primer episodio de psicosis no afectiva.

Hay que señalar no obstante que en los estudios longitudinales, tanto de neuroimagen como de neurocognición, el tamaño muestral se vio disminuido debido a que se incluyeron en los análisis tan solo aquellos pacientes en los que se completaron, de forma satisfactoria, los estudios de neuroimagen (RM) basal y a los 3 años (N=79). Y los estudios de neurocognición basal y a los 3 años (N=133).

#### **4.2.2. Muestras de controles sanos**

El grupo poblacional de controles sanos está constituido por 142 sujetos sanos reclutados al azar como grupo control mediante anuncios en la comunidad. En su selección se hizo especial énfasis en detectar, para su exclusión del estudio, la presencia y/o antecedentes de historia de enfermedad psiquiátrica o neurológica incluyendo dependencia de sustancias y traumatismo craneoencefálico con pérdida de consciencia. Para ello todos los individuos fueron sometidos a una evaluación clínica y psicopatológica utilizando una versión abreviada de la escala CASH (Andreasen et al., 1992). Además se garantizó, mediante la adecuada recogida de información clínica, la ausencia de familiares de primer grado que padecieran o tuvieran antecedentes de haber padecido un cuadro psicótico.

En los estudios longitudinales de neuroimagen se incluyeron aquellos sujetos con al menos dos pruebas de RM con suficiente calidad para el procesamiento de las imágenes y que contasen con datos de calidad de genotipo *DISC1* (N = 22). De manera similar, en los estudios longitudinales de neurocognición se incluyeron aquellos que hubiesen completado las evaluaciones cognitivas basal y a los 3 años y que contasen con datos de calidad de genotipo *DISC1* (N = 21). Sin embargo, debido al número tan bajo de controles con las pruebas longitudinales y el genotipado completados los análisis de

comparación paciente-control de genotipos *DISC1* asociados a variaciones longitudinales de los endofenotipos no resultaron válidos. Todos los sujetos seleccionados como controles sanos para su inclusión en el estudio de investigación, después de haber sido debidamente informados, firmaron un consentimiento informado antes de la participación en el estudio de acuerdo con los criterios establecidos por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Cantabria.

Para evaluar la asociación de diferencias genotípicas del gen *DISC1* con el riesgo de padecer la enfermedad se amplió la muestra de controles sanos con sujetos procedentes del Banco de Sangre del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, hasta alcanzar una muestra de 303 sujetos sanos, sin antecedentes de enfermedad mental, y con datos del genotipado *DISC1* de calidad. Debido a la procedencia de dicho grupo tan solo la variable sociodemográfica “sexo” pudo ser incluida en el análisis comparativo. Todos los sujetos del grupo control firmaron un consentimiento informado para que su sangre pudiese ser genotipada y los datos utilizados para investigación, siguiendo para ello los criterios establecidos por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Cantabria.

### 4.3. Evaluación clínica

La estrategia de evaluación clínica incorporada en los estudios incluidos en esta tesis está basada en la aplicación de los siguientes instrumentos:

1. Versión española del *Brief Psychiatric Rating Scale* –BPRS– (Overall & Gorham, 1964). La escala BPRS hace una evaluación de las características de los principales síntomas psiquiátricos. La versión utilizada consta de 24 ítems, cada uno de los cuales se puntúa en una escala del 1 al 7, donde la puntuación 1 es equivalente a “ausencia del síntoma”, 2 “muy leve”, 3 “leve”, 4 “moderado”, 5 “moderadamente severo”, 6 “severo” y 7 “extremadamente severo”.
2. Versión española de la *Scale for the Assessment of Negative Symptoms* –SANS– (Andreasen, 1983). Dicha escala consta de cinco ítems que están relacionados con los síntomas de alogia, apatía, asociabilidad, aplanamiento afectivo y atención.
3. Versión española de la *Scale for the Assessment of Positive Symptoms* –SAPS– (Andreasen, 1984). Dicha escala consta de cinco ítems que están relacionados con

delirios, alucinaciones, conducta extravagante, trastornos formales del pensamiento y afecto inapropiado.

4. Versión española de la entrevista psiquiátrica SCID-I (*The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders*). Se trata de una entrevista psiquiátrica estructurada que permite diagnosticar los trastornos psiquiátricos incluidos en el Eje I del DSM-IV.

En los trabajos presentados en esta tesis se utilizaron, para medir la gravedad clínica de los pacientes, principalmente las puntuaciones de las escalas SAPS y SANS. Para obtener una medida más específica de la gravedad clínica psicótica se utilizaron también las puntuaciones de las dimensiones clínicas *positiva*, *negativa* y *desorganizada*, que pueden ser calculadas a partir de las escalas SANS y SAPS (Flaum et al., 1995; Grube et al., 1998). Así la puntuación correspondiente a la *dimensión positiva* resulta de la suma de las puntuaciones de los ítems “alucinaciones” y “delirios” de la escala SAPS; la puntuación de la *dimensión negativa* se calcula mediante la suma de los ítems SANS “alogia”, “apatía”, “asociabilidad” y “aplanamiento afectivo”; y la puntuación correspondiente a la *dimensión desorganizada* se obtiene a partir de la suma de las puntuaciones de los ítems “conducta extravagante”, “trastornos formales del pensamiento” y “afecto inapropiado”.

La evaluación clínica y la aplicación de todas las escalas fueron realizadas por el mismo psiquiatra, previamente entrenado en la utilización de los instrumentos de evaluación, tanto en el primer contacto de los pacientes con el programa como en las revisiones a las 6 semanas, 1 año y 3 años desde el inicio de tratamiento. El mismo psiquiatra confirmó el diagnóstico a los 6 meses del primer contacto a través de una entrevista psiquiátrica estructurada usando como ya se ha indicado la entrevista SCID-I (*The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders*).

El psiquiatra encargado de la evaluación clínica era ciego para el genotipado de los pacientes en el momento de realizar las distintas evaluaciones clínicas y diagnósticas.

#### 4.4. Definición de respuesta clínica

Para el estudio del endofenotipo clínico de respuesta al tratamiento psicofarmacológico se tuvo, en primer lugar, que establecer la definición de respondedor. Dado que la definición de respondedor ha de realizarse de una manera lo menos arbitraria posible, se eligió para ello una de las definiciones estándar más utilizadas y que está basada en la escala clínica BPRS (Crespo-Facorro et al., 2007b). Según esta definición, *respondedor* es aquel paciente que presenta una mejoría del 40% sobre la puntuación inicial.

*Respondedor (según BPRS):*

- Mejoría del 40% en la puntuación total de la escala

Sin embargo, esta definición tiene la limitación principal de que está basada en las variaciones clínicas medidas con una escala de psicopatología general, no siendo por lo tanto tan sensible para la clínica psicótica como la obtenida mediante otras escalas, como es el caso, por ejemplo, de las escalas SANS y SAPS. Por consiguiente, y para obtener una definición del endofenotipo *respondedor* más específica para trastorno psicótico, incluimos en este estudio las definiciones de respondedor diseñadas por nuestro grupo en estudios previos sobre farmacogenética en psicosis (Vázquez-Bourgon et al., 2010) en base a las escalas SAPS y SANS. Así, para obtener las definiciones de *respuesta en clínica positiva* y *respuesta en clínica negativa*, se utilizaron conjuntamente los 3 criterios siguientes:

*Respondedor para síntomas positivos (SAPS) y negativos (SANS):*

- Mejoría del 40% en la puntuación total de la escala y
- Puntuación total no sea superior a 8 puntos y
- Ningún ítem sea mayor o igual a 3.

La justificación para la selección de estos 3 criterios se basa en la experiencia clínica del equipo, y tiene como objetivo conseguir definiciones muy restrictivas y específicas de respuesta en pacientes con clínica psicótica.

Siguiendo las recomendaciones actuales para estudios de farmacogenética (Malhotra et al., 2004) utilizamos el fenotipo de respuesta temprana, por lo que la categorización de los pacientes en *respondedor* y *no respondedor* se realizó en base a las evaluaciones clínicas realizadas en el momento de la inclusión del paciente en el programa (basal) y a las 6 semanas de haberse iniciado el tratamiento farmacológico (ver apartado 4.3. Evaluación clínica). De esta manera, se consigue un mayor control sobre otros factores que pueden tener un efecto sobre la respuesta (ej., adherencia terapéutica, consumo de tóxicos, interacciones farmacológicas).

En segundo lugar, se incluyó también una definición longitudinal de respuesta, o “mejoría clínica”, la cual permitió medir el efecto del tratamiento expresado a través de los cambios en la gravedad clínica a lo largo del tiempo. Para ello utilizamos diferencias entre las puntuaciones basales obtenidas en las escalas clínicas de evaluación (BPRS, SAPS, SANS) y las obtenidas a las 6 semanas de haber iniciado el tratamiento antipsicótico.

Y por último, incorporamos al estudio una definición de *resistencia terapéutica*. Según esta definición, un paciente será identificado como *resistente* si ha precisado al menos dos cambios de fármaco antipsicótico, en cualquier momento del seguimiento clínico a 3 años, debido a no presentar una adecuada respuesta evaluada por un psiquiatra experto. Es preciso para considerar que no ha respondido a un fármaco que el paciente lo haya tomado en dosis en rango terapéutico y al menos durante 21 días.

#### **4.5. Variables sociodemográficas y premórbidas**

Para la recogida de información sociodemográfica se utilizó un cuestionario de variables sociodemográficas específicamente desarrollado para el estudio, el cual fue administrado por un miembro del equipo de investigación, tanto al paciente como a un familiar de referencia, en el momento de la inclusión del paciente en el estudio. El cuestionario recoge información relevante que incluye, entre otros, datos relacionados con: edad, sexo, años de educación, procedencia del medio urbano o rural, así como datos de convivencia y apoyo familiar.

Para la recogida de información premórbida se utilizó un cuestionario también desarrollado específicamente para el estudio, el cual fue administrado a los pacientes y familiares a lo largo de diferentes entrevistas realizadas por el equipo médico del programa PAFIP. La información recogida incluyó, fundamentalmente, la evaluación de los antecedentes psiquiátricos y de psicosis tanto en los pacientes como en los familiares, así como una evaluación de los síntomas y manifestaciones clínicas de inicio de la enfermedad.

La duración de la psicosis sin tratar (DUP) se definió como la duración en meses desde la aparición del primer síntoma psicótico que se mantuvo de forma continuada y el establecimiento de un tratamiento adecuado. La duración de la enfermedad sin tratar (DUI) se definió como la duración en meses desde la aparición del primer síntoma inespecífico relacionado con psicosis y que se dio asociado a un deterioro en el nivel de funcionamiento previo del paciente y el inicio de un adecuado tratamiento.

#### **4.6. Evaluación cognitiva**

La función cognitiva de los pacientes se evaluó en tres momentos: en el periodo inicial de la fase de contacto (evaluación basal), al año de seguimiento y a los 3 años de iniciarse el tratamiento. La evaluación cognitiva inicial (basal) se realizó una vez que la sintomatología psicótica aguda se había ya estabilizado, en la fase aguda inicial del tratamiento. De esta manera se trató de evitar la interferencia de la clínica aguda psicótica en la ejecución de los test cognitivos, facilitando además la consecución de un mayor nivel de colaboración de los pacientes. De media, la evaluación cognitiva basal se realizó 10 semanas después de iniciarse el tratamiento. La evaluación cognitiva se llevó a cabo por psicólogos expertos y debidamente entrenados en las pruebas utilizadas.

De acuerdo con Reichenberg (2010) idealmente una batería para la evaluación de déficit cognitivo de pacientes con esquizofrenia debe estar compuesta por tests de fácil administración y que evalúen de manera eficiente los dominios cognitivos afectados. Siguiendo este criterio, se diseñó una batería de tests neurocognitivos para examinar los dominios de función cognitiva que presumiblemente están alterados en las psicosis,

focalizando la atención en las medidas de: habilidad verbal general, atención, memoria verbal, memoria visual, función ejecutiva y destreza motora.

De entre todas las pruebas incluidas en la batería neurocognitiva de evaluación, se seleccionaron para los estudios de esta tesis un subconjunto de medidas para evaluar las siguientes áreas clave de funcionamiento cognitivo:

1. *Memoria verbal*: para cuya medida se utilizó el Rey Auditory Verbal Learning Test –RAVLT– (Rey, 1964), recuerdo diferido.
2. *Memoria visual*, para cuya evaluación se usó el Rey Complex Figure –RCF– (Osterrieth, 1944), reproducción diferida.
3. *Función ejecutiva*: para cuya evaluación se aplicó el Trail Making Test –TMT– (Reitan y Wolfson, 1985), tiempo para completar el TMT-B menos el tiempo para completar el TMT-A.
4. *Memoria de trabajo* : medida usando la Backward Digits Scale –WAIS III– (Wechsler, 1997), sub-puntuación total.
5. *Velocidad de procesamiento* : que fue medida mediante el subtest Digit Symbol del WAIS-III (Wechsler, 1997), puntuación total standard.
6. *Destreza motora*: para para cuya medida se usó el Grooved Pegboard Handedness –GP– (Lezak, 1995), tiempo para completar con la mano dominante.
7. *Atención*: que fue evaluada usando el Continuous Performance Test –CPT– (Cegalis y Bowlin, 1991), número total de respuestas correctas.
8. *Inteligencia pre-mórbida*: se calculó a partir del sub-test Vocabulario del WAIS-III (Wechsler, 1997).

#### **4.7. Adquisición de imágenes mediante resonancia magnética**

Las imágenes de resonancia magnética (RM) fueron adquiridas en el Departamento de Radiología y Neuroimagen del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, mediante un escáner 1.5 Tesla General Electric SIGNA System (GE Medical System, Milwaukee, WI). Con dicho instrumento se obtuvieron imágenes T1 tridimensionales adquiridas, usando una secuencia SPGR, en el plano coronal con los siguientes parámetros: TE= 5ms, TR=24ms, NEX=2, ángulo de rotación= 45 grados, FOV= 26x24x18.8 cm, y

matriz de 256x192x124. También se obtuvieron secuencias bidimensionales PD y T2, con los siguientes parámetros: 3.0 o 4.0 mm de grosor de los cortes coronales, TR= 3000ms, TE= 36 ms (para PD) y 96ms (para T2), NEX=1, FOV=26x26 cm, matriz=256x192.

#### **4.8. Procesamiento de imágenes**

Las imágenes de RM fueron procesadas, en el Laboratorio de Neuroimagen del programa PAFIP del Servicio de Psiquiatría, utilizando el software BRAINS2 (Andreasen et al., 1992b; Magnotta et al., 2002). Este programa ha sido desarrollado en la Universidad de Iowa durante los últimos 20 años habiendo sido posteriormente incorporado a nuestra Unidad. El análisis de las imágenes está compuesto, principalmente, de cuatro pasos que tienen como objetivo específico:

1. Alinear y co-registrar todas las secuencias a la misma orientación y resolución.
2. Realizar una clasificación del tejido cerebral.
3. Definir los bordes del cerebro y parcelarlo en subregiones y estructura.
4. Realizar mediciones del volumen y grosor cortical.

El procedimiento aplicado puede ser descrito de manera resumida como sigue:

1. Las imágenes T1 fueron espacialmente normalizadas y recolocadas en voxels de 1 mm lo cual permite que el eje cerebral antero-posterior sea realineado en paralelo a la línea que pasa por la comisura anterior y por la comisura posterior (ACPC), y la línea interhemisférica sea alineada en relación con los otros dos ejes;
2. Las imágenes PD y T2 fueron superpuestas a la imagen T1 espacialmente normalizada utilizando un programa automático de registro. Estas imágenes fueron sometidas a normalización espacial en el espacio de Talairach que permite generar medidas automáticas de los lóbulos frontal, parietal, temporal y occipital;
3. Posteriormente, utilizando las imágenes T1, PD y T2, se creó una imagen única segmentada mediante un análisis discriminante en el cual cada punto de la imagen es clasificado como sustancia gris (SG), sustancia blanca (SB) o

líquido cefalorraquídeo (LCR). A cada vóxel se le asigna un número de 8 bits indicando el contenido de tejido en el volumen parcial (10-70 para LCR, 70-190 para SG y 190-250 para SB). De esta forma, a cada vóxel se le asigna un valor que refleja la combinación relativa de SG, SB o LCR y que nos permite una corrección óptima del volumen parcial;

4. Finalmente, a partir de estas imágenes bidimensionales segmentadas, se generó una imagen tridimensional cerebral. Esta imagen clasificada atendiendo al tipo de tejido, SG, SB o LCR, es entonces utilizada para generar una superficie triangulada cortical que es el reflejo del centro paramétrico de la SG, 130, y que representará el contorno exterior del cerebro.

La superficie triangulada permite la reconstrucción tridimensional del cerebro y resulta de gran ayuda para la visualización general del recorrido de los surcos y de la morfología de los giros corticales. Dicha superficie triangulada es utilizada en el análisis morfológico cerebral como base para el cálculo del grosor cortical de SG y la superficie cortical de cada región. El grosor de la capa cortical se calcula como la mínima distancia entre el 100% de la superficie del triángulo de materia gris y el cociente entre el 50% de materia gris superficial y el 50% de materia blanca.

#### **4.9. Técnicas de genotipado**

El DNA fue extraído de células blancas periféricas de sangre venosa siguiendo un protocolo adecuadamente estandarizado.

Se seleccionaron 3 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs: Single Nucleotide Polymorphism) de interés del gen *DISC1* en base a su asociación previa con riesgo de presentar esquizofrenia o con diferencias en alguno de los endofenotipos de la enfermedad (ver apartado 1. Introducción). Así, los SNPs seleccionados para los estudios presentados en esta tesis fueron: el rs821616, el rs6675281, y el rs1000731. El rs821616 (A/T) está localizado en el exón 11 y consiste en un cambio de aminoácido de serina a cisteína; el rs6675281 (C/T), localizado en el exón 9, presenta una sustitución de aminoácido de leucina por fenilalanina. Y el rs1000731 (G/A, exón 9) es un SNP sinónimo, que combinado con el rs6675281 está incluido en un haplotipo previamente

descrito asociado con trastorno del espectro de la esquizofrenia -HEP1- (Hennah et al., 2005). Además, dos de los SNPs seleccionados para el estudio, el rs821616 y el rs6675281, han sido descritos previamente como funcionales (Leliveld et al., 2009; Eastwood et al., 2009).

Estos SNPs del gen *DISC1* fueron genotipados usando la técnica SNPlex (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La técnica de SNPlex (Applied Biosystems) permite el genotipado simultáneo de 48 SNPs por pocillo. La discriminación de los dos alelos de un SNP se lleva a cabo mediante una ligación específica de alelo (OLA), en la que se utilizan dos oligonucleótidos con el nucleótido del SNP en el extremo 3' y un oligonucleótido común que se une a la región adyacente al SNP. Los productos de la ligación se amplifican mediante una reacción de PCR múltiplex que utiliza como cebadores las secuencias universales presentes en los oligonucleótidos. Tras la reacción de PCR, los amplicones se hibridan a una mezcla de sondas fluorescentes (sondas ZipChute), complementarias a las secuencias ZipCode también presentes en los oligonucleótidos, y que muestran movilidades únicas y pre-optimizadas en una electroforesis capilar. La identificación de las sondas ZipCute que han hibridado se realiza en un analizador de DNA 3130xl (Applied Biosystems) y los resultados se analizan con el software GeneMapper 3.7.

Para facilitar el análisis estadístico y la comparación de los resultados con los estudios previos realizados sobre *DISC1* los sujetos fueron agrupados como portadores-Phe vs. homocigotos-Leu (Phe-Car vs Leu/Leu) para el rs6675281; portadores del alelo Cys vs. homocigotos del alelo Ser (Cys-Car vs Ser/Ser) para el rs821616; y homocigotos del alelo G vs portadores del alelo A (A-car vs G/G) para el rs1000731.

Las muestras biológicas fueron recogidas, tratadas y almacenadas siguiendo estrictamente los protocolos de calidad establecidos en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, y garantizando la seguridad y confidencialidad de los datos del donante. Las muestras biológicas fueron almacenadas, siguiendo un protocolo específico, en el Biobanco Marqués de Valdecilla del Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Todos los genotipados se hicieron de forma ciega, con las muestras de pacientes y de controles seleccionadas aleatoriamente.

#### 4.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el paquete estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS Inc, Chicago, Illinois). La descripción detallada del análisis estadístico utilizado en cada uno de los estudios incluidos en esta tesis se puede encontrar en la sección correspondiente de metodología que aparece en cada uno de ellos (ver apartado 6. Publicaciones). Sin embargo, a modo de resumen podemos decir de manera específica y en función del tipo de estudio, se adoptaron a nivel general las siguientes estrategias de análisis:

1. *Prueba de Chi-cuadrado de Pearson.*
2. *Prueba análisis de la varianza (ANOVA) y Prueba de análisis de la covarianza (ANCOVA).*
3. *ANCOVA de medidas repetidas.*

Para examinar si existían **diferencias en la distribución de genotipos** en variables sociodemográficas o clínicas, tanto en las comparaciones entre pacientes y controles o entre pacientes, se utilizó la prueba Chi-cuadrado de Pearson cuando las variables eran cualitativas; y la comparación de medias con la prueba análisis de la varianza (ANOVA) cuando las variables eran cuantitativas.

De la misma manera para comprobar si las frecuencias genotípicas de pacientes y controles se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó la prueba Chi-cuadrado de Pearson.

En los estudios de **morfología cerebral y funcionamiento cognitivo** se siguió una misma metodología estadística, basada en el estudio transversal y longitudinal de las variables principales, utilizando según procediera análisis como: análisis de covarianza o análisis de varianza de medidas repetidas:

- a. Así, para el análisis de las posibles diferencias entre genotipos en el grosor de la corteza cerebral o en el funcionamiento cognitivo en los **estudios transversales** (basal y tras tres años de tratamiento), se realizó un análisis de covarianza

(ANCOVA). De tal forma que, en cada Modelo Lineal General, las variables dependientes fueron las diferentes medidas cognitivas y las variables de grosor de corteza cerebral respectivamente, y las variables independientes fueron los genotipos. En estos análisis incluimos como co-variables aquellas medidas susceptibles de influir en el posible efecto del genotipo, como son el sexo, la edad, los años de educación y el IQ premórbido para los estudios de cognición y el sexo, la edad y el volumen intracraneal para los de corteza cerebral. Todas las comparaciones post-hoc fueron corregidas con Bonferroni.

- b. Y para investigar el efecto del genotipo de cada polimorfismo *DISC1* (rs6675281, rs1000731, rs821616) sobre la **evolución en el tiempo**, a largo plazo (3 años), tanto del funcionamiento cognitivo como del grosor de la corteza cerebral, se realizaron análisis de Modelo General Lineal (GLM) de medidas repetidas. Así, cada una de las variables cognitivas y morfológicas fueron estudiadas como variables dependientes, los grupos genotipos como variables inter-sujeto y el tiempo (basal, 3 años) como variable intra-sujeto. Además se examinaron los efectos del tiempo (dimensión longitudinal), y tiempo por grupo genotípico (efecto de la interacción). En los análisis longitudinales mencionados se incluyeron como covariables el sexo, la edad, los años de estudios y el IQ premórbido para el estudio sobre cognición; y el sexo, la edad y el volumen intracraneal en el estudio sobre grosor de corteza cerebral. De nuevo, todas las comparaciones post-hoc fueron corregidas con Bonferroni.

El tamaño del efecto (cuando fue preciso) fue calculado utilizando el test *d* de Cohen. Se implementó una corrección por comparaciones múltiples (cuando fue requerido) utilizando un método restrictivo en el cual el umbral de significación estadística estándar (0,05) fue dividido por el número de análisis estadísticos realizados (número de SNPs analizados, o número de tests cognitivos utilizados).

Por último, en el estudio **de la respuesta clínica** se siguió una estrategia de análisis estadístico en dos fases:

- a. En la primera y como medida primaria de *outcome* la respuesta clínica fue analizada como variable categórica. Para estos análisis se utilizó la prueba Chi-cuadrado de Pearson al comparar la frecuencia de genotipos en los grupos de pacientes definidos como respondedores y no respondedores, y de la misma manera entre pacientes resistentes y no resistentes.
- b. En la segunda fase, y como mecanismo de validación de posibles resultados positivos, la respuesta clínica fue evaluada como variable continua, utilizando la prueba de análisis de la covarianza de medidas repetidas. En dicho análisis se ajustó por posibles variables de confusión, como el sexo y la edad de inicio.



## **5. RESULTADOS**



---

Este capítulo de Resultados consta de tres apartados:

En el primer apartado (**5.1. Descripción de la población muestral**), se describen de forma concisa las características principales de la población sobre la que se han realizado los diferentes estudios científicos descritos en las publicaciones que componen esta tesis doctoral. Población que, como se ha indicado en el capítulo de Material y Métodos, pertenece al Programa de Atención a las Fases Tempranas (PAFIP).

En el segundo apartado (**5.2. Resultados de estudios ya publicados**) se realiza una descripción resumida de los principales resultados publicados en los artículos que componen esta tesis doctoral:

1. A *Disrupted-in-Schizophrenia 1* Gene Variant is Associated with Clinical Symptomatology in Patients with First-Episode Psychosis. Vázquez-Bourgon J, Mata I, Roiz-Santiáñez R, Ayesa-Arriola R, Suárez Pinilla P, Tordesillas-Gutiérrez D, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. *Psychiatry Investig.* 2014 Apr;11(2):186-91. doi: 10.4306/pi.2014.11.2.186.
2. Effect of *DISC1* polymorphisms on the long-term course of neurocognitive deficits in non-affective psychosis. Vázquez-Bourgon J, Ayesa-Arriola A, Fatjó-Vilas M, Roiz-Santiáñez R, Fañanás L, Crespo-Facorro B. *European Psychiatry.* 2015;30:861-867. doi: 10.1016/j.eurpsy.2015.07.007.
3. Variations in *Disrupted-in-Schizophrenia 1* gene modulate long-term longitudinal differences in cortical thickness in patients with a first-episode of psychosis. Vázquez-Bourgon J, Roiz-Santiáñez R, Papiol S, Ferro A, Varela-Gómez N, Fañanás L, Crespo-Facorro B. *Brain Imaging Behav.* 2015 Jul 26. [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s11682-015-9433-1.

En el tercer apartado (**5.3. Resultados de estudios que se encuentran en proceso de publicación**) se describen resultados, que se encuentran en el momento actual en proceso de publicación, sobre la relación de las variaciones en el gen *DISC1* y su posible efecto sobre la respuesta farmacológica en la psicosis no afectiva.

## **5.1. Descripción de la población muestral**

La muestra sobre la que se basan los trabajos incorporados en esta tesis procede del programa PAFIP y se compone de un total de 272 pacientes afectados de un primer episodio de psicosis no afectiva, y no tratados previamente (*drug-naïve*).

A continuación describimos las características sociodemográficas y clínicas más relevantes de la muestra en su conjunto, así como los valores relativos a los endofenotipos que se han estudiado.

### **5.1.1. Características sociodemográficas y consumo de sustancias**

La Tabla 1 resume de forma numérica las principales características sociodemográficas de la población de estudio, la cual presenta un ligero predominio de varones y una edad media global de 29,2 años (mediana: 27,4; min-Máx.: 15,4-57,8).

Tabla 1. Características sociodemográficas principales

Características sociodemográficas		N	%
Sexo	Varón	157	57,7
	Mujer	115	42,3
Lateralidad	Diestro	121	91,0
	Zurdo	8	6,0
	Ambidiestro	4	3,0
Nivel académico	Estudios primarios	129	47,4
	Estudios medios	104	38,2
	Estudios superiores	39	14,3
Estado civil	Soltero	211	77,6
	Pareja estable	42	15,4
	Separado/Divorciado	19	7,0
Apoyo	Sí	93	35,8
	No	167	64,2
Convive	Solo	42	15,4
	Pareja	43	12,1
	Padres	149	54,8
	Otros familiares	19	7,0
	Otros	19	7,0
Habita zona	Rural	69	25,5
	Urbana	202	74,5
Ocupación	Estudiante	42	16,7
	Ocupado	78	31,0
	Incapacidad Temporal	7	2,8
	Desempleado	112	44,5
	Pensión incapacidad	1	0,4
	Pensión viudedad/orfandad	1	0,4
	Tareas hogar	11	4,4
Nivel académico	Estudios primarios	129	47,4
	Estudios medios	104	38,2
	Estudios superiores	39	14,3
Fuente ingresos	Salario-Desempleo	111	42,4
	Pensión	3	1,1
	Dependencia familiar	143	54,6
	Otros	5	1,9

Como se aprecia en la tabla 2 el consumo de sustancias, tanto legales como ilegales, es relativamente alto en la muestra estudiada. Dentro de dicho consumo es de destacar el consumo de cannabis, no solo por su elevada frecuencia, sino también por la edad media de inicio tan baja que presentan los pacientes consumidores en nuestra muestra.

**Tabla 2. Consumo de tóxicos**

Sustancia	Si	Esporádico	No	Edad inicio (años)
	N (%)	N (%)	N (%)	Media (min-Máx.)
Tabaco	158 (58,1)	1 (0,4)	113 (41,5)	16,0 (8-21)
Alcohol	85 (31,4)	63 (23,2)	123 (45,4)	15,8 (12-19)
Cannabis	108 (39,7)	10 (3,7)	154 (56,6)	17,2 (12-38)
Cocaína	22 (8,1)	36 (13,2)	214 (78,7)	18,5 (12-23)
Anfetaminas	10 (3,7)	17 (6,3)	245 (90,1)	17,6 (12-20)
Alucinógenos	7 (2,6)	11 (4,0)	254 (93,4)	16,5 (12-20)

### 5.1.2. Características clínicas basales

Los diagnósticos (DSM-IV) fueron confirmados, tras 6 meses de seguimiento clínico, a través de una entrevista semi-estructurada (SCID-I). En la tabla 3 vemos la relación de diagnósticos de la muestra, siendo el más frecuente el de esquizofrenia, con 158 casos (58%).

**Tabla 3. Frecuencia diagnóstica**

Diagnóstico	N	%
Esquizofrenia	158	58,1
Tr. Psicótico breve	23	8,5
Tr. Psicótico no especificado	17	6,3
Tr. Esquizofreniforme	67	24,6
Tr. Esquizoafectivo	5	1,8
Tr. Delirante	2	0,7

De estos pacientes tan solo 9 (3,6%) estaban ya en tratamiento antipsicótico en el momento de ser incluidos en el programa, siendo la media de tiempo que llevaban tomando el tratamiento de 2,3 semanas (mediana: 1 semana; min-Máx.: 1-6 semanas).

Los pacientes presentaron una edad media de inicio de la enfermedad de 27,8 años (ver tabla 4), con duraciones de la psicosis sin tratar (DUP) medias de 14,4 meses. Vemos además que presentaban, en el momento de su inclusión en el programa, y por tanto en el momento del inicio del tratamiento, una gravedad clínica alta, medida por las escalas BPRS, SAPS y SANS.

**Tabla 4. Características clínicas de presentación y gravedad basal**

<b>Características</b>	<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>min-Máx</b>
Edad de inicio (años)	27,8	26,2	14,8-55,8
DUP (meses)	14,4	4	0,2-288
DUI (meses)	29,5	12,5	0,2-288
BPRS	61,2	60,0	32-106
SAPS	13,2	13,0	4-25
SANS	7,3	5,5	0-25
Dimensión positiva	7,4	7,0	2-10
Dimensión negativa	5,6	4,0	0-20
Dimensión desorganizada	5,8	5,0	0-15

### 5.1.3. Medidas de estructura cerebral

La tabla 5 resume las principales medidas relativas a la estructura cerebral de los pacientes, centrándose como vemos en el volumen intracraneal y el grosor cortical en el momento de su inclusión en el programa.

**Tabla 5. Medidas basales de corteza cerebral**

Medidas cerebrales	Media	Mediana	min-Máx
Volumen intracraneal	1374,83	1381,70	1047,71-1747,97
Grosor cortical total	3,979	3,918	3,110-4,890
Grosor cortical frontal	4,217	4,149	3,048-5,324
Grosor cortical occipital	3,170	3,149	2,529-4,243
Grosor cortical parietal	3,712	3,669	3,051-4,808
Grosor cortical temporal	4,234	4,168	3,458-5,600

### 5.1.4. Medidas de funcionamiento neurocognitivo

La tabla 6 resume las principales medidas relativas al funcionamiento cognitivo basal, centrándose como vemos en aquellas que han sido identificadas como más relevantes para el estudio de la etiopatogenia y el análisis del curso evolutivo de estos pacientes.

**Tabla 6. Medidas basales de funcionamiento cognitivo**

Dominio cognitivo	Prueba cognitiva*	Media	Mediana	min-Máx
Memoria verbal	RAVLT	7,29	7,00	0-15
Memoria visual	RCF	18,42	18,50	2,00-32,50
Inteligencia pre-mórbida	WAIS vocabul.	8,94	9,00	1-19
Memoria de trabajo	WAIS dig. inversos	5,49	6,00	2-13
Función ejecutiva	TMTb-TMTa	56,99	44,00	(-)68-255
Velocidad de procesamiento	WAIS clave num.	6,59	6,00	1-13
Atención	CPT	69,50	76,00	12-80
Destreza motora	GPO	71,16	66,00	43-347

\* Para descripción de las pruebas ver Apartado 4.6. Evaluación cognitiva.

### 5.1.5. Frecuencias genotípicas y alélicas. Riesgo de psicosis

Las tablas 7, 8, y 9 muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos, rs1000731, rs6675281 y rs821616 respectivamente, tanto para los pacientes de la muestra de estudio como de los controles sanos reclutados para explorar el posible efecto del gen *DISC1* sobre el riesgo de psicosis.

Según estos resultados las frecuencias alélicas y genotípicas fueron las esperadas para la población étnica estudiada (de acuerdo con HapMap población CEU; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Además, en base a estas frecuencias genotípicas pudimos confirmar que tanto los pacientes como los controles se encontraban en Equilibrio Hardy-Weinberg para los tres SNPs estudiados.

No encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa al comparar las frecuencias genotípicas o alélicas entre pacientes y controles sanos (todas las  $p > 0,05$ ; ver tablas 7, 8, y 9) por lo que podemos concluir que ninguno de los tres polimorfismos del gen *DISC1* estudiados en esta tesis doctoral representan un factor de riesgo para presentar un trastorno psicótico del espectro de la esquizofrenia en esta población caucásica.

**Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo rs1000731**

	<b>Paciente</b>	<b>Control</b>	<b>Estadística</b>
	N (%)	N (%)	$\chi^2$ ; p
<i>Genotipo</i>			
A/A	6 (2,7)	8 (2,6)	0,244; 0,855
A/G	71 (31,4)	103 (33,4)	
G/G	149 (65,9)	197 (64,0)	
<i>Genotipo agrupado</i>			
A/-	77 (34,1)	111 (36,0)	0,221; 0,638
<i>Alelo</i>	%	%	
A	0,18	0,19	0,155; 0,694
G	0,82	0,81	

**Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo rs6675281**

	<b>Paciente</b>	<b>Control</b>	<b>Estadística</b>
	N (%)	N (%)	$X^2$ ; p
<i>Genotipo</i>			
C/C	179 (79,2)	247 (78,7)	0,591; 0,744
C/T	44 (19,5)	60 (19,1)	
T/T	3 (1,3)	7 (2,2)	
<i>Genotipo agrupado</i>			
T/-	47 (20,8)	67 (21,3)	0,023; 0,879
<i>Alelo</i>	%	%	
C	0,89	0,88	0,135; 0,713
T	0,11	0,12	

**Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo rs821616\***

	<b>Paciente</b>	<b>Control</b>	<b>Estadística</b>
	N (%)	N (%)	$X^2$ ; p
<i>Genotipo</i>			
A/A	14 (6,6)	26 (8,6)	2,038; 0,361
A/T	91 (42,7)	112 (37,0)	
T/T	108 (50,7)	165 (54,5)	
<i>Genotipo agrupado</i>			
T/-	199 (93,4)	277 (91,4)	0,705; 0,401
<i>Alelo</i>	%	%	
A	0,28	0,27	0,095; 0,758
T	0,72	0,73	

\*Datos ya presentados en la publicación 1 (Vázquez-Bourgon et al., 2014)

## 5.2. Resultados de estudios ya publicados

En este apartado se describen de manera concisa los resultados de los trabajos que, centrados en el tema objeto de estudio, han permitido elaborar las publicaciones que constituyen la parte central de esta tesis doctoral. La visión completa de dichas publicaciones y de sus resultados se recoge en el apartado 6 (Publicaciones).

### 5.2.1. Publicación 1: Asociación de una variación en el gen *Disrupted-in-Schizophrenia 1* con sintomatología clínica en pacientes con un primer episodio de psicosis.

*A Disrupted-in-Schizophrenia 1 Gene Variant is Associated with Clinical Symptomatology in Patients with First-Episode Psychosis. Vázquez-Bourgon J, Mata I, Roiz-Santiáñez R, Ayesa-Arriola R, Suárez Pinilla P, Tordesillas-Gutiérrez D, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Psychiatry Investig. 2014 Apr;11(2) :186-91. doi: 10.4306/pi.2014.11.2.186.*

El objetivo de este estudio fue analizar la posible relación entre el gen *Disrupted-in-Schizophrenia 1* y la presentación clínica de un primer episodio psicótico, tanto a nivel de gravedad psicopatológica como a nivel de otras variables clínicas y sociodemográficas de gran relevancia en la enfermedad. Para esto se estudió una muestra de 213 pacientes caucásicos con un primer episodio de psicosis no afectiva, a los que se les realizó en el momento del primer contacto con el programa una evaluación psicopatológica exhaustiva, incluyendo entre otras las escalas psicopatológicas BPRS, SANS y SAPS. Además se realizaron técnicas de genotipado para el polimorfismo rs821616 (Ser704Cys) del gen *DISC1*. De la misma forma se genotiparon muestras sanguíneas de un grupo control (N=303) obtenido del Banco de Sangre del HUMV.

Como punto de partida se exploró la posible relación entre el gen *Disrupted-in-Schizophrenia 1*, con el riesgo de padecer un trastorno psicótico del espectro de la esquizofrenia. En contraposición de los datos obtenidos previamente en otras

poblaciones en nuestro estudio no se observó un mayor riesgo de padecer psicosis asociado a este polimorfismo (Alélico:  $X^2=0,09$ ;  $p=0,76$ ; Genotípico:  $X^2=2,04$ ;  $p=0,36$ ). Tampoco se observaron asociaciones entre este polimorfismo y variables clínicas significativas, como la edad de inicio de la enfermedad o la DUP (todas las  $F \leq 1,80$ ; todas las  $p \geq 0,18$ ), ni con otras variables sociodemográficas como el sexo o la edad (todas las  $X^2 \leq 3,52$ ; todas las  $p \geq 0,08$ ).

Al estudiar la posible relación entre el polimorfismo rs821616 y la gravedad en la presentación clínica, a través del análisis de las puntuaciones en las escalas SANS y SAPS, no encontramos ninguna relación significativa (todas las  $F \leq 1,06$ ; todas las  $p \geq 0,30$ ). Sin embargo, al profundizar en dicho análisis y estudiar la gravedad psicopatológica de una manera más específica, a través del uso de dimensiones psicopatológicas, encontramos que el alelo Ser contribuía significativamente a la gravedad de la sintomatología psicótica positiva, presentado aquellos pacientes homocigotos para el alelo Ser del rs821616 una mayor gravedad en la *dimensión positiva* que los pacientes portadores del alelo Cys ( $F=6,85$ ;  $p=0,009$ ). Pero además, al analizar por separado los ítems (síntomas) que componen la *dimensión positiva* (i.e. alucinaciones y delirios) encontramos que el rs821616 se asociaba a diferencias en la severidad de las alucinaciones ( $F=5,75$ ;  $p=0,017$ ).

### 5.2.2. Publicación 2: Efecto de polimorfismos *DISC1* sobre el curso a largo plazo de déficits neurocognitivos en psicosis no afectiva.

*Effect of DISC1 polymorphisms on the long-term course of neurocognitive deficits in non-affective psychosis. Vázquez-Bourgon J, Ayesa-Arriola A, Fatjó-Vilas M, Roiz-Santiañez R, Fañanás L, Crespo-Facorro B. European Psychiatry. 2015;30:861-867. doi: 10.1016/j.eurpsy.2015.07.007.*

En este estudio se investiga la posible influencia de polimorfismos del gen *DISC1* sobre el déficit neurocognitivo que suele ir acompañando a los cuadros psicóticos del espectro de la esquizofrenia. De forma concreta se explora en él si el gen *DISC1* modula el curso de estos déficits a largo plazo (3 años).

Ciento treinta y tres pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva fueron sometidos a técnicas de genotipado del gen *DISC1* y completaron una batería neurocognitiva a nivel basal y a los 3 años de seguimiento. Esta batería neuropsicológica se diseñó de tal forma que analizase los principales dominios cognitivos normalmente afectados en la esquizofrenia. Para evitar los efectos de confusión derivados del tratamiento así como de la sintomatología psicótica presente en la fase aguda del cuadro clínico, la evaluación basal se realizó una vez controlada la sintomatología aguda, 10 semanas de media tras entrar en el programa.

Se seleccionaron tres polimorfismos del gen *DISC1*, en función de los datos publicados previamente, y se exploró su grado de asociación con la cognición en los pacientes con psicosis. Estos SNPs fueron el rs821616 (Ser704Cys), rs6675281 (Phe607Cys), y rs1000731. Los pacientes se agruparon en función de estar o no en posesión del alelo de riesgo para cada polimorfismo: rs821616 (AA vs. T/-); rs6675281 (CC vs. T/-); rs1000731 (GG vs. A/-). Las frecuencias genotípicas de los pacientes para los polimorfismos examinados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tanto las frecuencias alélicas como genotípicas fueron las esperadas para la población étnica estudiada. No se hallaron diferencias en ninguna de las variables sociodemográficas en base a los genotipos *DISC1* (todas las  $p > 0,05$ ).

En primer lugar estudiamos el posible efecto de los polimorfismos del gen *DISC1* sobre la variación a largo plazo (3 años) en el funcionamiento neurocognitivo de los pacientes. En este sentido encontramos que el polimorfismo rs1000731 modulaba el curso del déficit neurocognitivo presente al inicio de la enfermedad, de tal forma que la presencia o no del alelo A determinaba una diferente evolución a largo plazo en el funcionamiento de los dominios cognitivos *memoria de trabajo* ( $F=7,781$ ;  $df=1$ ;  $p=0,006$ ;  $d_{Cohen}=0,599$ ) y *atención* ( $F=14,451$ ;  $df=1$ ;  $p<0,001$ ;  $d_{Cohen}=0,714$ ).

Con respecto al polimorfismo rs821616 encontramos una relación con el curso a largo plazo del funcionamiento del dominio *destreza motora* en los pacientes ( $F=11,129$ ;  $df=1$ ;  $p=0,001$ ;  $d_{Cohen}=0,450$ ), de tal forma que los pacientes homocigotos para el alelo A (Ser) presentaban una mejor evolución en este dominio tras 3 años de tratamiento.

Contrariamente a lo esperado no encontramos ninguna relación entre el curso en el funcionamiento cognitivo y el polimorfismo rs6675281.

Posteriormente se exploró si existía alguna relación entre los polimorfismos y la evaluación neurocognitiva de forma transversal al inicio del tratamiento y tras 3 años de seguimiento. Encontramos que el polimorfismo rs1000731 del gen *DISC1* modulaba el funcionamiento neurocognitivo de los pacientes con un primer episodio psicótico al inicio del tratamiento, concretamente en los dominios cognitivos *memoria de trabajo* ( $F=6,827$ ;  $df=1$ ;  $p=0,010$ ;  $d_{Cohen}=-0,548$ ) y *atención* ( $F=9,033$ ;  $df=1$ ;  $p=0,003$ ;  $d_{Cohen}=-0,619$ ). Sin embargo esta relación no existía tras 3 años de tratamiento.

Con relación al polimorfismo rs821616, encontramos también una asociación al funcionamiento neurocognitivo basal aunque no a los 3 años de tratamiento. Así, al inicio del tratamiento, los pacientes con un primer episodio de psicosis homocigotos para el alelo Ser (A), presentaban un peor funcionamiento en el dominio *destreza motora* que el resto de pacientes ( $F=8,246$ ;  $df=1$ ;  $p=0,005$ ;  $d_{Cohen}=0,406$ ).

**5.2.3. Publicación 3: Variaciones en el gen *Disrupted-in-Schizophrenia 1* modulan las diferencias longitudinales de la corteza cerebral a largo plazo en pacientes con un primer episodio de psicosis.**

*Variations in Disrupted-in-Schizophrenia 1 gene modulate long-term longitudinal differences in cortical thickness in patients with a first episode of psychosis. Vázquez-Bourgón J, Roiz-Santiañez R, Papiol S, Ferro A, Varela-Gómez N, Fañanás L, Crespo-Facorro B. Brain Imaging Behav. 2015 Jul 26. [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s11682-015-9433-1.*

El objetivo de este estudio fue analizar el posible efecto del gen *DISC1* sobre la variación a largo plazo (3 años) de la estructura cerebral, en concreto del grosor de la corteza cerebral, en pacientes con un primer episodio psicótico. Con este fin, setenta y nueve pacientes de origen caucásico y que presentaban un primer episodio psicótico no afectivo, fueron sometidos al genotipado de polimorfismos del gen *DISC1* y se sometieron a pruebas de RMN en la fase basal y tras 3 años de recibir tratamiento.

Los pacientes fueron sometidos al genotipado de los polimorfismos rs821616 y rs6675281, y agrupados en función del alelo de riesgo de cada polimorfismo: portadores Phe vs homocigotos Leu para el rs6675281; portadores Cys versus homocigotos Ser para el rs821616)

Los pacientes se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados. Además las frecuencias alélicas y genotípicas fueron las esperadas para la población étnica estudiada (de acuerdo con HapMap población CEU; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

No encontramos relación entre los genotipos y las variables sociodemográficas y clínicas relevantes y en algún caso subsidiarias de representar posibles factores de confusión en este estudio como son la edad, el sexo, la edad de inicio, la lateralidad, el volumen intracraneal, el nivel de educación, el consumo de alcohol y cannabis, la DUP, la DUI, la dosis acumulada equivalente de clorpromazina, o la gravedad de la clínica

psicótica (BPRS, SANS, y SAPS) (todas las  $F \leq 2,26$  y las  $p \geq 0,14$ ; y todas las  $X^2 \leq 4,58$  y las  $p \geq 0,10$ ).

En un primer momento estudiamos la posible relación entre el gen *DISC1* y el patrón de variación a largo plazo en el grosor de la corteza cerebral. Para ello analizamos tanto el grosor de la corteza cerebral globalmente como en los diferentes lóbulos (frontal, parietal, temporal, y occipital). Así encontramos que el polimorfismo rs6675281 se relaciona con un distinto curso evolutivo a largo plazo (3 años) valorado tanto en función del grosor de la corteza medido a nivel globalmente ( $F=8,812$ ;  $p=0,004$ ) como más específicamente en los lóbulos frontal ( $F=7,669$ ;  $p=0,007$ ) y temporal ( $F=11,510$ ;  $p=0,001$ ). Así, aquellos pacientes homocigotos para el alelo Leu presentaban un adelgazamiento de las cortezas en esas áreas mientras que los pacientes portadores de alelo Phe presentaban un incremento de grosor.

Respecto al polimorfismo rs821616 no encontramos ninguna relación entre variaciones en el cambio de grosor en la corteza cerebral y el polimorfismo rs821616 en solitario. Sin embargo, cuando combinamos este polimorfismo con el rs66785281 observamos un efecto sinérgico por el cual aquellos pacientes homocigotos para alguno de los alelos de riesgo de uno o ambos polimorfismos presentaban una peor evolución de la corteza cerebral a largo plazo que aquellos que no presentaban homocigosis para ninguno de los alelos de riesgo. Este efecto sinérgico se manifestó en el grosor de la corteza cerebral globalmente ( $F=3,99$ ;  $p=0,025$ ), así como en el de los lóbulos frontal ( $F=3,67$ ;  $p=0,032$ ) y temporal ( $F=4,73$ ;  $p=0,013$ ).

Posteriormente analizamos la posible existencia de asociación entre estos polimorfismo del gen *DISC1* y diferencias estructurales cerebrales de forma transversal, al inicio del tratamiento y a los 3 años de tratamiento. Contrariamente a lo esperado, no encontramos ninguna relación entre los genotipos del gen *DISC1* y diferencias en el grosor de la corteza cerebral ni basales (todas las  $F \leq 2,67$ ; todas las  $p \geq 0,1$ ) ni tras 3 años de tratamiento (todas las  $F \leq 1,21$ ; todas las  $p \geq 0,3$ ).

### 5.3. Resultados de estudios en proceso de publicación

Como complemento a los resultados publicados en los 3 artículos mencionados en el apartado anterior, y para completar el estudio del efecto del gen *DISC1* sobre la esquizofrenia a través de sus endofenotipos, se ha realizado un estudio de farmacogenética del gen *DISC1* en la misma muestra de pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva, cuyos resultados se describen a continuación.

#### 5.3.1. Variaciones del gen *DISC1* y su implicación en la respuesta farmacológica.

Se analiza en este trabajo de manera específica la posible relación de las variaciones en este gen con la respuesta clínica al tratamiento farmacológico antipsicótico.

Se seleccionaron para este estudio, procedentes del programa PAFIP, un total de 222 pacientes de origen caucásico con un primer episodio psicótico no afectivo y que no habían recibido tratamiento antipsicótico previo. Dichos pacientes fueron asignados, de forma aleatoria y ciega, a una de las seis líneas diferentes de tratamiento antipsicótico (i.e.: haloperidol; olanzapina; risperidona; aripiprazol; quetiapina; ziprasidona). Los pacientes fueron sometidos al genotipado de los siguientes polimorfismos del gen *DISC1*: rs6675281, rs821616, y rs1000731. La evolución de los pacientes fue realizada por un psiquiatra experto, y ciego al genotipado, en el momento del primer contacto con el programa (basal), y tras 6 semanas de comenzar el tratamiento antipsicótico.

Para este estudio se utilizaron 3 definiciones de respuesta a tratamiento antipsicótico. Una primera, definida como estándar, en la que el punto de corte era un descenso de al menos un 40% de la escala BPRS a las 6 semanas (Crespo-Facorro et al., 2007). Y dos definiciones más específicas del endofenotipo de respuesta terapéutica en clínica psicótica, basadas en las escalas SAPS y SANS respectivamente (Vázquez-Bourgon et al., 2010). Para estas dos últimas definiciones de respuesta en clínica negativa y positiva se utilizaron los siguientes tres criterios: a.- reducción de al menos el 40% de la

puntuación basal; b.- una puntuación final menor de 8; y c.- ningún ítem final con puntuación de 3 o más.

Además se incluyó en el estudio la variable de *Resistencia al tratamiento antipsicótico*. En dicha variable se consideró como *resistente* todo aquel paciente que, habiendo recibido tratamiento antipsicótico a dosis terapéuticas correctas y durante un mínimo de 21 días, no respondió al tratamiento, requiriendo al menos dos cambios de tratamiento. Con el uso de esta definición se pretende medir el posible efecto del gen *DISC1* sobre uno de los extremos del endofenotipo farmacogenético de respuesta terapéutica. Ello permite que se incremente la posibilidad de encontrar asociaciones en el caso de que este gen tenga un efecto sobre este endofenotipo.

De la muestra inicial de 220 pacientes se obtuvieron datos con suficiente calidad tanto en lo que concierne a la clínica basal y a las seis semanas como al genotipado de los polimorfismos indicados, en: 190 casos para el rs1000731; 188 para el rs6675281, y; 180 para el rs821616.

Los pacientes fueron agrupados, siguiendo la estrategia metodológica de estudios previos, y para permitir comparaciones con los mismos, en base al alelo de riesgo de cada polimorfismo, de la siguientes manera: portadores Phe vs homocigotos Leu para el rs6675281; portadores Cys versus homocigotos Ser para el rs821616, y; homocigotos G vs portadores del alelo A para el rs1000731.

Desde el punto de vista del análisis estadístico se utilizaron dos tipos de estrategia. En primer lugar se aplicó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson para estudiar posibles diferencias en la distribución de genotipos o en las frecuencias alélicas entre respondedores y no respondedores, así como entre pacientes resistentes y no resistentes. En segundo término, para estudiar el posible efecto de este gen sobre las variaciones longitudinales de la gravedad clínica (mejoría clínica) utilizamos la prueba Modelo General Lineal (GLM) de medidas repetidas. Así, cada una de las variables de gravedad clínica (BPRS, SAPS, SANS, y las 3 dimensiones clínicas SAPS-SANS) fueron estudiadas como variables dependientes, los grupos genotipos como variables inter-sujeto y el tiempo (basal, 6 semanas) como variable intra-sujeto. Además se examinaron

los efectos del tiempo (dimensión longitudinal), y tiempo por grupo genotípico (efecto de la interacción). Se incluyeron como covariables el sexo y la edad.

Los pacientes estaban en equilibrio Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados. No se encontró en la muestra estudiada ninguna asociación entre los genotipos y variables clínicas que podrían representar factores de confusión en el análisis de la respuesta terapéutica, como son el sexo, la edad de inicio, la DUP, o el consumo de cannabis.

Las tablas 10, 11 y 12 muestran los resultados de analizar la relación entre los polimorfismos del gen *DISC1* y la respuesta terapéutica al tratamiento antipsicótico siguiendo las 3 definiciones de respuesta propuestas.

Como se puede apreciar, tan solo encontramos una asociación estadística significativa entre el genotipo del polimorfismo rs1000731 y la respuesta en clínica negativa, basada en la escala SANS ( $\chi^2=4,019$ ;  $p=0,032$ ) (ver tabla 10). Así los pacientes no respondedores (sintomatología negativa) eran más frecuentemente homocigotos para el alelo G. Esta diferencia en la distribución genotípica no fue confirmada al estudiar la frecuencia de los alelos de este genotipo (G y A), siendo la distribución de alelos entre pacientes respondedores y no respondedores similar.

Tabla 10. Respuesta a corto plazo (6 semanas) en función del polimorfismo rs1000731

	Respuesta BPRS			Respuesta SAPS			Respuesta SANS		
	Respuesta N (%)	No respuesta N (%)	Estadística $\chi^2$ ; p	Respuesta N (%)	No respuesta N (%)	Estadística $\chi^2$ ; p	Respuesta N (%)	No respuesta N (%)	Estadística $\chi^2$ ; p
<i>Genotipo</i>									
A/A	3 (0,03)	1 (0,01)	0,711; 0,701	3 (0,03)	1 (0,01)	1,130; 0,568	2 (0,03)	2 (0,02)	4,020; 0,134
A/G	39 (0,35)	24 (0,32)		38 (0,35)	25 (0,31)		32 (0,41)	31 (0,28)	
G/G	69 (0,62)	54 (0,67)		67 (0,62)	56 (0,68)		44 (0,56)	79 (0,70)	
<i>Genotipo agrupado</i>									
A/-	42 (0,38)	26 (0,33)	0,404; 0,316	41 (0,61)	26 (0,32)	0,799; 0,230	34 (0,44)	33 (0,30)	<b>4,019; 0,032</b>
<i>Alelo</i>									
A	45 (0,20)	27 (0,17)	0,522; 0,469	44 (0,20)	27 (0,16)	0,937; 0,333	36 (0,23)	37 (0,16)	2,684; 0,101
G	177 (0,80)	129 (0,83)		172 (0,80)	137 (0,84)		120 (0,77)	189 (0,84)	

Tabla 11. Respuesta a corto plazo (6 semanas) en función del polimorfismo rs6675281

	Respuesta BPRS			Respuesta SAPS			Respuesta SANS		
	Respuesta	No respuesta	Estadística	Respuesta	No respuesta	Estadística	Respuesta	No respuesta	Estadística
	N (%)	N (%)	$\chi^2$ ; p	N (%)	N (%)	$\chi^2$ ; p	N (%)	N (%)	$\chi^2$ ; p
<i>Genotipo</i>									
C/C	93 (0,82)	56 (0,76)	1,481; 0,477	89 (0,82)	61 (0,76)	1,451; 0,484	64 (0,82)	85 (0,78)	0,541; 0,763
C/T	18 (0,16)	17 (0,23)		18 (0,17)	17 (0,21)		13 (0,17)	22 (0,20)	
T/T	2 (0,02)	1 (0,01)		1 (0,01)	2 (0,03)		1 (0,01)	2 (0,02)	
<i>Genotipo agrupado</i>									
T/-	20 (0,18)	18 (0,24)	1,212; 0,180	19 (0,18)	19 (0,24)	1,080; 0,196	14 (0,18)	24 (0,22)	0,524; 0,296
<i>Alelo</i>									
C	204 (0,90)	129 (0,87)	0,882; 0,348	196 (0,91)	139 (0,87)	1,414; 0,234	143 (0,91)	192 (0,88)	0,558; 0,455
T	22 (0,10)	19 (0,13)		20 (0,09)	21 (0,13)		15 (0,09)	26 (0,12)	

Tabla 12. Respuesta a corto plazo (6 semanas) en función del polimorfismo rs821616

	Respuesta BPRS			Respuesta SAPS			Respuesta SANS		
	Respuesta N (%)	No respuesta N (%)	Estadística $\chi^2$ ; p	Respuesta N (%)	No respuesta N (%)	Estadística $\chi^2$ ; p	Respuesta N (%)	No respuesta N (%)	Estadística $\chi^2$ ; p
<i>Genotipo</i>									
A/A	6 (0,06)	5 (0,07)	0,054; 0,973	5 (0,05)	6 (0,08)	0,559; 0,756	5 (0,07)	6 (0,06)	0,151; 0,927
A/T	46 (0,45)	33 (0,44)		45 (0,45)	35 (0,44)		32 (0,44)	49 (0,46)	
T/T	51 (0,49)	37 (0,49)		51 (0,50)	38 (0,48)		36 (0,49)	52 (0,48)	
<i>Genotipo agrupado</i>									
T/-	97 (0,94)	70 (0,93)	0,818; 0,528	96 (0,95)	73 (0,92)	0,540; 0,334	68 (0,93)	101 (0,94)	0,117; 0,483
<i>Alelo</i>									
A	58 (0,28)	43 (0,29)	0,011; 0,916	55 (0,27)	47 (0,30)	0,277; 0,599	42 (0,29)	61 (0,29)	0,003; 0,956
T	148 (0,72)	107 (0,71)		147 (0,73)	111 (0,70)		104 (0,71)	153 (0,71)	

Se ha analizado también en este estudio el posible efecto de las variaciones en el gen *DISC1* sobre la variación clínica tras 6 semanas de tratamiento. Estos análisis longitudinales demuestran una asociación estadísticamente significativa entre las variaciones del polimorfismo rs1000731 y el cambio longitudinal en la dimensión positiva ( $F=8,905$ ;  $p=0,003$ ) (ver tabla 13). Los análisis post-hoc indican que al inicio del tratamiento los pacientes portadores del alelo A del rs1000731 presentan un nivel de gravedad significativamente más alto en la dimensión positiva que los pacientes homocigotos para el alelo G ( $F=10,856$ ;  $p=0,001$ ). Sin embargo tras 6 semanas de tratamiento, los portadores del alelo A presentan una mayor reducción en esta dimensión clínica, llegando a ser su valor incluso menor que el de los pacientes G/G a las 6 semanas.

**Tabla 13. Efecto del polimorfismo rs1000731 sobre la variación (mejoría) clínica tras 6 semanas de tratamiento**

		<b>Basal</b>	<b>6 semanas</b>	<b>Estadística Tiempo x Genotipo</b>
		Media (DT)	Media (DT)	F; p
<i>BPRS</i>				
	A/-	59,4 (12,4)	34,1 (8,2)	0,957; 0,329
	G/G	59,0 (10,5)	35,7 (10,0)	
<i>SAPS</i>				
	A/-	13,0 (4,3)	3,2 (3,6)	0,361; 0,549
	G/G	13,0 (4,1)	3,6 (3,8)	
<i>SANS</i>				
	A/-	6,9 (5,9)	4,4 (4,6)	0,526; 0,469
	G/G	6,6 (5,8)	4,9 (4,9)	
<i>Dimensión positiva</i>				
	A/-	8,0 (2,3)	2,2 (2,6)	<b>8,905; 0,003</b>
	G/G	6,9 (2,3)	2,4 (2,2)	
<i>Dimensión negativa</i>				
	A/-	5,3 (5,7)	4,0 (4,3)	0,233; 0,616
	G/G	5,2 (5,4)	4,3 (4,6)	
<i>Dimensión desorganizada</i>				
	A/-	4,9 (3,3)	0,9 (1,6)	3,106; 0,080
	G/G	6,2 (3,4)	1,25 (2,4)	

DT: Desviación típica

No encontramos otras asociaciones entre este polimorfismo y variaciones longitudinales de la clínica, como tampoco entre los otros dos polimorfismos estudiados y variaciones clínicas longitudinales tras 6 semanas de tratamiento (tablas 14 y 15)

**Tabla 14. Efecto del polimorfismo rs6675281 sobre la variación (mejoría) clínica tras 6 semanas de tratamiento**

		<b>Basal</b>	<b>6 semanas</b>	<b>Estadística Tiempo x Genotipo</b>
		Media (DT)	Media (DT)	F; p
<i>BPRS</i>				
	C/C	59,7 (11,5)	34,8 (8,8)	1,478; 0,226
	T/-	57,2 (10,1)	35,1 (10,9)	
<i>SAPS</i>				
	C/C	13,2 (4,3)	3,4 (3,6)	2,191; 0,141
	T/-	12,2 (3,8)	3,6 (4,2)	
<i>SANS</i>				
	C/C	6,9 (5,8)	4,7 (4,8)	0,073; 0,787
	T/-	6,6 (6,4)	4,7 (4,8)	
<i>Dimensión positiva</i>				
	C/C	7,5 (2,4)	2,3 (2,3)	3,350; 0,069
	T/-	6,6 (2,1)	2,4 (2,5)	
<i>Dimensión negativa</i>				
	C/C	5,4 (5,5)	4,1 (4,5)	0,005; 0,946
	T/-	5,4 (5,8)	4,3 (4,4)	
<i>Dimensión desorganizada</i>				
	C/C	5,7 (3,5)	1,0 (2,1)	0,269; 0,604
	T/-	5,6 (3,3)	1,2 (2,2)	

DT: Desviación típica

**Tabla 15. Efecto del polimorfismo rs821616 sobre la variación (mejoría) clínica tras 6 semanas de tratamiento**

		<b>Basal</b>	<b>6 semanas</b>	<b>Estadística Tiempo x Genotipo</b>
		Media (DT)	Media (DT)	F; p
<i>BPRS</i>				
	A/A	54,7 (10,4)	34,1 (9,7)	0,578; 0,448
	T/-	59,0 (11,0)	35,2 (9,6)	
<i>SAPS</i>				
	A/A	13,2 (3,2)	3,3 (3,4)	0,246; 0,621
	T/-	12,8 (4,3)	3,5 (4,2)	
<i>SANS</i>				
	A/A	4,1 (3,8)	4,2 (4,6)	1,042; 0,309
	T/-	7,0 (6,0)	4,9 (4,9)	
<i>Dimensión positiva</i>				
	A/A	8,9 (1,8)	2,8 (3,2)	2,079; 0,151
	T/-	7,1 (2,3)	2,3 (2,3)	
<i>Dimensión negativa</i>				
	A/A	2,6 (2,5)	3,8 (4,1)	2,031; 0,156
	T/-	5,5 (5,7)	4,3 (4,6)	
<i>Dimensión desorganizada</i>				
	A/A	4,3 (3,5)	0,4 (0,9)	0,312; 0,577
	T/-	5,7 (3,4)	1,2 (2,2)	

DT: Desviación típica

Por último analizamos también la posible asociación entre el gen *DISC1* y la resistencia al tratamiento antipsicótico, no encontrándose ninguna diferencia significativa en la distribución de los genotipos o de los alelos entre los pacientes resistentes y los no resistentes (tablas 16, 17, y 18).

**Tabla 16. Relación del polimorfismo rs1000731 con resistencia al tratamiento**

	Resistente	No resistente	Estadística
	N (%)	N (%)	$\chi^2$ ; p
<i>Genotipo</i>			
A/A	0 (0,00)	6 (0,03)	0,424; 0,809
A/G	4 (0,31)	62 (0,31)	
G/G	9 (0,69)	129 (0,66)	
<i>Genotipo agrupado</i>			
A/-	4 (0,31)	68 (0,34)	0,076; 0,522
<i>Alelo</i>			
A	4 (0,15)	74 (0,19)	0,186; 0,666
G	22 (0,85)	320 (0,81)	

**Tabla 17. Relación del polimorfismo rs6675281 con resistencia al tratamiento**

	Resistente	No resistente	Estadística
	N (%)	N (%)	$\chi^2$ ; p
<i>Genotipo</i>			
C/C	10 (0,71)	160 (0,81)	1,298; 0,523
C/T	4 (0,29)	34 (0,17)	
T/T	0 (0,00)	3 (0,02)	
<i>Genotipo agrupado</i>			
T/-	4 (0,29)	37 (0,19)	0,800; 0,371
<i>Alelo</i>			
C	24 (0,85)	354 (0,90)	0,478; 0,489
T	4 (0,15)	40 (0,10)	

**Tabla 18. Relación del polimorfismo rs821616 con resistencia al tratamiento**

	<b>Resistente</b>	<b>No resistente</b>	<b>Estadística</b>
	N (%)	N (%)	$\chi^2$ ; p
<i>Genotipo</i>			
A/A	0 (0,00)	11 (0,06)	1,226; 0,542
A/T	5 (0,39)	83 (0,45)	
T/T	8 (0,61)	92 (0,49)	
<i>Genotipo agrupado</i>			
T/-	13 (1,00)	175 (0,94)	0,818; 0,528
<i>Alelo</i>			
A	5 (0,19)	105 (0,28)	0,983; 0,321
T	21 (0,81)	267 (0,71)	



## **6. PUBLICACIONES**



## A Disrupted-in-Schizophrenia 1 Gene Variant is Associated with Clinical Symptomatology in Patients with First-Episode Psychosis

Javier Vázquez-Bourgon<sup>1,2</sup>✉, Ignacio Mata<sup>2</sup>, Roberto Roiz-Santiáñez<sup>1,2</sup>, Rosa Ayesa-Arriola<sup>1,2</sup>, Paula Suárez Pinilla<sup>1</sup>, Diana Tordesillas-Gutiérrez<sup>1,2</sup>, José Luis Vázquez-Barquero<sup>1,2</sup>, and Benedicto Crespo-Facorro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychiatry, University Hospital Marqués de Valdecilla-IFIMAV, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomedica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain

**Objective** DISC1 gene is one of the main candidate genes for schizophrenia since it has been associated to the illness in several populations. Moreover, variations in several DISC1 polymorphisms, and in particular Ser704Cys SNP, have been associated in schizophrenic patients to structural and functional modifications in two brain areas (pre-frontal cortex and hippocampus) that play a central role in the genesis of psychotic symptoms. This study tested the association between Ser704Cys DISC1 polymorphism and the clinical onset of psychosis.

**Methods** Two hundred and thirteen Caucasian drug-naïve patients experiencing a first episode of non-affective psychosis were genotyped for rs821616 (Ser704Cys) SNP of the DISC1 gene. The clinical severity of the illness was assessed using SAPS and SANS scales. Other clinical and socio-demographic variables were recorded to rule out possible confounding effects.

**Results** Patients homozygous for the Ser allele of the Ser704Cys DISC1 SNP had significantly ( $p < 0.05$ ) higher rates at the positive symptoms dimension (SAPS-SANS scales) and hallucinations item, compared to Cys carriers.

**Conclusion** DISC1 gene variations may modulate the clinical severity of the psychosis at the onset of the disorder.

Psychiatry Investig 2014;11(2):186-191

**Key Words** DISC1 ser704cys, Genetics, Hallucinations, Schizophrenia, Severity of illness.

### INTRODUCTION

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) and DISC2 genes are located at the breakpoint of a chromosomal translocation at 1q42.1 (1;11) (q42.1;q14.3), which was firstly described to be linked to major psychiatric disorders, including schizophrenia, in a Scottish family.<sup>1</sup> Subsequent studies on different ethnic populations provided further evidence supporting the role of DISC1 as a susceptibility gene for Schizophrenia spectrum disorders.<sup>2-12</sup>

The biological functions of DISC1 are not completely un-

derstood, and still there is no clear knowledge on how variations in DISC1 gene could increase the risk of schizophrenia. However there is growing evidence regarding the involvement of DISC1 protein in neurodevelopmental processes and neural cell signalling through its interaction with the binding protein complex known as DISC1 interactome; being FEZ1, NEDL1, PDE4, or PSD95 among the proteins included in this complex.<sup>13,14</sup>

During the last decade, the study of the relation between DISC1 and different schizophrenia endophenotypes (e.g., brain structure and function, cognitive abnormalities), has provided evidence of association between variations in several DISC1 polymorphisms and brain structure, altered brain function and impaired cognitive performance, both in schizophrenic patients and in healthy subjects.<sup>4,5,15-22</sup> However, few studies have examined the relationship between this gene and the clinical presentation in schizophrenia.<sup>11,23-25</sup> These studies have reported associations between different DISC1 polymorphisms and positive psychotic symptoms -hallucinations

Received: April 19, 2013 Revised: June 28, 2013

Accepted: July 15, 2013 Available online: April 11, 2014

✉ Correspondence: Javier Vázquez-Bourgon, MD

Department of Psychiatry, University Hospital Marqués de Valdecilla-IFIMAV, School of Medicine, University of Cantabria, Avda. Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain

Tel: +34-942-202537, Fax: +34-942-203447, E-mail: javazquez@humv.es

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and delusions,<sup>24,25</sup> as well as psychosis-related traits both in schizophrenic patients and in healthy individuals.<sup>11,23</sup> However none of these studies have examined a sample of first-episode patients, thus allowing to control the confusion effects derived from the treatment and chronicity of the illness.

Among all the numerous DISC1 polymorphisms which have been described, the Ser704Cys (rs821616) appears to be especially relevant as it has been previously related to different aspects of schizophrenia. Specifically, variations in this particular polymorphism have been associated not only to the risk of having schizophrenia,<sup>7</sup> but also to several endophenotypes, such as brain structural and functional abnormalities,<sup>7,15,18</sup> cognitive impairment,<sup>7,17,20</sup> and even clinical presentation.<sup>23,25</sup> All these studies have found that carriers of the Ser allele (or Ser/Ser genotype) have an increased risk for showing a higher severity of the different abnormalities mentioned above.

The aim of the present study was to examine, in a well-characterized and representative series of patients experiencing a first episode of a non-affective psychosis, whether an association between DISC1 Ser704Cys polymorphism and clinical presentation exists. We hypothesized that carriers of the Ser allele (or Ser/Ser genotype) will show a more deleterious illness onset, with an earlier age of onset and higher psychopathological severity.

## METHODS

The sample for the present study consisted in 213 unrelated Caucasian subjects of Spanish origin. The subjects formed part of a large prospective longitudinal study on first episode non-affective psychosis (PAFIP).<sup>26</sup> Those patients referred to the program presenting a first episode of non-affective psychosis were admitted to the programme if fulfilling the following criteria: 1.-aged 15-60; 2.-meeting DSM-IV criteria (by means of the Structured Clinical Interview for DSM-IV, SCID-I) 6 months after inclusion for a principal diagnosis of, schizophrenia, schizophreniform disorder, schizoaffective disorder, brief reactive psychosis, delusional disorder, or psychosis non otherwise specified; 3.-habitually living in the catchment area; 4.-no prior treatment with antipsychotic medication; and 5.-current psychotic symptoms of at least moderate severity, as assessed by one of the five items of the Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS). Patients were not admitted to the programme if presenting any of the following: 1.-mental retardation; 2.-neurological disorder; or 3.-drug dependence (DSM-IV criteria).

Clinical assessments were carried out with the Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS),<sup>27</sup> Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS),<sup>28</sup> and the Clinical Global Impression-Severity scale (CGI-S), by a senior psychi-

atrist (BC-F), who was blind to genotype. The positive, negative and disorganized symptom dimensions were calculated from SAPS and SANS scales,<sup>29,30</sup> and were used to measure the clinical severity of the illness. The positive symptom dimension is the sum of global scores for the SAPS items hallucinations and delusions. The negative symptom dimension is the sum of global scores of the following SANS items: alogia, affective flattening, avolition-apaty, and anhedonia-asociality. And the disorganized symptom dimension is the sum of the items: positive formal thought disorder, disorganized/bizarre behaviour, and inappropriate affect.

All subjects gave written informed consent prior to their inclusion in the study, which was approved by the local ethics committee (University Hospital Marques de Valdecilla Ethics Committee).

The control group, which consisted in 303 subjects, was obtained from the Blood Bank of the University Hospital Marques de Valdecilla. All subjects in the control group gave consent for their blood to be genotyped for research purposes.

Genomic DNA was extracted from peripheral white blood cells obtained from each subject according to standard protocols. The Ser704Cys DISC1 polymorphism-rs821616-was genotyped using SNPlex technology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

All statistical analyses were carried out using the statistical software package SPSS 15.0 for Windows. For the analysis of categorical variables, Chi square analyses were carried out. For the analyses of the relation between Ser704Cys genotype and continuous variables, we used analysis of variance (ANOVA) tests. Statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

After completing the association analysis by genotype, and in order to facilitate comparison to previous studies, we conducted exploratory analysis of association clustering the patients into two groups according to being homozygous for the Ser allele or carrying the Cys allele.

## RESULTS

Gender distribution was 123 males (57.7%) and 90 females (42.3%). Mean age of onset in our sample was 27.3 years (SD=7.8), higher than what has commonly been reported. The mean duration of untreated psychosis (DUP) at initial assessment was 14.5 months (SD=29.4, median=4).

Among the control group, 177 (59.8%) were male, and 126 (41.6%) were female. Due to the origin of the control sample, sex was the only socio-demographic variable available for the current study.

The diagnostic breakdown of the patients was: schizophrenia (n=121, 56.8%), schizophreniform disorder (n=52, 24.4%), schizoaffective disorder (n=5, 2.3%), brief reactive psychosis

## DISC1 Variation and Positive Symptoms

(n=18, 8.5%), psychosis not otherwise specified (n=15, 7.0%), delusional disorder (n=2, 0.9%).

Patients and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium for the polymorphism studied. Rs821616 genotypic and allelic frequencies were as follow for patients and controls. Patients: AA=6.6%; AT=42.7%; TT=50.7% and A=0.28; T=0.72. Controls: AA=8.6%; AT=37%; TT=54.4% and A=0.27; T=0.73.

Gender distribution did not significantly differ between patients and controls ( $\chi^2=0.21$ ;  $p=0.35$ ). Moreover, gender distribution both in patients and controls was similar in each of the genotype groups (Patients:  $\chi^2=3.52$ ;  $p=0.17$ ; Controls:  $\chi^2=4.13$ ;  $p=0.13$  respectively).

Allelic and genotypic distributions were not significantly different in patients and controls (Allelic:  $\chi^2=0.09$ ;  $p=0.76$ ; Genotypic:  $\chi^2=2.04$ ;  $p=0.36$ ). In the group of patients with psychosis, the statistical analyses failed to show any significant

association between Ser704Cys genotypes and age of onset or DUP (Table 1).

When the three commonly used dimensions of psychopathology (positive, negative and disorganised) were analysed, a significant association was found between Ser704Cys genotype and the positive dimension (Table 2); those patients homozygous for the Ser allele showed a higher severity of the positive dimension than Cys allele carriers ( $F=6.85$ ;  $p=0.009$ ) (Figure 1). In a further analysis we explored each of the symptoms included in the SAPS-SANS positive dimension, finding a significant association between Ser704Cys genotype and the item hallucinations ( $F=5.75$ ;  $p=0.017$ ) following the same direction as the previous result; patients with a Ser/Ser genotype showed a mean greater score than Cys carriers (Figure 2).

**Table 1.** Socio-demographic characteristics of the sample

	Ser-Ser (N=14)		Ser-Cys (N=91)		Cys-Cys (N=108)		Statistics*		Cys/- (N=199)		Statistics†	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD		
Age	29.91	7.21	28.65	8.59	28.50	8.48	F=0.17	p=0.84	28.57	8.51	F=0.33	p=0.56
Age of onset	28.19	5.03	27.27	7.95	27.33	7.99	F=0.08	p=0.92	27.3	7.95	F=0.16	p=0.69
DUP (months)	3.91	4.72	16.53	32.97	14.02	27.69	F=1.08	p=0.34	15.17	30.16	F=1.80	p=0.18
	N	%	N	%	N	%			N	%		
Gender (male)	11	78.6	48	52.7	64	59.3	$\chi^2=3.52$	p=0.17	112	56.3	$\chi^2=2.66$	p=0.08
Diagnostic (6 months-SCID)												
Schizophrenia	8	57.1	43	47.3	70	64.8			113	56.8		
Schizophreniform Ds	6	42.9	26	28.6	20	18.5			46	23.1		
Schizoaffective Ds	-	-	1	1.1	4	3.7			5	2.5		
Others	-	-	21	22.1	14	13.0			35	17.5		

Statistical significance  $p<0.05$ . \*statistical analysis (chi-square; Anova) for difference between genotype groups, †statistical analysis (chi-square, Anova) for difference between genotype groups (Ser/Ser vs. Cys carriers). DUP: Duration of Untreated Psychosis, SAPS: Scale for the assessment of positive symptoms, SANS: Scale for the assessment of negative symptoms, SCID: Structured Clinical Interview for DSM-IV

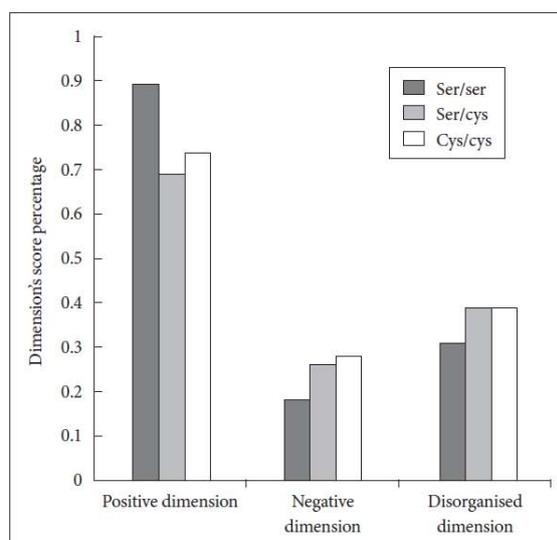
**Table 2.** Baseline clinical severity

	Ser-Ser (N=14)		Ser-Cys (N=91)		Cys-Cys (N=108)		Statistics*		Cys/- (N=199)		Statistics†	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	F	p	Mean	SD	F	p
SAPS	13.43	3.05	12.79	4.50	13.27	4.57	0.33	0.72	13.05	4.53	0.09	0.76
SANS	5.43	5.59	7.02	5.81	7.23	6.22	0.56	0.57	7.14	6.02	1.06	0.30
Symptom Dimensions												
Positive Symptom	8.86	1.83	6.86	2.34	7.42	2.38	4.88	0.009	7.16	2.37	6.85	0.009
Negative Symptom	3.57	3.99	5.30	5.57	5.70	5.85	0.91	0.40	5.52	5.71	1.57	0.21
Disorganized Symptom	4.57	3.34	5.93	3.38	5.85	3.72	0.89	0.41	5.89	3.60	1.76	0.18
Positive symptom dimension's Items												
SAPS Item Hallucinations	3.86	1.83	2.16	2.23	2.53	2.32	3.52	0.031	2.36	2.28	5.75	0.017
SAPS Item Delusions	5.00	0.00	4.69	0.88	4.89	0.34	3.12	0.046	4.80	0.65	1.33	0.25

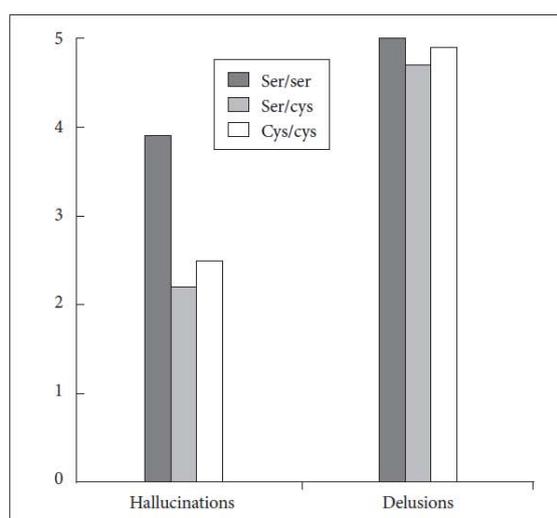
Statistical significance  $p<0.05$ . \*analysis of anova for difference between genotype groups, †analysis of anova for difference between genotype groups (Ser/Ser vs. Cys carriers). SAPS: Scale for the assessment of positive symptoms, SANS: Scale for the assessment of negative symptoms

## DISCUSSION

Our study detected a significant association between Ser704Cys genotype and severity of positive psychotic symptoms in a well-defined Spanish Caucasian population, measured by the total score in the SANS-SAPS Positive Symptoms dimension, and severity of the Hallucinations, at the onset of the illness. Thus, according to the results, a patient presenting a first episode of psychosis and being homozygous for the Ser allele will present more likely a worse clinical onset of the illness, with more severe positive symptoms and particularly halluci-



**Figure 1.** Symptom dimensions and Ser704Cys genotypes. Different range of scores for each dimension: Positive dimension: 0–10 points; Negative dimension: 0–20 points; Disorganised dimension: 0–15 points.



**Figure 2.** Positive symptom dimension and Ser704Cys genotypes.

nations.

This finding is consistent with previous reports of an association between carrying the Cys allele and presenting lower delusional rating in psychotic patients,<sup>25</sup> and lower rates in the schizoidia scale in healthy subjects.<sup>23</sup>

Other studies linked as well clinical presentation to different DISC1 polymorphisms; thus Hennah et al.<sup>11</sup> described that a certain DISC1 haplotype (HEP3) displayed association to certain component-traits of Schizophrenia. And similarly another study found an association between the phe allele in leu-607phe SNP and severity of hallucinations in a sample of Caucasian patients with a diagnosis of schizophrenia.<sup>24</sup>

Moreover, a recent study acknowledged the possibility that the severity of the psychosis could be the mediating factor in the observed association between a DISC1 rs3738401 variant and ultra-resistance to antipsychotic treatment.<sup>31</sup>

Although DISC1 gene has been postulated as one of the main candidate genes for Schizophrenia, to date there is no clear evidence supporting the Ser704Cys DISC1 SNP as a risk factor for psychosis. While Callicot and colleagues found the Ser allele over-transmitted to psychotic patients in a large family-based sample,<sup>7</sup> a recent study found no association between this polymorphism and the risk of psychosis.<sup>25</sup> In line with these results, our study showed no significant association between Ser704Cys polymorphism and risk of psychosis in the northern Spanish Caucasian population studied.

In addition, when studying the effect of this DISC1 genotype on the onset of the illness our study found no association between Ser704Cys polymorphism and age of onset or DUP. This last result is in agreement with a previous study in a sample of schizophrenic Japanese patients.<sup>42</sup>

The biological function of DISC1 is not completely understood, and yet still there is no clear knowledge on how variations in DISC1 gene could modify the clinical presentation of the illness. However, it is today established that DISC1 gene encodes for a scaffold protein that interacts with multiple proteins (DISC1 Interactome) involved in neurodevelopment and neuro-signalling processes.<sup>32–35</sup>

DISC1 protein is expressed in neurons in the brain, predominantly in the hippocampus and cerebral cortex.<sup>36</sup> DISC1 expression has been shown to be lower in patients with Schizophrenia.<sup>37</sup> And moreover, those schizophrenic patients Ser homozygous for Ser704Cys DISC1 polymorphism showed a lower expression of some of these partner proteins in these brain areas.<sup>38</sup>

Moreover, Ser/Ser genotype has been associated to a decrease in hippocampal grey matter and to abnormal hippocampal activity during cognitive tasks.<sup>7</sup> And, in healthy subjects Ser/Ser genotype showed greater activation of the hippocampus<sup>15</sup> and pre-frontal cortex<sup>16</sup> during cognitive tasks, suggest-

## DISC1 Variation and Positive Symptoms

ing that these areas needed greater activation to achieve the same level of cognitive functioning of those Cys carrier subjects.

Interestingly, these two brain areas -prefrontal cortex and hippocampus- showing structural and functional changes in relation to variations in DISC1 gene, play a central role in the genesis of psychotic symptoms according to the dopamine theory of Schizophrenia.<sup>39,40</sup> Therefore a plausible explanation for the involvement of DISC1 in psychosis severity is based on its interaction with the dopamine system, perhaps through neurodevelopmental modifications in these brain areas derived from DISC1 gene variations which could ultimately lead to the functional and structural changes described in these two main brain areas as well as differences in clinical severity.

Indeed, a recent review on DISC1 details the multiple findings relating DISC1 variations to dopamine system in knock-down mice and cell studies,<sup>41</sup> in line with this explanatory hypothesis.

These results have to be taken into account with caution; the study should be replicated in larger samples and other DISC1 polymorphisms should be included in the study forming haplotypes to obtain a bigger representation of the DISC1 gene.

The sample used in this study, formed by a wide range of non-affective psychosis diagnosis might be a caveat in the study as the results obtained might be less specific of a core schizophrenia diagnosis sub-sample. However, this study aimed to identify associations between variations in DISC1 gene and clinical severity of the onset of psychosis in a wide scope, and not in a more restricted sample.

The genotype clustering (Ser homozygous versus Cys carriers) carried out in order to facilitate comparison to previous studies, formed two unbalanced groups, which may have influenced the subsequent statistical analyses, therefore representing a possible caveat. However, due to the exploratory nature of this analysis we have considered relevant to include it.

An additional flaw in our study could be the multiple tests done. After correcting for multiple testing the statistical significance didn't survive. However this might be explained by the sample size and it is likely that in a bigger sample the statistical significance would have survived multiple testing corrections.

In conclusion, this study showed a significant association between DISC1 gene Ser704Cys polymorphism and severity of the positive symptoms, in particular hallucinations, at the onset of a first episode of psychosis. Therefore, DISC1 gene variations may modulate the severity of the psychosis at the onset of the illness.

## Acknowledgments

The present study was performed at the Hospital Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, Santander, Spain, under the following Grant support: SENY Fundacio Research Grant 2005, Instituto de Salud Carlos III, FIS 00/3095, 03/1009, and PI06/0507, and Fundación Marqués de Valdecilla A/02/07 and API 07/11.

We thank the Spanish Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) for carrying out the molecular genetic analysis.

## REFERENCES

1. St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, et al. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 1990;336:13-16.
2. Chen QY, Chen Q, Feng GY, Lindpaintner KI, Wang LJ, Chen ZX, et al. Case-control association study of Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) gene and schizophrenia in the Chinese population. *J Psychiatr Res* 2007;41:428-434.
3. Hashimoto R, Numakawa T, Ohnishi T, Kumamaru E, Yagasaki Y, Ishimoto T, et al. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signalling. *Hum Mol Genet* 2006;15:3024-3033.
4. Liu YL, Fann CS, Liu CM, Chen WJ, Wu JY, Hung SI, et al. A single nucleotide polymorphism fine mapping study of chromosome 1q42.1 reveals the vulnerability genes for schizophrenia, GNPAT and DISC1: Association with impairment of sustained attention. *Biol Psychiatry* 2006;60:554-562.
5. Hennah W, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Ekelund J, Varilo T, Partonen T, et al. A haplotype within the DISC1 gene is associated with visual memory functions in families with a high density of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2005;10:1097-1103.
6. Zhang X, Tochigi M, Ohashi J, Maeda K, Kato T, Okazaki Y, et al. Association study of the DISC1/TRAX locus with schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res* 2005;79:175-180.
7. Callicott JH, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, et al. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *P Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8627-8632.
8. Ekelund J, Hennah W, Hiekkalinna T, Parker A, Meyer J, Lonnqvist J, et al. Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees. *Mol Psychiatry* 2004;9:1037-1041.
9. Kockelkorn TT, Arai M, Matsumoto H, Fukuda N, Yamada K, Minabe Y, et al. Association study of polymorphisms in the 5' upstream region of human DISC1 gene with schizophrenia. *Neurosci Lett* 2004;368:41-45.
10. Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, et al. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 2004;75:862-872.
11. Hennah W, Varilo T, Kestila M, Paunio T, Arajärvi R, Haukka J, et al. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum Mol Genet* 2003;12:3151-3159.
12. Ekelund J, Hovatta I, Parker A, Paunio T, Varilo T, Martin R, et al. Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet* 2001;10:1611-1617.
13. Hennah W, Porteus D. The DISC1 pathway modulates expression of neurodevelopmental, synaptogenic and sensory perception genes. *PLoS ONE* 2009;4:e4906.
14. Mackie S, Millar JK, Porteous DJ. Role of DISC1 in neural development and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:95-102.
15. Di Giorgio A, Blasi G, Sambataro F, Rampino A, Papazacharias A, Gambi F, et al. Association of the Ser704Cys DISC1 polymorphism with human hippocampal formation gray matter and function during memory encoding. *Eur J Neurosci* 2008;28:2129-2136.

16. Prata DP, Mechelli A, Fu CH, Picchioni M, Kane F, Kalidindi S, et al. Effect of disrupted-in-schizophrenia-1 on pre-frontal cortical function. *Mol Psychiatry* 2008;13:915-917.
17. Palo OM, Antila M, Silander K, Hennah W, Kilpinen H, Soronen P, et al. Association of distinct allelic haplotypes of DISC1 with psychotic and bipolar spectrum disorders and with underlying cognitive impairments. *Hum Mol Genet* 2007;16:2517-2528.
18. Cannon TD, Hennah W, van Erp TG, Thompson PM, Lonnqvist J, Huttunen M, et al. Association of DISC1/TRAX haplotypes with schizophrenia, reduced prefrontal gray matter, and impaired short- and long-term memory. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:1205-1213.
19. Burdick KE, Hodgkinson CA, Szeszko PR, Lencz T, Ekholm JM, Kane JM, et al. DISC1 and neurocognitive function in schizophrenia. *Neuroreport* 2005;16:1399-1402.
20. Thomson PA, Harris SE, Starr JM, Whalley LJ, Porteous DJ, Deary IJ. Association between genotype at an exonic SNP in DISC1 and normal cognitive aging. *Neurosci Lett* 2005;389:41-45.
21. Gasperoni TL, Ekelund J, Huttunen M, Palmer CG, Tuulio-Henriksson A, Lonnqvist J, et al. Genetic linkage and association between chromosome 1q and working memory function in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003;116:8-16.
22. Mata I, Perez-Iglesias R, Roiz-Santiañez R, Tordesillas-Gutierrez D, Gonzalez-Mandly A, Berja A, et al. Additive effect of NRG1 and DISC1 genes on lateral ventricle enlargement in first episode schizophrenia. *Neuroimage* 2010;53:1016-1022.
23. Tomppo L, Hennah W, Miettunen J, Järvelin MR, Veijola J, Ripatti S, et al. Association of variants in DISC1 with psychosis-related traits in a large population cohort. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66:134-141.
24. Szeszko PR, Hodgkinson CA, Robinson DG, DeRosse P, Bilder RM, Lencz T, et al. DISC1 is associated with prefrontal cortical gray matter and positive symptoms in schizophrenia. *Biol Psychol* 2008;79:103-110.
25. DeRosse P, Hodgkinson CA, Lencz T, Burdick KE, Kane JM, Goldman D, et al. Disrupted in schizophrenia 1 genotype and positive symptoms in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007;61:1208-1210.
26. Crespo-Facorro B, Pérez-Iglesias R, Ramírez-Bonilla M, Martínez-García O, Llorca J, Vázquez-Barquero JL. A practical clinical trial comparing haloperidol, risperidone, and olanzapine for the acute treatment of first-episode non-affective psychosis. *J Clin Psychiatry* 2006;67:1511-1521.
27. Andreasen NC. Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS). Iowa City: University of Iowa; 1984.
28. Andreasen NC. Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS). Iowa City: University of Iowa; 1983.
29. Grube BS, Bilder RM, Goldman RS. Meta-analysis of symptom factors in schizophrenia. *Schizophr Res* 1998;31:113-120.
30. Flaum M, O'Leary DS, Swayze VW 2nd, Miller DD, Arndt S, Andreasen NC. Symptom dimensions and brain morphology in schizophrenia and related psychotic disorders. *J Psychiatr Res* 1995;29:261-276.
31. Mouaffak F, Kebir O, Chayet M, Tordjman S, Vacheron MN, Millet B, et al. Association of Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) missense variants with ultra-resistant schizophrenia. *Pharmacogenomics J* 2011;11:267-273.
32. Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 2008;13:36-64.
33. Camargo LM, Collura V, Rain JC, Mizuguchi K, Hermjakob H, Kerrien S, et al. Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2007;12:74-86.
34. Millar JK, Christie S, Porteous DJ. Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:1019-1025.
35. Sawa A, Snyder SH. Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies. *Mol Med* 2003;9:3-9.
36. Wang Q, Jaaro-Peled H, Sawa A, Brandon NJ. How has DISC1 enabled drug discovery? *Mol Cell Neurosci* 2008;37:187-195.
37. Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, et al. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signalling. *Science* 2005;310:1187-1191.
38. Lipska BK, Peters T, Hyde TH, Halim N, Horowitz C, Mitkus S, et al. Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Hum Mol Genet* 2006;15:1245-1258.
39. Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III—the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009;35:549-562.
40. Abi-Dargham A. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia. *Schizophrenia Research Forum* 2005. Available at: <http://www.schizophrenia-forum.org/for/curr/AbiDargham/default.asp>. Accessed March 11, 2013.
41. Soares DC, Carlyle BC, Bradshaw NJ, Porteous DJ. DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness. *ACS Chem Neurosci* 2011;2:609-632.
42. Takahashi T, Suzukia M, Tsunoda M, Maeno N, Kawasakia Y, Zhoua SY, et al. The Disrupted-in-Schizophrenia-1 Ser704Cys polymorphism and brain morphology in schizophrenia. *Psychiatry Res* 2009;172:128-135.



Original article

## Effect of *DISC1* polymorphisms on the long-term course of neurocognitive deficits in non-affective psychosis



J. Vázquez-Bourgon<sup>a,b,c,\*</sup>, R. Ayesa-Arriola<sup>a,b,c</sup>, M. Fatjó-Vilas<sup>b,d</sup>, R. Roiz-Santiañez<sup>a,b,c</sup>,  
L. Fañanás<sup>b,d</sup>, B. Crespo-Facorro<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>University Hospital Marqués de Valdecilla, Department of Psychiatry, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

<sup>b</sup>CIBERSAM, Centro Investigación Biomédica en Red Salud Mental, Spain

<sup>c</sup>IDIVAL, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

<sup>d</sup>Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 April 2015  
Received in revised form 10 July 2015  
Accepted 13 July 2015  
Available online

#### Keywords:

Cognitive impairment  
Schizophrenia  
Long-term course  
Genetics  
DISC1

### ABSTRACT

Neurocognitive deficits are core symptoms of schizophrenia that determine a poorer outcome. High variability in the progression of neuropsychological deficits in schizophrenia has been described. It is still unknown whether genetic variations can affect the course of cognitive deficits. Variations in the *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)* gene have previously been associated with neurocognitive deficits. This study investigated the association between 3 *DISC1* polymorphisms (rs6675281 (Leu607Phe), rs1000731, and rs821616 (Ser704Cys)) and long-term (3 years) cognitive performance. One-hundred-thirty-three Caucasian drug-naïve patients experiencing a first episode of non-affective psychosis were genotyped. Cognitive function was assessed at baseline and after 3 years of initiating treatment. Other clinical and socio-demographic variables were recorded to eliminate potential confounding effects. Patients carrying the A allele of rs1000731 exhibited a significant improvement in Working Memory and Attention domains, and the homozygosity of the A allele of rs821616 showed a significant improvement in Motor Dexterity performance over 3 years of follow-up. In conclusion, *DISC1* gene variations may affect the course of cognitive deficits found in patients suffering from the first episode of non-affective psychosis.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Neurocognitive impairment is a common and central element of schizophrenia [26] that is present from the early stages of the disorder long before overt psychotic symptoms emerged [10,41] and determines a poorer outcome with a higher degree of disability [6,3].

There is some controversy whether these cognitive deficits remain stable [1,7] or vary across the patient's lifespan [31,2]. A previous study on long-term (3 years) cognitive performance in our First Episode Psychosis (FEP) sample showed that patients presented a worse evolution compared to controls in verbal and visual memory [53]. Moreover, a recent study on FEP [6] showed different course patterns of cognitive deficits among schizophrenia patients, thus supporting evidence for variability in the progression of neuropsychological deficits in schizophrenia [27].

It has been well established that schizophrenia is a highly heritable disorder [59,24] and that neurocognitive performance is also a phenotype with significant genetic effects across the entire human lifespan, both in healthy individuals [21,48] and those suffering from psychosis [8,40]. Thus, at least part of the individual vulnerability for schizophrenia and cognitive impairment could be explained by common genetically mediated neurodevelopmental alterations [8].

The *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)* gene has been proposed to be one of the main candidate genes for schizophrenia because several studies on different ethnic populations have provided broad evidence supporting the role of *DISC1* as a susceptibility gene for schizophrenia spectrum disorders [19]. The DISC1 protein is expressed in neurons in the brain, predominantly in the hippocampus and cerebral cortex [62,4,5]. These regions are involved in learning and memory processes [20], which are known to be impaired in schizophrenia [25]. The DISC1 protein is also implicated in neurodevelopmental processes [11,28,38], including some processes related to white matter development, which could

\* Corresponding author.

E-mail address: [javazquez@humv.es](mailto:javazquez@humv.es) (J. Vázquez-Bourgon).

underlie the functional connectivity of neural circuits involved in performance cognitive tasks [64].

Recently, several studies have shown evidence associating the *DISC1* gene with cognitive performance differences in patients who suffer from schizophrenia-spectrum disorders and healthy individuals [17,29,30,44,61,46,36,14,13] as well as deficiencies in brain activity while performing cognitive tasks [14,15,49]. These deficiencies have been proposed to be signs of neural inefficiencies. Moreover, cognitive performance and N-back-elicited activity in the pre-frontal cortex have been shown to correlate with *DISC1* peripheral expression [50]. With regard to the effect of this gene on long-term cognitive performance, Thomson et al. [61] investigated its association with normal cognitive ageing in healthy subjects; however, no studies to date have examined the potential effect of the *DISC1* gene on the course of cognitive deterioration in psychosis.

Thus, we considered the relevance by examining the potential implication of this gene on long-term variability in cognitive performance in psychosis.

Among the several *DISC1* polymorphisms studied to date, we selected three SNPs (rs821616, rs6675281 and rs1000731) due to their demonstrated effect on cognition. The Ser allele of rs821616 has been associated with poorer cognitive performance in psychosis [46,14] and with normal cognitive ageing [61]. Moreover, studies using functional neuroimaging methodologies [14,49,22] have also shown an association of the Ser allele with data suggesting lesser efficient neural circuitries. Rs6675281 has been correlated with differences in cognitive performance in schizophrenia patients [17] and healthy subjects [44]. Moreover, patients carrying the Phe allele of rs6675281 showed increased neural activity during the working memory task, suggesting neural inefficiency [12]. Finally, the G allele of rs1000731 has been associated with verbal learning and memory in a schizophrenia sample [17], and a recent study further showed its association with hippocampal activation during the recognition memory task [15].

The aim of the present study was to examine, in a well-characterized and representative series of patients experiencing a first episode of non-affective psychosis, whether an association between *DISC1* polymorphisms and variations in the long-term (3 years) course of cognitive deterioration exists. We hypothesized that variations in *DISC1* gene polymorphisms determine differences in the long-term course in cognitive performance.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

The sample for the present study consisted of 133 unrelated Caucasian subjects of Spanish origin. The subjects formed part of a larger prospective longitudinal study on first episode non-affective psychosis (PAFIP) [47]. These patients were referred to the programme presenting a first episode of non-affective psychosis and were admitted to the programme if they fulfilled the following criteria: (1) aged 15–60 years; (2) met the DSM-IV criteria (according to the Structured Clinical Interview for DSM-IV, SCID-I) 6 months after inclusion for a principal diagnosis of schizophrenia, schizophreniform disorder, schizoaffective disorder, brief reactive psychosis, or psychosis non otherwise specified; (3) habitually living in the catchment area; (4) no prior treatment with antipsychotic medication; and (5) current psychotic symptoms of at least of moderate severity, as assessed by one of the five items of the Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS). Patients were not admitted to the programme if they presented any of the following: (1) mental retardation; (2) neurological disorder; or (3) drug dependence (DSM-IV criteria). All subjects provided written informed consent prior to their inclusion in the

study, which was approved by the local ethics committee (University Hospital Marques de Valdecilla Ethics Committee).

### 2.2. Neurocognitive assessment

Cognitive function was assessed in patients at two time-points: baseline and at three years after admission to the treatment programme. The cognitive baseline assessment for the patients was established based on the clinical status when the acute psychotic symptoms were stabilize to avoid interference with the cognitive performance and at an average period of 10 weeks after treatment initiation.

A neurocognitive battery was designed to examine the functional domains that are presumably impaired in schizophrenia, focusing on measures of general verbal ability, attention, verbal and visual memory, executive function, and motor skills.

An analysis was performed that consisted of a subset of measures that were selected to assess seven major ability areas: (1) to measure verbal memory, we used the Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT [52]), delayed recall; (2) to measure visual memory, we used the Rey Complex Figure (RCF [45]), delayed reproduction; (3) to measure executive functions, we used the Trail Making Test (TMT [51]), time to complete TMT-B minus time to complete TMT-A [55]; (4) to measure working memory, we used the Backward Digits Scale (WAIS III [63]), total subscore; (5) to measure the speed of processing, we used WAIS III subtest Digit Symbol, standard total score; (6) to measure Motor Dexterity, we used Grooved Pegboard Handedness (GP [34]), time to complete with dominant hand; and (7) to measure attention, we used Continuous Performance Test (CPT [18]), total number of correct responses.

The raters performed all of the cognitive assessments blind to the treatment being received and genotype.

### 2.3. Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral white blood cells that were obtained from each subject according to standard protocols. Three *DISC1* SNPs of interest were selected based on previous studies [17,44,46,14,15,49,22,12]: rs821616, rs6675281, and rs1000731. The rs821616 (A/T) is located in exon 11 and consists of an amino acid change from serine to cysteine; while rs6675281 (C/T), located in exon 9, demonstrated an amino acid change from leucine to phenylalanine. The rs1000731 (G/A, exon 9) is a synonymous SNP and combined with rs6675281 is included in a previously described haplotype associated with schizophrenia spectrum disorders (HEP1) [29]. These *DISC1* gene SNPs were genotyped using SNPlex technology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the statistical software package SPSS 15.0 for Windows.

The genotype frequencies of the *DISC1* SNPs in patients were tested for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using the chi-squared test.

Differences in the distribution of gender between the genotype groups were assessed using the Chi-square test. Differences between genotypes in age, education years, and Chlorpromazine equivalent dose [65] were assessed using analysis of variance (ANOVA).

To investigate the effects of each *DISC1* SNP genotype in cognitive performance follow-up, a general lineal model (GLM) repeated-measure procedure was performed for each cognitive measure as dependent variables separately, with the genotype groups as the between-subject variable and time (baseline, 3-year

follow-up) as the within-subject variable. The effects of time (longitudinal dimension) and time by genotype group (interaction effect) were examined. Gender, age, years of education and premorbid IQ, as measured by the Vocabulary subtest of the WAIS III [63], were included as covariates. All post hoc comparisons were corrected using the Bonferroni test.

In a secondary step, to compare our study with previous studies that predominantly followed transversal approaches, we examined the cross-sectional differences between genotypic subgroups in cognitive performance at baseline and at the 3-year follow-up. We performed one-way analysis of the covariance (ANCOVA). In each GLM, the dependent measures included cognitive variables and the independent measures consisted of the genotypes. Gender, age, years of education and premorbid IQ were included as covariates. All post hoc comparisons were corrected using the Bonferroni test.

Multiple testing correction was applied according to Bonferroni method, due to the number of cognitive domains studied (7 tests), which produced a corrected significance threshold of  $p < 0.007$ .

Effect sizes were calculated using the Cohen's  $d$  test.

As described in previous studies, the genotypes were clustered to facilitate posterior comparisons: rs821616 (AA vs. T/-); rs6675281 (CC vs. T/-); rs1000731 (GG vs. A/-).

### 3. Results

#### 3.1. Sociodemographic and clinical characteristics

The sociodemographic and clinical characteristics at baseline in the *DISC1* genotype patient groups are presented in Table 1. There were no significant differences between the clustered-genotype groups with regard to relevant variables (all  $p > 0.05$ ).

The patient genotypic frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium for the polymorphisms examined. The genotypic and

allelic frequencies were as expected for the ethnic population studied (according to HapMap CEU population).

For rs6675281: CC = 82.0%; CT = 15.65%; TT = 2.3% (MAF: T = 0.10); for rs100731: AA = 3.1%; AG = 29.5%; GG = 67.4% (MAF: A = 0.18); and for rs821616: AA = 8.3%; AT = 37.2%; TT = 54.5% (MAF: A = 0.27).

Gender distribution did not differ between each of the genotype groups.

#### 3.2. Association with long-term cognitive performance course

When analysing the rs1000731 *DISC1* gene polymorphism and long-term cognitive performance course, we performed longitudinal analyses. These analyses revealed a significant association between the rs1000731 genotypes  $\times$  Time in Working Memory ( $F = 7.781$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.006$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 0.599$ ) and Attention ( $F = 14.451$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.001$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 0.714$ ) domains measured using the Backward Digits Scale and Continuous Performance Test, respectively. Post hoc analyses revealed that patients carrying the A allele (32.6% of patients) showed a significant improvement in Working Memory and Attention ( $p = 0.006$  and  $p < 0.001$ , respectively), while those homozygous for the G allele (67.4%) showed no significant variations in performance in these domains over time (Fig. 1a and b, respectively). No other significant associations were found with the remaining cognitive domains studied.

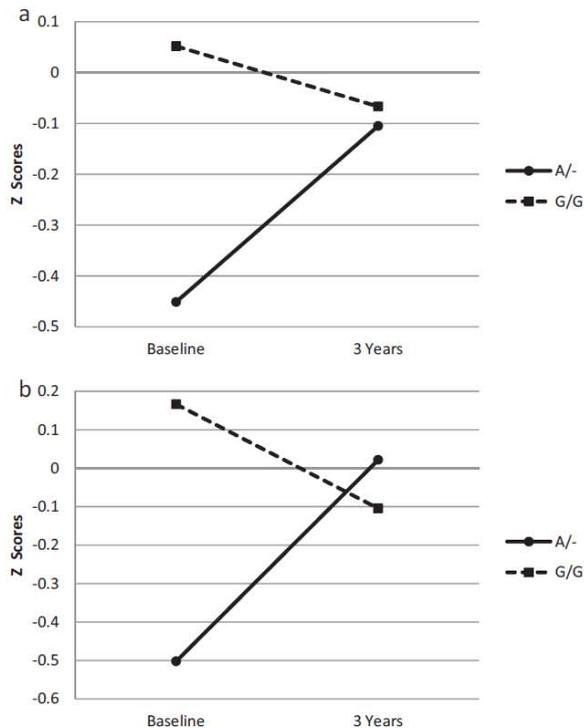
With regard to the rs821616 polymorphism, we found a significant association of Time ( $F = 9.490$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.003$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 0.263$ ) and the rs821616 genotypes  $\times$  Time in Motor Dexterity performance ( $F = 11.129$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.001$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 0.450$ ). Post hoc comparisons revealed that patients homozygous for the A allele (8.3% of patients) showed significant improvement in the Grooved Pegboard Handedness score over time ( $p < 0.001$ ), while T-carriers (91.7%) showed stability over time (Fig. 2). No

**Table 1**  
Patients' sociodemographic and clinical characteristics.

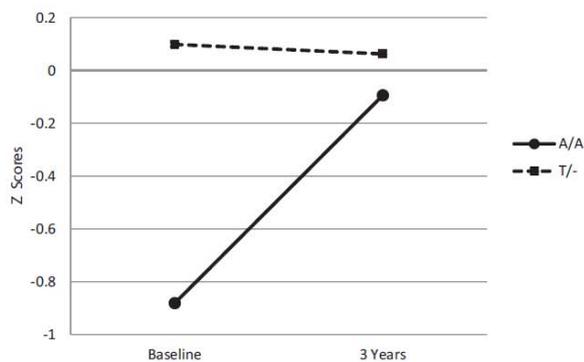
	rs6675281			rs1000731			rs821616		
	CC (N = 105) Mean (SD)	T/- (N = 23) Mean (SD)	Stat* F, df, p	GG (N = 87) Mean (SD)	A/- (N = 42) Mean (SD)	Stat* F, df, p	AA (N = 10) Mean (SD)	T/- (N = 111) Mean (SD)	Stat* F, df, p
Age	28.6 (8.2)	30.7 (9.5)	1.21, 1, 0.27	28.9 (8.8)	28.7 (7.8)	0.025, 1, 0.87	29.7 (4.9)	28.5 (8.3)	0.18, 1, 0.67
Age of onset	27.2 (7.7)	29.2 (8.9)	1.14, 1, 0.28	27.6 (8.4)	27.5 (7.1)	0.008, 1, 0.93	29.2 (4.7)	27.1 (7.7)	0.67, 1, 0.41
DUP (months)	13.1 (27.5)	15.1 (25.6)	0.09, 1, 0.75	13.3 (27.9)	12.2 (24.0)	0.52, 1, 0.82	3.1 (4.6)	14.2 (28.1)	1.50, 1, 0.22
Years of education	10.6 (3.8)	11.3 (3.4)	1.00, 1, 0.32	11.0 (3.1)	10.3 (3.3)	1.66, 1, 0.20	11.2 (3.2)	10.7 (3.0)	0.27, 1, 0.60
Chlorpromazine equivalent dose	174.1 (88.1)	152.5 (72.9)	1.20, 1, 0.27	159.9 (80.3)	188.7 (94.4)	3.22, 1, 0.075	182.5 (137.0)	171.3 (78.3)	0.16, 1, 0.69
	rs6675281			rs1000731			rs821616		
	CC (N = 105) N (%)	T/- (N = 23) N (%)	Stat* $\chi^2$ , df, p	GG (N = 87) N (%)	A/- (N = 42) N (%)	Stat* $\chi^2$ , df, p	AA (N = 10) N (%)	T/- (N = 111) N (%)	Stat* $\chi^2$ , df, p
Gender (male)	61 (58.1)	12 (52.2)	0.27, 1, 0.60	48 (55.2)	26 (61.9)	0.52, 1, 0.47	8 (80.0)	62 (55.9)	2.19, 1, 0.14
Diagnostic (6 months-SCID)									
Schizophrenia	58 (55.2)	14 (60.9)		26 (61.9)	46 (52.9)		4 (40.0)	66 (59.5)	
Schizophreniform	32 (30.5)	6 (26.1)		13 (31.0)	25 (28.7)		6 (60.0)	28 (25.2)	
Schizoaffective	5 (4.8)	–		–	5 (5.7)		–	5 (4.5)	
Psychosis NOS	4 (3.8)	–		–	5 (5.7)		–	3 (2.7)	
Brief psychosis	6 (5.7)	3 (13.0)		3 (7.1)	6 (6.9)		–	9 (8.1)	
Antipsychotic treatment									
Aripiprazole	10 (9.5)	2 (8.7)		9 (10.3)	4 (9.5)		–	12 (10.8)	
Risperidone	25 (23.8)	6 (26.1)		23 (26.4)	7 (16.7)		4 (40.0)	25 (22.5)	
Olanzapine	25 (23.8)	4 (17.4)		14 (16.1)	15 (35.7)		2 (20.0)	26 (23.4)	
Quetiapine	10 (9.5)	2 (8.7)		9 (10.3)	3 (7.1)		1 (10.0)	11 (9.9)	
Ziprasidone	13 (12.4)	4 (17.4)		14 (16.1)	4 (9.5)		1 (10.0)	12 (10.8)	
Haloperidol	22 (21.0)	5 (21.7)		18 (20.7)	9 (21.4)		2 (20.0)	25 (22.5)	

Statistical significance  $p < 0.05$ . \*Statistical analysis: ANOVA/Chi-square for difference between clustered-genotype groups.

DUP: duration of untreated psychosis; SCID: structured clinical interview for DSM-IV; psychosis NOS: psychosis not otherwise specified.



**Fig. 1.** (a) Performance of patients (mean Z scores) in Backwards Digits Scale (WAIS) at Baseline and 3 Years, based on rs1000731 genotype. (b) Performance of patients (mean Z scores) in Continuous Performance Test at Baseline and 3 Years, based on rs1000731 genotype.



**Fig. 2.** Performance of patients (mean Z scores) in Grooved Pegboard Handedness Test at Baseline and 3 Years, based on rs821616 genotype.

other significant associations were found with the remaining cognitive domains studied.

No associations between the rs6675281 genotypes and cognitive performance were found using longitudinal analysis.

### 3.3. Cross-sectional differences between the genotypes at the two time points (baseline and 3-year)

When analysing the rs1000731 *DISC1* gene polymorphism and cognitive performance at baseline, we found statistically significant associations between the genotypes and performance in Working Memory ( $F = 6.827$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.010$ ;  $d_{\text{Cohen}} = -0.548$ ), although not surviving multiple testing correction, and Attention

( $F = 9.033$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.003$ ;  $d_{\text{Cohen}} = -0.619$ ). Post hoc analyses showed that patients homozygous for the G allele scored significantly higher in Continuous Performance Test, compared to patients carrying the A allele ( $p = 0.003$ ) at baseline. However, we failed to observe any significant difference in these cognitive domains 3 years after the initiation of treatment.

With regard to the rs821616 polymorphism, we found a significant association between the genotypes and performance in Motor Dexterity at baseline ( $F = 8.246$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.005$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 0.406$ ). Post hoc comparisons revealed that patients homozygous for the A allele showed significant lower scores in the Grooved Pegboard Handedness test, compared to patients carrying the T allele ( $p = 0.005$ ). However, we failed to observe this difference at 3 years after the initiation of treatment.

## 4. Discussion

Our study detected a significant association between two *DISC1* gene polymorphisms, rs821616 (Ser704Cys) and rs1000731 and a long-term course (3 years) of cognitive performance in a well-defined Spanish Caucasian population.

Patients homozygous for the G allele (rs1000731) presented a better cognitive performance in the Attention domain at baseline. This result contrasted from a previous study in which the homozygous HEP1 haplotype (including the G allele for rs1000731) was negatively associated with semantic clustering of items during verbal learning and memory and with verbal learning and memory in general [17]. However, when we analysed the interaction Time  $\times$  Genotype, we obtained results that were consistent with the above-mentioned study [17]. Furthermore, patients homozygous for the G allele showed a poorer outcome over time in the Working Memory and Attention domains, while carriers of the A allele presented an increase in these domain scores after 3 years of treatment initiation.

With regard to rs821616, cross-sectional analyses revealed that patients homozygous for the Ser allele performed significantly worse at baseline compared to Cys carriers. This result confirmed previous data indicating that Ser/Ser schizophrenia-spectrum patients exhibit worse performance in logical memory [14], verbal fluency and visuospatial tasks [46] compared to Cys carriers. Consistent with these findings, a previous study based on a healthy subjects sample found that the Cys allele was associated with higher scores in the verbal reasoning task [61].

However, longitudinal analyses demonstrated unexpected results for rs821616. Patients homozygous for the risk allele (Ser allele) showed better cognitive performance (Motor Dexterity domain) over time compared to Cys carriers. Considering that the Ser allele is a risk allele, we expected that these patients performed worse at baseline and would present poorer evolution over time.

A potential explanation for our longitudinal results may be that the Ser allele is a risk factor for presenting a worse clinical onset with poorer cognitive performance, but it most likely does not represent a further handicap for the cognitive treatment response over a long period of time. Data obtained from longitudinal studies suggest that cognitive function may improve [60,9], or at least remains stably impaired in individuals with schizophrenia [66].

Another unforeseen result was the differentiated effect of the SNPs studied on diverse cognitive domains. The neurocognitive tests selected for this study represent specific cognitive domains involving specific functional connectivity neural circuits. Although there is sufficient evidence of *DISC1* involvement in neuroplasticity and neurodevelopment processes, there is still no clear knowledge of whether specific *DISC1* polymorphisms have an effect on specific functional connectivity neural circuits. Thus, Liu et al. [37] provided consistent evidence that the *DISC1* Ser704Cys polymorphism affects thalamic-prefrontal circuits in humans. Moreover,

previous neuroimaging genetic studies provided evidence of a Ser/Ser association with brain differences in areas of the motor cortex [58,33], which may, to some extent, be the structural basis for the poorer performance observed in the Motor Dexterity domain.

Consistent with these findings, rs1000731 has been associated with grey matter reductions in the superior and inferior frontal gyri [17], while the prefrontal cortex has been consistently implicated in Working Memory and Attention deficits in schizophrenia [39,54]. This may be a potential structural explanation for the performance differences observed in Working Memory and Attention in the present study.

We cannot compare our results with those obtained in previous studies, as no studies to date have reported on the effect of the *DISC1* gene on longitudinal changes in cognitive performance.

We found no associations between the rs6675821 polymorphism and neurocognitive performance in our sample. Previous studies on the potential effect of rs6675281 on cognitive performance showed inconsistent results. Cannon et al. [17] showed that a haplotype containing this SNP was significantly associated with verbal learning and memory in a schizophrenia sample. However, Hennah et al. [30] did not identify any significant association between the same haplotype and visual attention and working memory. Nicodemus et al. [44] found an association with verbal fluency in controls, but failed to observe a significant association in the schizophrenia sample. Although Brauns et al. [12] found increased neural activity in the prefrontal cortex during the working memory task in patients carrying the Phe allele, they did not observe any genotype differences in working memory performance.

In summary, variations in *DISC1* gene polymorphisms determine differences in the long-term course in cognitive performance; thus, we found that patients homozygous for the G allele of rs1000731 and patients who carry polymorphisms of the T allele of rs821616 *DISC1* gene presented a worse long-term course in cognitive performance after 3 years of treatment initiation.

Currently, it is established that the *DISC1* gene encodes a scaffold protein that interacts with multiple proteins (*DISC1* Interactome) involved in neurodevelopment and neurosignalling processes [19,16,42,56]. Thus, the effect of *DISC1* sequence variability should be interpreted in the context of multiple gene-gene interactions, in which the final role of one gene/protein is dependent on its weight within a specific biological pathway. Furthermore, because the *DISC1* protein is predominantly expressed in the hippocampus and cerebral cortex [62], it could be hypothesized that genetic variants can modify protein availability and, consequently, alter the efficiency of the pathways in which the protein is implicated in a more specific manner in these brain areas. As previously described, *DISC1* peripheral expression is lower in patients with schizophrenia [50,43], and this lower *DISC1* expression is correlated with reduced expression of some *DISC1* partner proteins in these brain areas [35] as well as with cognitive performance and N-back-elicited activity in the pre-frontal cortex [50]. Interestingly, *DISC1* polymorphisms have been associated with structural variations in brain areas related to cognitive processes, mainly the prefrontal cortex and hippocampus [23], as well as with brain functional abnormalities during cognitive tasks performance in healthy subjects and patients with psychosis, which has been suggested to be a potential indicator of less efficient brain function [15,49,22,12].

Taken together, these findings argue that variations in the *DISC1* gene, may affect neurodevelopmental and neurosignalling processes, which may produce differences in the structural and functional processes of the brain, resulting in less efficient brain networks that ultimately may underlie the cognitive deficits observed in psychosis. Two recent studies found that *DISC1* was associated to significant differences in white matter integrity as

measured using diffusion tensor-magnetic resonance imaging [64,57], suggesting that changes in white matter may produce deficiencies in the transmission of information between different brain regions and thus reflect variations in cognitive performance [32].

These results should be interpreted with caution; this study should be replicated in larger samples and other *DISC1* polymorphisms should be included in the study to obtain a more accurate representation of *DISC1* gene variability.

Genotype clustering was performed to facilitate a comparison with previous studies, formed unbalanced groups, which may affect the subsequent statistical analyses, and thus represent a potential caveat to the study.

Moreover, the most accepted explanatory model for schizophrenia postulates the converging action of multiple, small size factors (genes and environment). Thus, a complex endophenotype, such as neurocognition could not be explained by the effect of a single gene. Other factors, which are not the subject of this study, may also affect the cognitive course in this sample.

The sample used in this study, which was formed by a wide range of non-affective psychosis diagnosis, might be a caveat in the study because the results obtained might be less specific of the core schizophrenia diagnosis sub-sample. However, this study aimed to identify associations between variations in the *DISC1* gene and neurocognitive impairment in a wide scope non-affective psychosis and not associations in a more restricted sample.

An additional flaw in our study may involve the performance of multiple tests. However, we have applied Bonferroni correction for multiple testing, despite of which the majority of the results maintained their statistical significance.

Finally, we did not have a healthy control sample, and thus, we were not able to compare healthy subjects from psychosis patients with the same genotype.

In conclusion, this study showed a significant association of *DISC1* gene polymorphisms (rs821616 and rs1000731) with differences in the long-term course of neurocognitive deficits observed at the presentation of the first episode of psychosis. Thus, *DISC1* gene variations may modulate the cognitive performance related to psychosis.

#### Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

The present study was performed at the Hospital Marques de Valdecilla, University of Cantabria, Santander, Spain, under the following Grant support: SENY Fundacio Research Grant 2005, Instituto de Salud Carlos III, FIS 00/3095, 03/1009, and PI06/0507, and Fundación Marques de Valdecilla A/02/07 and API 07/11. Thanks to the Comissionat per a Universitats i Recerca del DIUE (2014SGR1636).

We thank the Spanish Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) for carrying out the molecular genetic analysis.

#### References

- [1] Addington J, Saeedi H, Addington D. The course of cognitive functioning in first episode psychosis: changes over time and impact on outcome. *Schizophr Res* 2005;78:35–43.
- [2] Albus M, Hubmann W, Mohr F, Hecht S, Hinterberger-Weber P, Seitz NN, et al. Neurocognitive functioning in patients with first-episode schizophrenia: results of a prospective 5-year follow-up study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006;256(7):442–51.
- [3] Allott K, Liu P, Proffitt TM, Killackey E. Cognition at illness onset as a predictor of later functional outcome in early psychosis: systematic review and methodological critique. *Schizophr Res* 2011;125(2–3):221–35.

- [4] Austin CP, Ma L, Ky B, Morris JA, Shughrue PJ. DISC1 (Disrupted in Schizophrenia-1) is expressed in limbic regions of the primate brain. *Neuroreport* 2003;14:951–4.
- [5] Austin CP, Ma L, Ky B, Morris JA, Shughrue PJ. Expression of Disrupted-in-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development. *Neuroscience* 2004;124:3–10.
- [6] Ayesa-Arriola R, Pérez-Iglesias R, Rodríguez-Sánchez JM, Pardo-García G, Tabares-Seisdedos R, Ayuso-Mateos JL, et al. Predictors of neurocognitive impairment at 3 years after a first episode non-affective psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013;43:23–8.
- [7] Becker HE, Nieman DH, Wiltink S, Dingemans PM, van de Fliert JR, Velthorst E, et al. Neurocognitive functioning before and after the first psychotic episode: does psychosis result in cognitive deterioration? *Psychol Med* 2010;40(10):1599–606.
- [8] Bilder RM, Howe A, Novak N, Sabb F, Parker DS. The genetics of cognitive impairment in schizophrenia: a phenomic perspective. *Trends Cogn Sci* 2011;15(9):428–35.
- [9] Bonner-Jackson A, Grossman LS, Harrow M, Rosen C. Neurocognition in schizophrenia: a 20-year multi-follow-up of the course of processing speed and stored knowledge. *Compr Psychiatry* 2010;51(5):471–9.
- [10] Bora E, Yucel M, Pantelis C. Cognitive functioning in schizophrenia, schizoaffective disorder and affective psychoses: meta-analytic study. *Br J Psychiatry* 2009;195(6):475–82.
- [11] Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J Neurosci* 2009;29(41):12768–75.
- [12] Brauns S, Gollub RL, Roffman JL, Yendiki A, Ho BC, Wassink TH, et al. DISC1 is associated with cortical thickness and neural efficiency. *Neuroimage* 2011;57(4):1591–600.
- [13] Burdick KE, Hodgkinson CA, Szeszko PR, Lencz T, Ekholm JM, Kane JM, et al. DISC1 and neurocognitive function in schizophrenia. *Neuroreport* 2005;16:1399–402.
- [14] Callicott JH, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, et al. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:8627–32.
- [15] Callicott JH, Feighery EL, Mattay VS, White MG, Chen Q, Baranger DA, et al. DISC1 and SLC12A2 interaction affects human hippocampal function and connectivity. *J Clin Invest* 2013;123(7):2961–4.
- [16] Camargo LM, Collura V, Rain JC, Mizuguchi K, Hermjakob H, Kerrien S, et al. Disrupted in Schizophrenia 1 interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2007;12:74–86.
- [17] Cannon TD, Hennah W, van Erp TG, Thompson PM, Lonnqvist J, Huttunen M, et al. Association of DISC1/TRAX haplotypes with schizophrenia, reduced prefrontal gray matter, and impaired short- and long-term memory. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:1205–13.
- [18] Cegalis J, Bowlin J. *Vigil: software for the assessment of attention*. Nashua, NH: Forthright; 1991.
- [19] Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC1 locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 2008;13:36–64.
- [20] Crespo-Facorro B, Barbadillo L, Pelayo-Teran JM, Rodriguez-Sanchez JM. Neuropsychological functioning and brain structure in schizophrenia. *Int Rev Psychiatr* 2007;19:325–36.
- [21] Deary IJ, Yang J, Davies G, Harris SE, Tenesa A, Liewald D, et al. Genetic contributions to stability and change in intelligence from childhood to old age. *Nature* 2012;482(7384):212–5.
- [22] Di Giorgio A, Blasi G, Sambataro F, Rampino A, Papazacharias A, Gambi F, et al. Association of the Ser704Cys DISC1 polymorphism with human hippocampal formation gray matter and function during memory encoding. *Eur J Neurosci* 2008;28:2129–36.
- [23] Duff BJ, Macritchie KA, Moorhead TW, Lawrie SM, Blackwood DH. Human brain imaging studies of DISC1 in schizophrenia, bipolar disorder and depression: a systematic review. *Schizophr Res* 2013;147(1):1–13.
- [24] Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobbie DJ, et al. Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64(11):1242–50.
- [25] Haijma SV, Van Haren N, Cahn W, Koolschijn PC, Hulshoff Pol HE, et al. Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophr Bull* 2013;39:1129–38.
- [26] Heaton RK, Gladsjo JA, Palmer BW, Kuck J, Marcotte TD, Jeste DV. Stability and course of neuropsychological deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58(1):24–32.
- [27] Heinrichs RW, Zakzanis KK. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. *Neuropsychology* 1998;12(3):426–45.
- [28] Hennah W, Porteus D. The DISC1 pathway modulates expression of neurodevelopmental, synaptogenic and sensory perception genes. *PLoS ONE* 2009;4:e4906.
- [29] Hennah W, Varilo T, Kestila M, Paunio T, Arajarvi R, Haukka J, et al. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum Mol Genet* 2003;12:3151–9.
- [30] Hennah W, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Ekelund J, Varilo T, Partonen T, et al. A haplotype within the DISC1 gene is associated with visual memory functions in families with a high density of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2005;10:1097–103.
- [31] Hoff AL, Svetina C, Shields G, Stewart J, DeLisi LE. Ten year longitudinal study of neuropsychological functioning subsequent to a first episode of schizophrenia. *Schizophr Res* 2005;78(1):27–34.
- [32] Jung RE, Haier RJ. The parieto-frontal integration theory (P-FIT) of intelligence: converging neuroimaging evidence. *Behav Brain Sci* 2007;30(2):135–54. discussion 154–87.
- [33] Knickmeyer RC, Wang J, Zhu H, Geng X, Woolson S, Hamer RM, et al. Common variants in psychiatric risk genes predict brain structure at birth. *Cereb Cortex* 2014;24(5):1230–46.
- [34] Lezak MD. *Neuropsychological assessment*. O.U. Press; 1995.
- [35] Lipska BK, Peters T, Hyde TH, Halim N, Horowitz C, Mitkus S, et al. Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Hum Mol Genet* 2006;15:1245–58.
- [36] Liu YL, Fann CS, Liu CM, Chen WJ, Wu JY, Hung SI, et al. A single nucleotide polymorphism fine mapping study of chromosome 1q42.1 reveals the vulnerability genes for schizophrenia. GNPAT and DISC1: association with impairment of sustained attention. *Biol Psychiatry* 2006;60:554–62.
- [37] Liu B, Fan L, Cui Y, Zhang X, Hou B, Li Y, et al. DISC1 Ser704Cys impacts thalamic-prefrontal connectivity. *Brain Struct Funct* 2015;220(1):91–100.
- [38] Mackie S, Millar JK, Porteous DJ. Role of DISC1 in neural development and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:95–102.
- [39] Manoach DS. Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: reconciling discrepant findings. *Schizophr Res* 2003;60(2–3):285–98.
- [40] McIntosh AM, Gow A, Luciano M, Davies G, Liewald DC, Harris SE, et al. Polygenic risk for schizophrenia is associated with cognitive change between childhood and old age. *Biol Psychiatry* 2013;73(10):938–43.
- [41] Meshulam-Gately RI, Giuliano AJ, Goff KP, Faraone SV, Seidman LJ. Neurocognition in first-episode schizophrenia: a meta-analytic review. *Neuropsychology* 2009;23(3):315–36.
- [42] Millar JK, Christie S, Porteous DJ. Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:1019–25.
- [43] Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, et al. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signalling. *Science* 2005;310:1187–91.
- [44] Nicodemus KK, Elvevåg B, Foltz PW, Rosenstein M, Diaz-Asper C, Weinberger DR. Category fluency, latent semantic analysis and schizophrenia: a candidate gene approach. *Cortex* 2014;55:182–91.
- [45] Osterrieth PA. Contribution à l'étude de la perception et de la mémoire The test of copying a complex figure: a contribution to the study of perception and memory. *Arch Psychol* 1944;30:286–350.
- [46] Palo OM, Anttila M, Silander K, Hennah W, Kilpinen H, Soronen P, et al. Association of distinct allelic haplotypes of DISC1 with psychotic and bipolar spectrum disorders and with underlying cognitive impairments. *Hum Mol Genet* 2007;16:2517–28.
- [47] Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Ramírez-Bonilla M, González-Blanch C, Martínez-García O, Pardo-García G, et al. Epidemiological factors associated with treated incidence of first-episode non-affective psychosis in Cantabria: insights from the Clinical Programme on Early Phases of Psychosis. *Early Interv Psychiatry* 2008;2(3):178–87.
- [48] Plomin R, Deary IJ. Genetics and intelligence differences: five special findings. *Mol Psychiatry* 2015;20(1):98–108.
- [49] Prata DP, Mechelli A, Fu CH, Picchioni M, Kane F, Kalidindi S, et al. Effect of disrupted-in-schizophrenia-1 on pre-frontal cortical function. *Mol Psychiatry* 2008;13:915–7.
- [50] Rampino A, Walker RM, Torrance HS, Anderson SM, Fazio L, Di Giorgio A, et al. Expression of DISC1-interactome members correlates with cognitive phenotypes related to schizophrenia. *PLoS One* 2014;9(6):e99892.
- [51] Reitan RM, Wolfson D. *The Halstead-Reitan neuropsychological test battery: therapy and clinical interpretation*. Neuropsychological Press; 1985.
- [52] Rey A. *L'examen clinique en psychologie*. Presses Universitaires de France; 1964.
- [53] Rodríguez-Sánchez JM, Ayesa-Arriola R, Rézuez-Iglesias R, Periañez JA, Martínez-García O, Gomez-Ruiz E, et al. Course of cognitive deficits in first episode of non-affective psychosis: a 3-year follow-up study. *Schizophr Res* 2013;150:121–8.
- [54] Roiser JP, Wigton R, Kilner JM, Mendez MA, Hon N, Friston KJ, et al. Dysconnectivity in the frontoparietal attention network in schizophrenia. *Front Psychiatry* 2013;4:176.
- [55] Sánchez-Cubillo I, Periañez JA, Adrover-Roig D, Rodríguez-Sánchez JM, Ríos-Lago M, Tirapu J, et al. Construct validity of the Trail Making Test: role of task-switching, working memory, inhibition/interference control, and visuospatial abilities. *J Int Neuropsychol Soc* 2009;15(3):438–50.
- [56] Sawa A, Snyder SH. Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies. *Mol Med* 2003;9:3–9.
- [57] Sprooten E, Sussmann JE, Moorhead TW, Whalley HC, French-Constant C, Blumberg HP, et al. Association of white matter integrity with genetic variation in an exonic DISC1 SNP. *Mol Psychiatry* 2011;16(7):685–9.
- [58] Stacey D, Redlich R, Opel N, Grotegerd D, Arolt V, Kugel H, et al. No evidence of DISC1-associated morphological changes in the hippocampus, anterior cingulate cortex, or striatum in major depressive disorder cases and healthy controls. *J Affect Disord* 2014;166:103–7.

- [59] Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60(12):1187–92.
- [60] Szöke A, Trandafir A, Dupont ME, Méary A, Schürhoff F, Leboyer M. Longitudinal studies of cognition in schizophrenia: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 2008;192(4):248–57.
- [61] Thomson PA, Harris SE, Starr JM, Whalley LJ, Porteous DJ, Deary IJ. Association between genotype at an exonic SNP in DISC1 and normal cognitive aging. *Neurosci Lett* 2005;389:41–5.
- [62] Wang Q, Jaaro-Peled H, Sawa A, Brandon NJ. How has DISC1 enabled drug discovery? *Mol Cell Neurosci* 2008;37:187–95.
- [63] Weschsler D. *Weschler Adult Intelligence Scale-III*. The Psychological Corporation; 1997.
- [64] Whalley HC, Dimitrova R, Sprooten E, Dauvermann MR, Romaniuk L, Duff B, et al. Effects of a balanced translocation between chromosomes 1 and 11 disrupting the DISC1 locus on white matter integrity. *PLoS One* 2015;10(6):e0130900.
- [65] Woods SW. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 2003;64(6):663–7.
- [66] Zipursky RB, Reilly TJ, Murray RM. The myth of schizophrenia as a progressive brain disease. *Schizophr Bull* 2013;39(6):1363–72.



Variations in *Disrupted-in-Schizophrenia 1* gene modulate long-term longitudinal differences in cortical thickness in patients with a first-episode of psychosis. Vázquez-Bourgon J, Roiz-Santiáñez R, Papiol S, Ferro A, Varela-Gómez N, Fañanás L, Crespo-Facorro B. *Brain Imaging Behav.* 2015 Jul 26. doi: 10.1007/s11682-015-9433-1.

**TITLE: Variations in *Disrupted-in-Schizophrenia 1* gene modulate long-term longitudinal differences in cortical thickness in patients with a first-episode of psychosis.**

Javier Vázquez-Bourgon<sup>\*a,b,c</sup>, Roberto Roiz-Santiañez<sup>a,b,c</sup>, Sergi Papiol<sup>b,d,e</sup>, Adele Ferro<sup>f</sup>, Noemí Varela<sup>a,b,c</sup>, Lourdes Fañanás<sup>b,d</sup>, Benedicto Crespo-Facorro<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> University Hospital Marqués de Valdecilla, Department of Psychiatry, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

<sup>b</sup> CIBERSAM, Centro Investigación Biomédica en Red Salud Mental, Spain

<sup>c</sup> IDIVAL, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

<sup>d</sup> Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain.

<sup>e</sup> Institute of Psychiatric Phenomics and Genomics (IPPG) and Department of Psychiatry-Molecular Neurobiology. Ludwig Maximilian University of Munich, Munich, Germany.

<sup>f</sup> Department of Experimental Clinical Medicine, Inter-University Center for Behavioral Neurosciences (ICBN), University of Udine, Udine, Italy.

\*Corresponding author:

Javier Vázquez-Bourgon, MD

Department of Psychiatry, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL,

CIBERSAM, Centro Investigación Biomédica en Red Salud Mental, Spain,

School of Medicine, University of Cantabria, Avda.Valdecilla s/n, 39008.Santander, Spain.

Tel: +34-942-202537, Fax: +34-942-203447, E-mail: javazquez@humv.es

**Abstract**

Schizophrenia patients typically present a widespread bilateral cortical thinning from the early stages of the illness. However, there is controversy whether this reduction in cortical thickness (CT) is static or progressive over the evolution of the disorder. *Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)* is one of the main candidates genes for schizophrenia, as it has been found associated to the illness, and to several endophenotypes of the disorder including structural brain differences. This gene is known to be involved in neurodevelopment and brain maturation processes. We therefore hypothesized that variations in this gene modulate different progressions of CT in psychosis. Seventy-nine Caucasian drug-naive patients experiencing a first episode of non-affective psychosis were genotyped for rs6675281 (Leu607Phe) and rs821616 (Ser704Cys) SNPs of the *DISC1* gene. Brain MRIs were carried out at baseline and 3 years after initiating the treatment. Other clinical and socio-demographic variables were recorded to rule out possible confounding effects. Patients homozygous for the Leu allele of the rs6675281 SNP had a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in CT over the 3-years period, while those carrying the Phe allele presented an increase in CT. When combining the two SNPs we found a synergic effect on CT progression, presenting those patients homozygous for Leu607+Ser704 a more pronounced cortical thinning. In conclusion, *DISC1* gene variations may modulate the longitudinal changes in cortical thickness in patients suffering from a first episode of non-affective psychosis.

**Keywords:** Psychosis; Neuroimaging-genetics; Cortical thickness; *DISC1*

## **Introduction**

Studies on cortical thickness have shown widespread bilateral cortical thinning in patients with schizophrenia compared with healthy subjects. This reduction is more pronounced in the frontal and temporal areas (Rimol et al. 2012; Goldman et al. 2009). Moreover,

these differences are already present in the early stages of the illness, for instance in patients presenting a first episode of psychosis (FEP) (Crespo-Facorro et al. 2011). However, there is some discrepancy about whether the observed reduction in cortical thickness (CT) in people with schizophrenia is set at an early stage of neurodevelopment, or is, instead, progressive over the course of the illness. Indeed, several recent studies (Roiz-Santiañez et al. 2015; Nesvåg et al. 2012) reported no significant changes in CT over long time periods (3 and 5 years, respectively), while other investigations (Cobia et al. 2012; Van Haren et al. 2011) described progressive thinning of the cortex in schizophrenia patients. As schizophrenia is a brain disorder with high heritability, involving multiple genes (Gratten et al. 2014), it is possible that the observed variability in longitudinal changes in CT is mediated by the effect of genes involved in neurodevelopment and maturation processes (Bradshaw and Porteous, 2012; Chubb et al. 2008). Among the candidate genes, *Disrupted in Schizophrenia-1 (DISC1, 1q42.1)* is one of the most interesting because of its contribution to the risk of psychiatric disorders and the role of the protein it encodes. *DISC1* was first identified through the observation of a balanced translocation at t(1q42.1;11q14.3), which segregated with schizophrenia and other major mental illnesses in a large Scottish family (Millar et al., 2000; Blackwood et al., 2001). Subsequently, independent evidence for the involvement of the *DISC1* locus at 1q42.1 in schizophrenia-spectrum disorders came from linkage, case-control, and family-based association studies in different populations (Bradshaw and Porteous, 2012; Chubb et al., 2008). Although the accumulating genetic evidence is strongly positive, several studies have reported negative results (Vázquez-Bourgon et al., 2014; Bradshaw and Porteous, 2012; Chubb et al., 2008), and two recent large-scale genome-wide associations analyses on schizophrenia and broad psychosis phenotypes (Ripke et al.,

2013; Bramon et al., 2014) failed to show an association between *DISC1* and schizophrenia.

Aside from the above-mentioned controversy, *DISC1* is an interesting candidate gene in schizophrenia because of the role of the protein it encodes, which is involved in the regulation of multiple aspects of embryonic and adult neurogenesis, neurite outgrowth, and cortical development (Randall et al. 2014). Indeed, Raznahan and colleagues (2011) described a significant association between polymorphisms in *DISC1* and differences in the rate of cortical thinning in a sample of healthy subjects. The two missense polymorphisms investigated by Raznahan et al. (2011) (i.e.: rs6675281 and rs821616), have previously been associated with both the risk of schizophrenia-spectrum disorder (Johnstone et al. 2011) and several endophenotypes of the illness, including those related to neurocognition (Vázquez-Bourgon et al. submitted), clinical presentation (Vázquez-Bourgon et al. 2014), and structural (Mata et al. 2010) and functional brain differences (Duff et al. 2013). Thus, further investigation of *DISC1* gene variations (rs6675281 and rs821616) is warranted, as these polymorphisms may contribute to variability in the progression of changes in cortical thickness observed in people with schizophrenia. We hypothesized that variations in rs6675281 and rs821616 would determine different rates of cortical thinning over a long time period (3 years) in patients with first-episode psychosis.

## **Methods**

### *Subjects*

Patients were drawn from a large prospective longitudinal study on first-episode psychosis (PAFIP) (Pelayo-Terán et al. 2008). Patients presenting with a first episode of non-affective psychosis were admitted to the program if they fulfilled the following

criteria: 1) they were aged 15–60; 2) they met DSM-IV criteria (by means of the Structured Clinical Interview for DSM-IV, SCID-I) 6 months after inclusion for a principal diagnosis of schizophrenia, schizophreniform disorder, schizoaffective disorder, brief reactive psychosis, or psychosis not otherwise specified; 3) they were living in the catchment area around our institution; 4) they had not received prior treatment with antipsychotic medications; and 5) they were experiencing current psychotic symptoms of at least moderate severity, as assessed by one of the five items of the Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS). Patients were not admitted to the program if they presented with any of the following: 1) mental retardation; 2) neurological disorders; or 3) drug dependence (DSM-IV criteria).

Only those patients who underwent genomic DNA extraction and who completed MRI scans at baseline and 3 years after entering the program were included in this study.

Our study population consisted of 79 unrelated Caucasian subjects of Spanish origin. However, because of DNA exhaustion and genotyping problems, the sample was slightly reduced to 63 and 60 subjects for the imaging-genetics analyses with rs6675281 and rs821616, respectively.

Patients who were included in our analyses (N=79) were not significantly different from those who were not included (N=57) in terms of age, gender, age of illness onset, symptom severity (BPRS, SAPS, SANS), duration of untreated psychosis (DUP), and frequency of alcohol and cannabis use (data available upon request).

An experienced psychiatrist confirmed the diagnoses by means of the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I), 6 months after initial contact. At that point, the diagnostic breakdown of the patients was: schizophrenia (N=47, 59.5%), schizophreniform disorder (N=20, 25.3%), schizoaffective disorder (N=3, 3.8%), brief reactive psychosis (N=6, 7.6%), and psychosis not otherwise specified (N=3, 3.8%).

All subjects gave written informed consent prior to their inclusion in the study, which was approved by the local ethics committee.

Table 1. Baseline characteristics of the sample regarding rs6675281 and rs821616.

	Mean (SD) (n=79)	rs6675281			rs821616		
		Leu/leu (n=46)	Phe-Car (n=17)	Stat. <i>F</i> (p)	Ser/Ser (n=4)	Cys-Car (n=56)	Stat. <i>F</i> (p)
Age	30.7 (8.6)	29.3 (7.5)	32.7 (9.7)	2.24 (0.14)	27.7 (2.6)	29.7 (7.9)	0.25 (0.62)
Age of onset	29.5 (8.1)	28.1 (7.0)	31.3 (8.9)	2.26 (0.14)	27.3 (2.4)	28.4 (7.3)	0.09 (0.77)
DUP (months)	13.6 (19.2)	13.9 (17.3)	16.6 (28.9)	0.21 (0.65)	3.4 (4.1)	14.1 (20.2)	1.09 (0.30)
DUI (months)	26.2 (28.2)	31.2 (30.2)	22.4 (28.8)	1.01 (0.30)	11.9(10.4)	27.6 (30.2)	1.06 (0.31)
Intracranial volume	1370.9 (132.6)	1387.9 (138.2)	1336.2 (130.4)	1.79 (0.18)	1471.2 (173.7)	1370.5 (135.4)	1.99 (0.16)
SAPS (baseline)	13.8 (4.3)	14.4 (5.4)	13.6 (4.8)	0.45 (0.50)	14.7 (3.8)	13.8 (4.4)	0.19 (0.66)
SANS (baseline)	6.6 (5.3)	7.2 (5.4)	5.3 (5.0)	1.49 (0.23)	6.0 (4.8)	6.2 (5.4)	0.01 (0.94)
BPRS (baseline)	62.8 (12.4)	63.9 (13.1)	61.1 (13.6)	0.56 (0.46)	58.5 (9.8)	61.6 (12.9)	0.22 (0.64)
Accumulative chlorpromazine equivalent doses	220741.2 (147570.7)	238585.7 (178907)	214133.8 (87120.3)	0.29 (0.59)	338679.7 (98413.7)	230446.5 (161023.7)	1.74 (0.19)
	N (%)			Stat. $\chi^2$ (p)			Stat. $\chi^2$ (p)
Gender (male)	49 (62.0)	33 (71.7)	9 (52.9)	1.97 (0.13)	4 (100)	37 (66.1)	1.99 (0.21)
Laterality (right handed)	70 (88.6)	41 (89.1)	14 (82.4)	0.51 (0.37)	3 (75.0)	51 (91.1)	1.07 (0.35)
Educational level (low)	38 (48.1)	24 (52.2)	8 (47.0)	0.13 (0.72)	4 (100)	25 (44.6)	4.58 (0.10)
Alcohol consumers	45 (57.0)	30 (65.2)	8 (47.1)	1.71 (0.15)	3 (75.0)	36 (64.3)	0.19 (0.56)
Cannabis consumers	35 (44.3)	23 (50.0)	7 (41.2)	0.39 (0.37)	2 (50.0)	29 (51.8)	0.01 (0.67)

DUP: Duration of Untreated Psychosis; DUI: Duration of Untreated Illness; SAPS: Scale for the Assessment of Positive Symptoms; SANS: Scale for the Assessment of Negative Symptoms; BPRS: Brief Psychiatric Rating Scale.

### *Genetic analyses*

DNA was extracted from whole venous blood samples. We genotyped the *DISC1* single nucleotide polymorphisms (SNPs, GenBankdbSNP: rs6675281 and rs821616) using the

fluorogenic 5'nuclease method (TaqMan® technology, Applied Biosystems), reagents obtained from Applied Biosystems (ABI), and TaqMan Universal PCR Master Mix.

To facilitate comparison with previous imaging-genetic investigations (Raznahan et al. 2011; Brauns et al. 2011) of these variants, participants were grouped as Phe carriers vs. Leu homozygotes (Phe-Car vs Leu/Leu) for rs6675281, and Cys carriers vs. Ser homozygotes (Cys-Car vs Ser/Ser) for rs821616.

#### *MRI acquisition and image processing*

All MRI scans were obtained at the University Hospital of Cantabria using a 1.5 Tesla General Electric SIGNA System (GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA). We designed an MRI protocol (T1, T2, and PD sequences) to optimize discrimination between gray matter, white matter, and cerebrospinal fluid. Imaging parameters are described in the supplementary material (ESM\_1).

Image processing was performed using BRAINS2 (Magnotta et al. 2002). A detailed description of image analysis methods has been reported elsewhere (Crespo-Facorro et al., 2011) and is included with this manuscript as electronic supplementary material (ESM\_1).

#### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 15). Statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

We used a chi-squared test to evaluate the genotype frequencies of *DISC1* polymorphisms with respect to the Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE).

We conducted a general linear model (GLM) repeated-measure procedure for each dependent variable (total cortical thickness, and frontal, temporal, parietal, and occipital cortical thickness) separately, with genotype group as the between-subject variable and time (baseline, 3-year follow-up) as the within-subject variable. We examined the overall effects of time (longitudinal dimension), as well as time by genotype group (interaction effect). Sex and age at the initial MRI were included as covariates. All post-hoc comparisons were subjected to the Bonferroni correction.

To further investigate the possible synergic effect of the two *DISC1* polymorphisms, we repeated our statistical analyses of association clustering by combining the two SNP genotypes into three groups. We followed the same criteria as in Raznahan and colleagues (2011): Leu/Leu+Ser/Ser; Leu/Leu+Cys-Car or Ser/Ser+Phe-Car; Phe-Car+Cys-Car.

To examine cross-sectional differences between genotypic subgroups in cortical thickness at baseline and at a 3-year follow-up, we performed a one-way analysis of the covariance (ANCOVA). In each GLM, the dependent measures were the CT variables and the independent measures were the genotypes. Sex and age at the initial MRI session were included as covariates.

## **Results**

We found no significant differences between genotype groups with regard to age, gender, intracranial volume, laterality, educational level, alcohol or cannabis use, or negative and positive symptoms (all  $p > 0.05$ ), as shown in Table 1.

Patients were in Hardy-Weinberg equilibrium for the polymorphisms studied. Genotypic and allelic frequencies were as expected for the ethnic population studied (according to HapMap CEU population; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### *Association with long-term cortical thinning*

We found a significant interaction between the rs6675281 genotype and time in total cortical thickness ( $F=8.812$ ;  $p=0.004$ ) as well as frontal ( $F=7.669$ ;  $p=0.007$ ) and temporal cortex thickness ( $F=11.510$ ;  $p=0.001$ ). Additionally, we found a trend-level interaction between the rs6675281 genotype and time in the parietal cortex ( $F=3.404$ ;  $p=0.070$ ) (Table 2). Post-hoc analyses revealed that patients who were homozygous for the Leu allele (73% of patients) exhibited a reduction in cortical thickness overall ( $p=0.055$ ), as well as in the temporal ( $p=0.005$ ) and parietal ( $p=0.081$ ) cortex regions over a 3-year period. Patients carrying the Phe allele (27% of patients) exhibited incremental changes in cortical thickness overall ( $p=0.024$ ), as well as in the frontal ( $p=0.010$ ) and temporal ( $p=0.027$ ) regions over the 3-year follow-up period.

Regarding rs821616 polymorphism, we did not find a significant interaction between genotype and time. Additional data are given in Online Resource 2 (ESM\_2).

When combining the two polymorphisms, rs6675281 and rs821616, our longitudinal analyses revealed a significant association between the rs6675281/rs821616 genotypes and time in terms of total cortical thickness ( $F=3.99$ ;  $p=0.025$ ), as well as in the frontal ( $F=3.67$ ;  $p=0.032$ ) and temporal cortices ( $F=4.73$ ;  $p=0.013$ ). These data are available as supplementary material (ESM\_2). Post-hoc analyses revealed that “Leu/Leu+Ser/Ser” patients and those in the clustered group “Leu/Leu+Cys-Car or Ser/Ser+Phe-Car” exhibited a reduction in cortical thickness in all brain regions studied, while “Phe-Car+Cys-Car” patients exhibited significant increases in total cortical thickness, as well as in frontal and temporal cortical thickness ( $p=0.021$ ;  $p=0.008$ ; and  $p=0.041$ , respectively).

Our results were similar when we introduced relevant clinical factors that may impact CT changes (i.e., cannabis and alcohol consumption, accumulative chlorpromazine equivalent doses) as covariates in the analyses.

*Cross-sectional differences between genotypes at baseline and at a 3-year follow-up*

We found no significant differences between the genotypic subgroups in any of the brain regions studied either at baseline (all  $F \leq 2.67$ ; all  $p \geq 0.1$ ) or at follow-up (all  $F \leq 1.21$ ; all  $p \geq 0.3$ ) time points. Additional data are given in Online Resource 2 (ESM\_2).

Table 2. Effect of rs6675281 on long-term cortical thickness progression.

	Baseline			3 years			Time x genotype
	Leu/Leu (n=46)	Phe/Car (n=17)	Stat.	Leu/Leu (n=46)	Phe/Car (n=17)	Stat.	Stat.
	Mean (SD)	Mean (SD)	F (p)	Mean (SD)	Mean (SD)	F (p)	F (p)
Total CT	4.02 (0.39)	3.86 (0.28)	1.53 (0.22)	3.96 (0.36)	3.96 (0.28)	0.82 (0.37)	8.81 (0.004)
Frontal CT	4.21 (0.43)	4.05 (0.36)	1.31 (0.26)	4.18 (0.41)	4.19 (0.33)	0.92 (0.34)	7.67 (0.007)
Temporal CT	4.33 (0.52)	4.06 (0.37)	2.67 (0.11)	4.21 (0.46)	4.21 (0.37)	0.34 (0.56)	11.51 (0.001)
Parietal CT	3.75 (0.39)	3.63 (0.35)	0.68 (0.41)	3.69 (0.35)	3.69 (0.25)	0.51 (0.48)	3.40 (0.070)
Occipital CT	3.19 (0.34)	3.20 (0.28)	0.16 (0.69)	3.14 (0.31)	3.18 (0.32)	0.56 (0.46)	0.11 (0.74)

CT: Cortical thickness

## Discussion

We detected a significant association between a functional *DISC1* gene polymorphism, rs6675281 (Leu607Phe), and long-term (3 years) longitudinal changes in cortical thickness. These changes in CT were generalized, although they were especially prominent in the frontal and temporal brain regions in a well-defined Spanish Caucasian population.

Patients who were homozygous for the Leu allele of the rs6675281 polymorphism exhibited a decrease in cortical thickness over the 3-year period, while those carrying the Phe allele presented an overall increase in cortical thickness over time, which was

especially prominent in the frontal, temporal, and parietal lobes. Consistent with this, Raznahan and colleagues (2011) observed that the rate of cortical thinning was attenuated in the frontal and parietal lobes (left angular gyri) of healthy subjects carrying the Phe allele.

The reduction in cortical thickness reported here is comparable with the results of previous longitudinal studies of schizophrenia-spectrum disorders (Cobia et al. 2012; Gutierrez Galve et al., 2015; Nesvag et al. 2012; van Haren et al. 2011).

As mentioned above, patients who were Phe carriers showed an increase in cortical thickness during the 3-year follow-up period. Although this result was somewhat contrary to our expectations, several previous structural brain studies focused on schizophrenia (Keshavan et al. 1998; Schaufelberger et al. 2011) have suggested that brain structural anomalies present at illness onset might be restorable. A recent longitudinal study investigating the effects of short-term atypical treatment of schizophrenia on cortical thickness found that patients displayed a significant increase in cortical thickness over 8 weeks of treatment compared with controls (Goghari et al. 2013). Chronic stress (Blix et al. 2013), diet (Sizonenko et al. 2013), and cognitive activity (Engvig et al. 2010) have been described as variable factors that might also influence cortical thickness.

In this study, we did not observe any significant associations between cortical thinning and rs821616 variations. Nonetheless, when combining the two polymorphisms, we found a genotype gradation effect on the rate of cortical thinning over the 3-year period. Phe-Car+Cys-Car patients showed a significant increase in cortical thickness in several brain regions. The remaining patients showed decrements in cortical thickness, although these reductions were most prominent in Ser/Ser+Leu/Leu patients. Again, these results

are in agreement with the study by Raznahan et al. (2011), in which subjects carrying the Phe and Cys alleles (i.e., Phe-Car+Cys-Car) exhibited a reduced rate of cortical thinning in the orbito-frontal, middle temporal, and superior parietal cortices.

Cross-sectional analyses at both time points failed to reveal a significant change in brain structure in any of the genotypic subgroups. Consistent with this, previous rs821616 studies also found no association between gene variation and brain structure (Chakravarty et al. 2012; Kahler et al. 2012). Regarding rs6675281, several previous studies reported contrasting findings. For instance, Chakravarty and colleagues (2012) found no significant differences according to genotype, while Brauns and colleagues (2011) found that subjects carrying the Phe allele had significantly reduced cortical thickness in the left supramarginal gyrus compared with subjects carrying Leu/Leu homozygotes.

Currently, the *DISC1* gene is known to encode for a scaffold protein that interacts with multiple proteins (DISC1 Interactome) involved in neurodevelopment and neuro-signaling processes (Bradshaw & Porteous, 2012; Jaaro-Peled et al. 2009; Chubb et al., 2008; Camargo et al., 2007; Millar et al., 2003; Sawa et al., 2003). Studies with animal models have demonstrated a relationship between *DISC1* mutations and morphological and histological brain changes that are reminiscent of schizophrenia, thus supporting the involvement of the *DISC1* gene in cortical development and maturation (Lee et al. 2011; Niwa et al. 2010). The DISC1 protein is expressed in neurons in the brain, predominantly in the hippocampus and cerebral cortex (Wang et al., 2008). DISC1 expression has been shown to be lower in patients with schizophrenia (Rampino et al., 2014; Millar et al., 2005). Additionally, lower DISC1 expression is correlated with lower expression of some DISC1 partner proteins in the above-mentioned brain areas (Lipska et al., 2006).

Variations in the functional *DISC1* polymorphism Leu607Phe may have an effect, through the lesser expression of interacting proteins, on neurodevelopment processes in the cortex. This would ultimately affect cortical thickness. Indeed, previous studies have shown an association between the Phe allele and gray matter volume (Troost et al., 2013), reduced cortical thickness (Brauns et al., 2011), and the rate of cortical thickening (Raznahan et al., 2011).

Our sample size, although reasonably large for a neuroimaging study, is relatively modest for a genetic study. Additionally, we did not have a healthy control sample, so we were not able to compare healthy subjects with psychosis patients with the same genotype. These issues, together with the lack of statistical power, might have limited our ability to find significant differences. Therefore, our results should be interpreted with caution, and the study should be replicated with a larger sample.

The most broadly accepted explanatory model for schizophrenia postulates the converging action of several factors (i.e., those related to genes and the environment). In this sense, a complex endophenotype such as cortical thickness is not likely to be explained by the effect of a single gene. Other factors beyond the scope of this study may also have affected the differences in cortical thickness observed in the sample. For instance, we did not address the potentially confounding effect of antipsychotic treatment on CT changes, although a recent study in the same sample (Roiz-Santiañez et al. 2012) found no differences in CT between treatment groups at a 1-year follow-up. Additionally, other *DISC1* polymorphisms should be included in a future study, forming haplotypes, to obtain a bigger representation of the *DISC1* gene.

In conclusion, we found a significant association between the *DISC1* gene polymorphism rs6675281 alone, and the combination of rs6675281 and rs821616, and differences in

long-term cortical thickness growth. We observed an overall difference in cortical thickness, as well as heightened disparities in the frontal and temporal brain regions. Therefore, *DISC1* gene variations may modulate cortical thinning in people with psychosis.

### **Acknowledgments**

The present study was performed at the Hospital Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, Santander, Spain, under the following Grant support: SENY Fundacio Research Grant 2005, Instituto de Salud Carlos III, FIS 00/3095, 03/1009, PI06/0507, and PI14/00639, and Fundación Marques de Valdecilla A/02/07 and API 07/11. We thank Valdecilla Biobank for providing the biological samples and associated data included in this study and IDIVAL Neuroimaging Unit for its help in the technical execution of this work. We thank the Comissionat per a Universitats i Recerca del DIUE (2014SGR1636), and the Spanish Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) for carrying out the genetic analysis.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- Blackwood, D.H., Fordyce, A., Walker, M.T., St Clair, D.M., Porteous, D.J., Muir, W.J. (2001). Schizophrenia and affective disorders cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *American Journal of Human Genetics*, 69, 428–433.
- Blix, E., Perski, A., Berglund, H., Savic, I. (2013). Long-term occupational stress is associated with regional reductions in brain tissue volumes. *PLoS One*, 8(6), e64065.

Bradshaw, N.J., and Porteous, D.J. (2012). DISC1-binding proteins in neural development, signaling and schizophrenia. *Neuropharmacology*, 62(3), 1230–1241.

Brauns, S., Gollub, R.L., Roffman, J.L., Yendiki, A., Ho, B-C., Wassink, T.H., et al. (2011). DISC1 is associated with cortical thickness and neural efficiency. *Neuroimage*, 57(4), 1591–1600.

Camargo, L.M., Collura, V., Rain, J-C., Mizuguchi, K., Hermjakob, H., Kerrien, S., et al. (2007). Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 12, 74–86.

Chakravarty, M.M., Felsky, D., Tampakeras, M., Lerch, J.P., Mulsant, B.H., Kennedy, J.L., Voineskos, A.N. (2012). DISC1 and Striatal Volume: A Potential Risk Phenotype For mental Illness. *Frontiers in Psychiatry*, 3, 57.

Chubb, J.E., Bradshaw, N.J., Soares, D.C., Porteous, D.J., Millar, J.K. (2008). The DISC locus in psychiatric illness. *Molecular Psychiatry*, 13(1), 36-64.

Cobia, D.J., Smith, M.J., Wang, L., Csernansky, J.G. (2012). Longitudinal progression of frontal and temporal lobe changes in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 139, 1-6.

Crespo-Facorro, B., Roiz-Santiáñez, R., Pérez-Iglesias, R., Rodríguez-Sanchez, J.M., Mata, I., Tordesillas-Gutierrez, D., et al. (2011). Global and regional cortical thinning in

first-episode psychosis patients: relationships with clinical and cognitive features. *Psychological Medicine*, 41(7), 1449-1460.

Duff, B.J., Macritchie, K.A., Moorhead, T.W., Lawrie, S.M., Blackwood, D.H. (2013). Human brain imaging studies of DISC1 in schizophrenia, bipolar disorder and depression: A systematic review. *Schizophrenia Research*, 147(1), 1-13.

Engvig, A., Fjell, A.M., Westlye, L.T., Moberget, T., Sundseth, Ø., Larsen, V.A., Walhovd, K.B. (2010). Effects of memory training on cortical thickness in the elderly. *Neuroimage*, 52(4), 1667-1676.

Goghari, V.M., Smith, G.N., Honer, W.G., Kopala, L.C., Thornton, A.E., Su, W., et al. (2013). Effects of eight weeks of atypical antipsychotic treatment on middle frontal thickness in drug-naïve first-episode psychosis patients. *Schizophrenia Research*, 149(1-3), 149-155

Goldman, A.L., Pezawas, L., Mattay, V.S., Fisl, B., Verchinski, B.A., Chen, Q., et al. (2009). Widespread reductions of cortical thickness in schizophrenia and spectrum disorders and evidence of heritability. *Archives General Psychiatry*, 66, 467-477.

Gratten, J., Wray, N.R., Keller, M.C., Visscher, P.M. (2014). Large-scale genomics unveils the genetic architecture of psychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 17(6), 782-790.

Gutiérrez-Galve, L., Chu, E.M., Leeson, V.C., Price, G., Barnes, T.R., Joyce, E.M., Ron, M.A. (2015). A longitudinal study of cortical changes and their cognitive correlates in patients followed up after first-episode psychosis. *Psychological Medicine*, 45(1), 205-216.

Jaaro-Peled, H., Hayashi-Takagi, A., Seshadri, S., Kamiya, A., Brandon, N.J., Sawa, A. (2009). Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends in Neuroscience*, 32(9), 485-495.

Johnstone, M., Thomson, P.A., Hall, J., McIntosh, A.M., Lawrie, S.M., Porteous, D.J. (2011). DISC1 in schizophrenia: genetic mouse models and human genomic imaging. *Schizophrenia Bulletin*, 37(1), 14-20.

Kahler, A.K., Rimol, L.M., Brown, A.A., Djurovic, S., Hartberg, C.B., Melle, I., et al. (2012). Effect of DISC1 SNPs on Brain Structure in Healthy Controls and Patients with a History of Psychosis. *American Journal of Medical Genetics Part B*, 159B,722–730.

Keshavan, M.S., Haas, G.L., Kahn, C.E., Aguilar, E., Dick, E.L., Schooler, N.R., et al. (1998). Superior temporal gyrus and the course of early schizophrenia: progressive, static, or reversible? *Journal Psychiatry Research*, 32(3-4), 161-167.

Lee, F.H., Fadel, M.P., Preston-Maher, K., Cordes, S.P., Clapcote, S.J., Price, D.J., et al. (2011). Disc1 point mutations in mice affect development of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 31(9), 3197-3206.

Lipska, B.K., Peters, T., Hyde, T.H., Halim, N., Horowitz, C., Mitkus, S., et al. (2006). Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Human Molecular Genetics*, 15,1245–1258.

Magnotta, V.A., Harris, G., Andreasen, N.C., O'Leary, D.S., Yuh, W.T., Heckel, D. (2002). Structural MR image processing using the BRAINS2 toolbox. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 26, 251–264.

Mata, I., Perez-Iglesias, R., Roiz-Santiañez, R., Tordesillas-Gutierrez, D., Gonzalez-Mandly, A., Berja, A., et al. (2010). Additive effect of NRG1 and DISC1 genes on lateral ventricle enlargement in first episode schizophrenia. *Neuroimage*, 53(3), 1016-1022.

Millar, J.K., Wilson-Annan, J.C., Anderson, S., Christie, S., Taylor, M.S., Semple, C.A., Devon, R.S., Clair, D.M., Muir, W.J., Blackwood, D.H., Porteous, D.J. (2000). Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 9, 1415–1423.

Millar, J.K., Christie, S., and Porteous, D.J. (2003). Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311, 1019–1025.

Millar, J.K., Pickard, B.S., Mackie, S., James, R., Christie, S., Buchanan, S.R., et al. (2005). DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signalling. *Science*, 310(5751), 1187-1191.

Nesvåg, R., Bergmann, Ø., Rimol, L.M., Lange, E.H., Haukvik, U.K., Hartberg, C.B., et al. (2012). A 5-year follow-up study of brain cortical and subcortical abnormalities in a schizophrenia cohort. *Schizophrenia Research*, 142(1-3), 209-216.

Niwa, M., Kamiya, A., Murai, R., Kubo, K., Gruber, A.J., Tomita, K., et al. (2010). Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic

maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron*, 65(4), 480-489.

Pelayo-Terán, J.M., Pérez-Iglesias, R., Ramírez-Bonilla, M., González-Blanch, C., Martínez-García, O., Pardo-García, G., et al. (2008). Epidemiological factors associated with treated incidence of first-episode non-affective psychosis in Cantabria: insights from the Clinical Programme on Early Phases of Psychosis. *Early Intervention Psychiatry*, 2, 178–187.

Psychosis Endophenotypes International Consortium; Wellcome Trust Case-Control Consortium 2, Bramon, E., Pirinen, M., Strange, A., Lin, K., et al. (2014). A genome-wide association analysis of a broad psychosis phenotype identifies three loci for further investigation. *Biological Psychiatry*, 75(5), 386-97.

Rampino, A., Walker, R.M., Torrance, H.S., Anderson, S.M., Fazio, L., Di Giorgio, A., et al. (2014). Expression of DISC1-interactome members correlates with cognitive phenotypes related to schizophrenia. *PLoS One*, 9(6), e99892.

Randall, A.D., Kurihara, M., Brandon, N.J., Brown, J.T. (2014). Disrupted in schizophrenia 1 and synaptic function in the mammalian central nervous system. *European Journal of Neuroscience*, 39(7), 1068-1073.

Raznahan, A., Lee, Y., Long, R., Greenstein, D., Clasen, L., Addington, A., et al. (2011). Common functional polymorphisms of DISC1 and cortical maturation in typically developing children and adolescents. *Molecular Psychiatry*, 16(9), 917–926.

Rimol, L.M., Nesvåg, R., Hagler, D.J. Jr., Bergmann, O., Fennema-Notestine, C., Hartberg, C.B., et al. (2012). Cortical volume, surface area, and thickness in schizophrenia and bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, 71, 552–560.

Ripke, S., O'Dushlaine, C., Chambert, K., Moran, J.L., Kähler, A.K., Akterin, S., et al. (2013). Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature Genetics*, 45(10), 1150-1159.

Roiz-Santiáñez, R., Tordesillas-Gutiérrez, D., Ortíz-García de la Foz, V., Ayesa-Arriola, R., Gutiérrez, A., Tabarés-Seisdedos, R., et al. (2012). Effect of antipsychotic drugs on cortical thickness. A randomized controlled one-year follow-up study of haloperidol, risperidone and olanzapine. *Schizophrenia Research*, 141(1), 22-28.

Roiz-Santiañez, R., Ortiz-García de la Foz, V., Ayesa-Arriola, R., Tordesillas-Gutiérrez, D., Jorge, R., Varela-Gomez, N., et al. (2015). No progression of the alterations in the cortical thickness of individuals with schizophrenia-spectrum disorder: A three-year longitudinal MRI study of first-episode patients. *Psychological Medicine*, in Press.

Sawa, A., Snyder, S.H. (2003). Schizophrenia: Neural Mechanisms for Novel Therapies. *Molecular Medicine*, 9(1-2),3–9.

Schaufelberger, M.S., Lappin, J.M., Duran, F.L., Rosa, P.G., Uchida, R.R., Santos, L.C., et al. (2011). Lack of progression of brain abnormalities in first-episode psychosis: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Psychological Medicine*, 41(8), 1677-1689.

Sizonenko, S.V., Babiloni, C., de Bruin, E.A., Isaacs, E.B., Jönsson, L.S., Kennedy, D.O., et al. (2013). Brain imaging and human nutrition: which measures to use in intervention studies? *British Journal of Nutrition*, 110, Suppl 1, S1-30.

- Trost, S., Platz, B., Usher, J., Scherk, H., Wobrock, T., Ekawardhani, S., et al., (2013). DISC1 (disrupted-in-schizophrenia 1) is associated with cortical grey matter volumes in the human brain: a voxel-based morphometry (VBM) study. *Journal of Psychiatry Research*, 47(2), 188-196.
- vanHaren, N.E., Schnack, H.G., Cahn, W., van den Heuvel, M.P., Lepage, C., Collins, L., et al. (2011). Changes in cortical thickness during the course of illness in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 68(9), 871-880.
- Vázquez-Bourgon, J., Mata, I., Roiz-Santíañez, R., Ayesa-Arriola, R., Suárez Pinilla, P., Tordesillas-Gutiérrez, D., et al. (2014). A Disrupted-in-Schizophrenia 1 Gene Variant is Associated with Clinical Symptomatology in Patients with First-Episode Psychosis. *Psychiatry Investigation*, 11(2), 186-191.
- Wang, Q., Jaaro-Peled, H., Sawa, A., Brandon, N.J. (2008). How has DISC1 enabled drug discovery? *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37, 187-195.

### **Materiales suplementarios del artículo 3**

*Variations in Disrupted-in-Schizophrenia 1 gene modulate long-term longitudinal differences in cortical thickness in patients with a first episode of psychosis. Vázquez-Bourgoin J, Roiz-Santiáñez R, Papiol S, Ferro A, Varela-Gómez N, Fañanás L, Crespo-Facorro B. Brain Imaging Behav. 2015 Jul 26. [Epub ahead of print ]. doi: 10.1007/s11682-015-9433-1.*

#### **ESM 1. Detailed description of image analysis methods**

The T1-weighted images, using a spoiled grass (SPGR) sequence, were acquired in the coronal plane with the following parameters: echo time (TE) = 5ms, repetition time (TR) = 24ms, number of excitations (NEX) = 2, rotation angle = 45 degrees, field of view (FOV) = 26x19.5cm, slice thickness = 1.5mm and a matrix of 256x192. The proton density (PD) and transverse relaxation time (T2) weighted images were obtained with the following parameters: 3.0 mm thick coronal slices, TR = 3000ms, TE = 36ms (for PD) and 96ms (for T2), NEX = 1, FOV = 26x26cm, matrix = 256x192. The in-plane resolution was 1.016x1.016mm. MRIs of patients and controls were evenly acquired during follow-up time.

Processing of the images was performed using BRAINS2 (Magnotta et al. 2002). The T1-weighted images were spatially normalised and resampled to 1.0-mm<sup>3</sup> voxels so that the anterior–posterior axis of the brain was realigned parallel to the anterior commissure/posterior commissure line and the interhemispheric fissure aligned on the other two axes. The T2- and PD-weighted images were aligned to the spatially normalised T1-weighted images using an automated image registration program. These images were then subjected to a linear transformation into standardised stereotaxic Talairach atlas space to generate automated measurements of frontal, temporal, parietal, and occipital lobes. To further classify tissue volumes into grey matter, white matter, and CSF, we used a discriminant analysis method of tissue segmentation based on automated training class selection that utilised data from the T1-weighted, T2-weighted, and PD sequences (Harris et al. 1999). The discriminant analysis method permits

identification of the range of voxel intensity values that characterise GM, WM and CSF. An 8-bit number is assigned to each voxel that indicates its partial volume tissue content (10–70 for CSF, 70–190 for GM and 190–250 for WM). To define the cortical iso-surface to be used in the posterior analyses, a value of pure GM, or 130, was used as a cut-off. This value represents the parametric centre of the GM within the cortex and serves as a useful estimate of its physical centre. This triangulated surface was used as the basis for our calculations of thickness. Cortical thickness was calculated as the minimum distance between the 100 % grey matter triangle surface and the 50 %/50 % grey/white matter surface. This measure is an index of cortical thickness. It represents the parametric centre of the cortex or approximately one-half of the cortical thickness.

Several studies have been performed to review the reliability and reproducibility of BRAINS (Okugawa et al. 2003; Agartz et al. 2001).

## ESM 2. Longitudinal and cross-sectional results of rs821616 and combined rs6675281/rs821616

Table S1. Effect of rs821616 polymorphism in cortical thickness progression over 3 years follow-up.

	Baseline			3 years			Time x genotype
	Ser/Ser (n=4)	Cys/Car (n=56)	Stat.	Ser/Ser (n=4)	Cys/Car (n=56)	Stat.	
	Mean (SD)	Mean (SD)	F (p)	Mean (SD)	Mean (SD)	F (p)	F (p)
Total CT	4.16 (0.36)	3.97 (0.37)	1.13 (0.29)	4.08 (0.21)	3.98 (0.33)	0.26 (0.61)	0.82 (0.37)
Frontal CT	4.32 (0.40)	4.15 (0.42)	0.66 (0.42)	4.28 (0.26)	4.19 (0.39)	0.05 (0.83)	0.72 (0.39)
Temporal CT	3.31 (0.29)	3.20 (0.33)	0.41 (0.53)	3.35 (0.25)	3.17 (0.33)	1.21 (0.28)	0.21 (0.67)
Parietal CT	3.95 (0.41)	3.72 (0.35)	2.00 (0.16)	3.84 (0.22)	3.72 (0.32)	0.43 (0.52)	1.06 (0.31)
Occipital CT	4.51 (0.49)	4.27 (0.49)	0.89 (0.35)	4.33 (0.29)	4.24 (0.43)	0.16 (0.69)	0.85 (0.36)

CT: Cortical thickness

Table S2. Combined effect of rs6675281 and rs821616 polymorphism on cortical thickness progression over 3 years follow-up.

	Baseline			3-years			Time x genotype		
	Leu/Leu +Ser/Ser (n=4)	Leu/Leu or Ser/Ser + Phe/Car or Cys/Car (n=37)	Phe/Car + Cys/Car (n=15)	Stat.	Leu/Leu +Ser/Ser (n=4)	Leu/Leu or Ser/Ser + Phe/Car or Cys/Car (n=37)		Phe/Car + Cys/Car (n=15)	Stat.
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	F (p)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	F (p)	F (p)
Total CT	4.16 (0.36)	4.02 (0.41)	3.86 (0.30)	0.77 (0.46)	4.08 (0.21)	3.97 (0.37)	3.99 (0.26)	0.46 (0.63)	3.99 (0.025)
Frontal CT	4.32 (0.40)	4.21 (0.45)	4.04 (0.38)	0.63 (0.54)	4.28 (0.26)	4.19 (0.43)	4.21 (0.32)	0.43 (0.65)	3.67 (0.032)
Temporal CT	3.31 (0.29)	3.19 (0.36)	3.21 (0.30)	0.03 (0.97)	3.35 (0.25)	3.14 (0.32)	3.20 (0.32)	1.33 (0.27)	0.36 (0.70)
Parietal CT	3.95 (0.41)	3.75 (0.38)	3.64 (0.27)	0.49 (0.61)	3.84 (0.22)	3.71 (0.35)	3.71 (0.22)	0.41 (0.66)	1.67 (0.19)
Occipital CT	4.51 (0.49)	4.35 (0.54)	4.08 (0.37)	1.19 (0.31)	4.33 (0.29)	4.24 (0.47)	4.24 (0.37)	0.16 (0.85)	4.73 (0.013)

CT: Cortical thickness



## **7. DISCUSSION**



---

### **7.1. *DISC1* y riesgo de psicosis del espectro de la esquizofrenia y otras variables clínicas relevantes**

De acuerdo con los resultados publicados en el primer artículo y los obtenidos en los análisis adicionales realizados para esta tesis podemos concluir que las variaciones en el gen *DISC1* no suponen a nivel global un factor de riesgo para presentar un trastorno psicótico en la población estudiada.

A pesar de que el gen *DISC1* se ha postulado en los últimos años como uno de los principales genes candidatos para explicar la fisiopatología de la esquizofrenia, hasta la fecha no existe una consistente evidencia científica que permita establecer que las variaciones en este gen actúan como un factor de riesgo para las psicosis. Si bien diversos estudios de asociación y ligamiento aportan evidencias de la implicación del locus *DISC1* en 1q42.1 en la aparición de trastornos del espectro de la esquizofrenia (Chubb et al., 2008; Bradshaw y Porteous, 2012), dos recientes estudios de asociación del genoma completo (GWAS), realizados a gran escala sobre muestras de esquizofrenia y de psicosis, incluyendo psicosis afectivas, no encontraron una asociación significativa entre las variaciones en el gen *DISC1* y riesgo de sufrir psicosis (Ripke et al., 2013; Bramon et al., 2014). Este hecho, no obstante, no tiene necesariamente que estar en contra de una posible asociación entre dicho gen y algunas de las características clínicas y endofenotipos de la enfermedad.

### **7.2. *DISC1* y presentación clínica**

Los resultados del primer estudio presentado en esta tesis muestran una asociación entre el genotipo del polimorfismo Ser704Cys (rs821616) y la gravedad de la clínica psicótica positiva al inicio de la enfermedad en nuestra muestra de pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva, medida ésta a través de la *dimensión positiva* generada a partir de puntuaciones de las SAPS y SANS, y de forma más específica con la gravedad de las alucinaciones. Así, de acuerdo con estos resultados, los pacientes con un primer episodio de psicosis y que son además homocigotos para el alelo Ser (A) muestran una peor presentación clínica, con síntomas psicóticos positivos y en particular con alucinaciones más intensas.

Estos hallazgos van en la misma línea que los encontrados en estudios previos en los que se describe el alelo Cys (T) asociado a delirios menos intensos en pacientes psicóticos (DeRosse et al., 2007), y también a puntuaciones más bajas en la escala de esquizoidía, en sujetos sanos (Tomppo et al., 2009).

Otros estudios previos han aportado también evidencias del efecto de otros polimorfismos del gen *DISC1* sobre la presentación clínica en esquizofrenia. Así, Hennah y colaboradores (2003) describieron la asociación entre un haplotipo de este gen (HEP3) con ciertos componentes-rasgos de la esquizofrenia. Y de forma similar, otro estudio encontró una asociación entre el alelo Phe del polimorfismo leu607phe (rs6675281) y la gravedad de las alucinaciones, en una muestra de pacientes caucásicos con diagnóstico de esquizofrenia (Szeszko et al., 2008).

Aunque la presentación clínica, y en concreto la gravedad clínica, no puede considerarse en sentido estricto un endofenotipo, se ha sugerido la posibilidad de que ésta podría actuar como factor mediador en el endofenotipo de respuesta terapéutica, lo cual la convierte en una característica clave para el análisis de las bases genéticas de la enfermedad (Mouaffak et al., 2011).

Se han descrito también otra serie de características de la presentación clínica que, como la edad de presentación y la DUP, poseen un marcado efecto sobre la ulterior evolución clínica de la enfermedad y por lo tanto sobre su pronóstico (Crespo-Facorro, 2007b), lo cual las convierte en especialmente relevantes para el estudio de las bases genéticas de la enfermedad. Sin embargo, al estudiar el posible efecto del genotipo *DISC1* sobre las características del inicio de la enfermedad, no encontramos ninguna asociación significativa entre los polimorfismos del gen *DISC1* y los distintos factores clave mencionados, como son la DUP o la edad de inicio. Estos hallazgos confirman los resultados obtenidos en estudios previos (DeRosse et al., 2007; Takahashi et al., 2009; Lepagnol-Bestel et al., 2010).

### **7.3. *DISC1* y respuesta clínica**

Los resultados obtenidos muestran una débil asociación entre el polimorfismo rs1000731 y la respuesta terapéutica en la sintomatología negativa (*respuesta SANS*), de tal forma que los pacientes no respondedores eran más frecuentemente homocigotos

para el alelo G. Sin embargo, este hecho no se pudo confirmar en el análisis del cambio longitudinal en la gravedad de la clínica negativa a las 6 semanas (no asociación significativa con dicho genotipo). Por el contrario, este genotipo sí se vio asociado a una menor disminución en la sintomatología positiva (*dimensión positiva*) a las 6 semanas de tratamiento.

No observamos diferencias significativas en la distribución de genotipos entre *respondedores* y *no respondedores* para los otros dos polimorfismos (rs6675281 y rs821616), al igual que tampoco estuvieron dichos polimorfismos asociados a diferencias significativas en los cambios longitudinales en la gravedad clínica (*mejoría clínica*) tras 6 semanas de tratamiento.

Por último, ninguno de los polimorfismos del gen *DISC1* apareció asociado a la presencia de *resistencia al tratamiento*. Estos resultados confirman los encontrados en dos estudios recientes (Hotta et al., 2011; Terzic et al., 2014) en los que se compararon grupos de pacientes resistentes al tratamiento con otros de pacientes respondedores, en sendas muestras de pacientes con esquizofrenia de origen centroeuropeo y japonés. Ninguno de dichos estudios halló diferencias genéticas entre los subgrupos poblacionales mencionados, para ninguno de los polimorfismos estudiados (rs3738401, rs821597 y rs821616; y rs6675281 y rs821616, respectivamente).

Estos resultados negativos no son totalmente sorprendentes ya que la respuesta terapéutica es un proceso complejo en el que participan múltiples proteínas, implicadas a su vez en interacciones múltiples. Así, nos parece lógico que resulte difícil detectar la implicación de un solo polimorfismo, o incluso de un solo gen, en el origen de una modulación importante de la respuesta terapéutica a antipsicóticos. Es más probable que los procesos de farmacogenética sean explicados por modelos más complejos como los planteados en la teoría sináptica de la esquizofrenia propuesta por Harrison y Weinberger (2005). En ella, el riesgo de padecer psicosis, y por qué no, la respuesta a antipsicóticos, está mediada por la convergencia del efecto de varios genes candidatos sobre procesos sinápticos en microcircuitos cerebrales, principalmente de la vía glutamatérgica.

Existe en la actualidad una creciente evidencia científica apoyando la implicación del gen *DISC1* en los procesos biológicos de respuesta terapéutica en psicosis, tanto desde modelos de estudios subcelulares, animales como en humanos. Así por ejemplo, a nivel

de estudios sobre modelos animales (roedores), Chiba y colaboradores (2006) describen un aumento de la expresión de mRNA de DISC1 en el córtex prefrontal de ratas que habían sido tratadas con antipsicóticos atípicos. Ya a nivel de estudio en humanos, se ha descrito la alteración de la expresión de DISC1 en estructuras cerebrales implicadas en la aparición de sintomatología psicótica (córtex orbito-frontal e hipocampo) en pacientes con esquizofrenia (Lipska et al., 2004; Sawamura et al., 2005), así como alteraciones en la transcripción de DISC1 a nivel periférico en relación con tratamiento antipsicótico durante la fase aguda de la psicosis (Olincy et al., 2011).

Actualmente la principal teoría etiopatogénica de la esquizofrenia está basada principalmente en una disfunción molecular de la vía dopaminérgica (Howes y Kapur, 2009). Sin embargo, cada vez está cobrando mayor relevancia el papel de la vía glutamatérgica en la explicación molecular subyacente a la aparición de, al menos parte, de la sintomatología psicótica (Harrison y Weinberger, 2005), de tal forma que recientemente se ha postulado incluso un modelo etiopatogénico en el que actúan de forma interconectada la dopamina y el glutamato (Laurelle, 2014).

En este sentido, aunque el gen *DISC1* se ha relacionado previamente con la vía dopaminérgica (Lipina et al., 2004; Mao et al., 2009; Niwa et al., 2010; Su et al., 2014), existe una mayor evidencia científica sobre la implicación de este gen en la vía glutamatérgica. Así, la principal implicación de la proteína DISC1 sobre la vía del glutamato se debe a la relación de ésta con varias de las proteínas del complejo DISC1 interactome, como son las proteínas Citron, A-kinase anchoring protein 9/AKAP450 (AKAP9), GRIPAP1, o ARHGEF11 (Millar et al., 2003; Sawa y Snyder, 2003), las cuales interactúan a su vez directamente con los receptores NMDA, AMPA o el transportador de glutamato (EAAT4). De esta manera variaciones en el gen *DISC1* pueden modular la transducción de señal en respuesta a la neurotransmisión de glutamato. En línea con esta idea, se ha descrito recientemente que el nivel de expresión de la proteína DISC1 a nivel presináptico regula la descarga de glutamato a nivel de terminales neuronales presinápticas (Maher y LoTurco, 2012).

De esta manera, es posible concluir que la implicación del gen *DISC1* sobre los procesos de respuesta terapéutica se deban mayormente a un efecto modulador de la vía glutamatérgica. Y por lo tanto, el efecto de las variaciones en el gen *DISC1* sobre la respuesta terapéutica en psicosis, serán más evidentes cuando se estudie la respuesta a

moléculas con una acción preferentemente glutamatérgica. Esto puede explicar la débil asociación encontrada en nuestro estudio entre los polimorfismos *DISC1* estudiados y la respuesta terapéutica, dado que los fármacos empleados en nuestra muestra tienen una acción preferentemente dopaminérgica.

En este sentido, cabe destacar que en los últimos años se está postulando la vía (*pathway*) del gen/proteína *DISC1* como una de las más prometedoras para el estudio de nuevas dianas terapéuticas (Wang et al., 2008; Soares et al., 2011; Kamiya et al., 2012).

El papel de las variaciones genéticas en el desarrollo de la respuesta terapéutica en la esquizofrenia todavía no está claro. Además, la respuesta terapéutica es un proceso complejo en el que intervienen muchos e importantes factores, no solo genéticos sino también ambientales, entre los que podemos destacar, por ejemplo, uno tan difícil de controlar metodológicamente como la adherencia al tratamiento. Tenemos además que señalar que para analizar este factor resulta esencial identificar y valorar de manera precisa las características clave que permiten establecer una definición correcta y precisa del fenotipo de *respuesta terapéutica*. Ello es así porque, como se sabe, la utilización de diferentes definiciones de *respuesta terapéutica* modifica el resultado de los análisis y además dificulta la comparación de resultados entre estudios.

Finalmente, hay que señalar que a pesar de la utilización de una estrategia de análisis estadístico correcta, resulta difícil eliminar completamente la posibilidad de que haya una relación directa entre el endofenotipo de gravedad clínica y el de *respuesta terapéutica*. La gravedad clínica u otras dimensiones psicopatológicas, como puede ser la presencia o no de un componente afectivo, o la presencia en mayor o menor medida de déficits cognitivos, podrían actuar como factores intermediarios entre el genotipo y el endofenotipo de respuesta terapéutica. Así, aunque la presentación clínica, y en concreto la gravedad clínica, no pueden considerarse en sentido estricto como endofenotipos, se ha sugerido la posibilidad de que podrían comportarse como un factor mediador en el endofenotipo de respuesta terapéutica (Mouaffak et al., 2011).

#### **7.4. *DISC1* y déficit cognitivo**

Detectamos, en nuestra muestra de pacientes con un primer episodio de psicosis, una asociación significativa entre dos polimorfismos del gen *DISC1*, el rs821616

(Ser704Cys) y el rs1000731, y la variabilidad en el curso a largo plazo (3 años) del funcionamiento cognitivo.

Así, los pacientes homocigotos para el alelo G (rs1000731) presentaban, al inicio del tratamiento, un mejor funcionamiento cognitivo en el dominio *atención*. Este resultado contrasta con los encontrados en estudios previos en los que se observa que los pacientes homocigotos para el haplotipo HEP1 (el cual incluye el alelo G del rs1000731) está negativamente asociado con la memoria verbal en general (Cannon et al., 2005). Sin embargo, cuando realizamos los análisis longitudinales y exploramos la interacción entre el tiempo de evolución y el genotipo, observamos unos resultados que son coherentes con los descritos por Cannon y colaboradores (2005). De esta manera, en nuestro estudio, aquellos paciente homocigotos para el alelo G mostraron una peor evolución de su funcionamiento cognitivo en los dominios de *atención* y de *memoria de trabajo*, mientras que los pacientes portadores del alelo A presentaron una mejoría en las puntuaciones en estos dominios, tras 3 años de tratamiento.

Al estudiar el polimorfismo rs821616, los análisis transversales revelaron que aquellos pacientes homocigotos para el alelo de riesgo (Ser; A) presentaron un funcionamiento cognitivo significativamente peor al inicio del tratamiento que los portadores del alelo Cys (T). Este resultado vienen a confirmar los hallados de estudios previos que indican que lo pacientes Ser/Ser con un trastorno del espectro de la esquizofrenia mostraban mayores déficits en las dimensiones de *memoria lógica* (Callicott et al., 2005), *fluidéz verbal*, así como en pruebas visuo-espaciales (Palo et al., 2007), que los pacientes portadores del alelo Cys. Nuestros resultados concuerdan también con los encontrados en otro estudio realizado en sujetos sanos en el que se encontró que el alelo Cys estaba asociado a mejores puntuaciones en las pruebas de razonamiento verbal (Thomson et al., 2005).

Sin embargo, el análisis de los cambios cognitivos a lo largo del curso evolutivo para el polimorfismo rs821616 demostró unos resultados inesperados, de forma que aquellos pacientes homocigotos para el alelo de riesgo (Ser; A) mostraron una mejor evolución de su déficit cognitivo (*dominio motor*) tras 3 años de tratamiento que aquellos portadores del alelo Cys. Aunque no existen hasta la fecha otros estudios acerca del efecto del gen *DISC1* sobre los cambios evolutivo del funcionamiento cognitivo en psicosis, cabría esperar que, siendo el alelo Ser el alelo de riesgo, observásemos en los

---

pacientes (Ser/Ser), además de un mayor déficit neurocognitivo basal, como el observado, una peor evolución del déficit cognitivo a lo largo del tiempo.

Una posible explicación a estos resultados longitudinales podría ser el de que el alelo Ser es efectivamente un factor de riesgo que determina una peor presentación clínica, con un peor funcionamiento cognitivo basal (déficit cognitivo), a pesar de lo cual seguramente no tiene un efecto sobre la respuesta terapéutica reflejada en el cambio en el déficit cognitivo a largo plazo. Además, resultados obtenidos en estudios longitudinales sugieren que la función cognitiva en pacientes con esquizofrenia puede mejorar a lo largo del curso evolutivo (Szöke et al., 2008; Bonner-Jackson et al., 2010), o al menos mantenerse estable en su déficit (Zipursky et al., 2013).

Otro resultado imprevisto de nuestro estudio fue el del efecto diferenciado de los polimorfismos estudiados sobre diferentes dominios cognitivos. Hay que señalar en este sentido que los test neurocognitivos seleccionados para este estudio evalúan dominios cognitivos específicos, que implican circuitos cerebrales de conectividad neuronal específicos. Aunque hay suficiente evidencia sobre la implicación del gen *DISC1* en procesos de neurodesarrollo y neuroplasticidad, todavía no disponemos del conocimiento exacto acerca de si determinados polimorfismos del gen *DISC1* tienen un efecto sobre circuitos neuronales específicos de funcionamiento. Ello es especialmente relevante, dado que podría ser la explicación a la especificidad del efecto sobre diferentes dominios cognitivos obtenida en nuestros resultados. En este sentido, Liu y colaboradores (2013) aportan evidencias consistentes sobre el efecto del polimorfismo Ser704Cys (rs821616) sobre el circuito tálamo-prefrontal en humanos (Liu et al., 2013). Es más, estudios previos de neuroimagen-genética demuestran que el alelo Ser (Ser/Ser) está asociado con diferencias estructurales cerebrales en el córtex motor (Knickmeyer et al., 2014; Stacey et al., 2014). Dichas alteraciones podrían en cierta medida constituir el substrato estructural subyacente al déficit neurocognitivo observado por nosotros en el dominio motor.

En línea con este razonamiento, el rs100073, que ha sido repetidamente implicado en la *atención* y en la *memoria de trabajo* en pacientes con esquizofrenia, ha sido asociado además con reducciones en la sustancia gris en las circunvoluciones frontal superior e inferior (Cannon et al., 2005), áreas situadas en el córtex prefrontal (Manoach, 2003; Roiser et al., 2013). Por lo tanto ésta podría ser, de nuevo, la posible explicación que,

desde el análisis de la estructura cerebral, se podría dar a las diferencias observadas en el funcionamiento cognitivo de los pacientes incluidos en nuestra muestra, en los dominios *atención* y *memoria de trabajo*. Desafortunadamente, no podemos comparar nuestros resultados con los de estudios previos ya que no se han publicado hasta la fecha estudios acerca del efecto del gen *DISC1* sobre los cambios longitudinales del déficit cognitivo en pacientes con psicosis.

No encontramos, en la población estudiada, ninguna asociación entre el polimorfismo rs6675281 y el funcionamiento neurocognitivo. Estudios previos han descrito resultados inconsistentes sobre el posible efecto de este polimorfismo sobre la neurocognición en la psicosis. Así, Cannon y colaboradores (2005) observan, en una muestra de pacientes con esquizofrenia, un haplotipo compuesto por este SNP asociado a diferencias en la *memoria de aprendizaje*. Sin embargo, Hennah y colaboradores (2005) no hallaron ninguna asociación significativa entre el mismo haplotipo y pruebas de *memoria visual* y *memoria de trabajo*. Nicodemus y colaboradores (2014) por su parte, encontraron una asociación significativa con la *fluidez verbal* en controles, pero ninguna asociación en pacientes con esquizofrenia. Y por último, Brauns y colaboradores (2011), aunque encontraron un aumento de la actividad neuronal en el córtex prefrontal durante la realización de pruebas de *memoria de trabajo* en pacientes portadores del alelo Phe, no observan ninguna asociación a diferencias en el funcionamiento cognitivo en ese dominio en función del genotipo.

Parece oportuno mencionar aquí que está hoy establecido no solo que el déficit cognitivo es un elemento central en la esquizofrenia sino además que existe una variabilidad individual en la progresión de los déficits cognitivos en este trastorno (Heinrichs and Zakzanis, 1998). Parece por ello relevante identificar marcadores neuropsicológicos capaces de predecir la evolución del déficit cognitivo en estos pacientes a lo largo del curso evolutivo. Los estudios longitudinales previos muestran inconsistencias en sus resultados acerca de esta variabilidad en el curso de los déficits cognitivos. En general, los déficits parecen ser independientes del resto de la sintomatología psicótica o del efecto del tratamiento farmacológico (Crespo-Facorro et al., 2009; Ayesa-Arriola et al., 2013), y en cierta medida también de características premórbidas y sociodemográficas (González-Blanch et al., 2008; Ayesa-Arriola et al., 2013).

Respecto a los factores biológicos implicados en los cambios cognitivos a lo largo del tiempo, se sabe que la neurocognición es un endofenotipo con una influencia genética a lo largo de la vida tanto en individuos sanos (Deary et al., 2012; Plomin y Deary, 2014) como en pacientes con psicosis (Bilder et al., 2011; McIntosh et al., 2013). Por lo tanto, la variabilidad individual en el curso de los déficits cognitivos observados en la esquizofrenia podría ser explicada por variaciones en los genes implicados en la enfermedad.

El gen *DISC1* ha sido propuesto como uno de los principales genes candidatos para la esquizofrenia (Chubb et al., 2008). Su implicación en la regulación de diversos aspectos de la neurogénesis tanto en etapas embrionarias como en el adulto, así como en el crecimiento neuronal, y en el desarrollo cortical (Randall et al., 2014), le hace atractivo para el estudio de endofenotipos que pudieran estar mediados por alteraciones en el procesos de neurodesarrollo, como es el caso de la neurocognición. Sin embargo, aunque hay una creciente evidencia de su asociación con diferencias en el funcionamiento cognitivo de forma transversal (Porteous et al., 2006), no existen estudios previos que hayan explorado su posible implicación en los cambios longitudinales de los déficits cognitivos en la psicosis. Pese a ello, Thomson y colaboradores (2005) sí informan de la presencia de variaciones en el gen *DISC1* asociadas a cambios cognitivos debidos a la edad en una muestra de sujetos sanos.

### **7.5. *DISC1* y variaciones en el grosor cortical**

Al estudiar la posible relación entre las variaciones en el gen *DISC1* y la estructura cerebral, detectamos una asociación significativa entre un polimorfismo funcional rs6675281 (Leu607Phe), y cambios longitudinales a largo plazo (3 años) en el grosor de la corteza cerebral. Estos cambios, aunque eran generalizados a nivel cerebral, aparecían de forma más prominente en los lóbulos frontal y temporal. Así, aquellos pacientes homocigotos para el alelo Leu del polimorfismo rs6675281 presentaron una reducción del grosor de la corteza cerebral tras 3 años de seguimiento, mientras que los portadores del alelo Phe presentaron un incremento en el grosor cortical generalizado, pero más prominente en las áreas frontal, temporal y parietal. Estos resultados concuerdan con los de Raznahan y colaboradores (2011), quienes observaron que el ritmo del

adelgazamiento cortical se atenuaba en los lóbulos frontal y parietal en los sujetos sanos portadores del alelo Phe.

Los estudios publicados hasta la fecha evaluando los cambios longitudinales del grosor cortical en esquizofrenia han mostrado resultados escasamente concluyentes (van Haren et al., 2011; Cobia et al., 2012; Nesvag et al., 2012; Gutiérrez-Galve et al., 2015). La mayoría de estos trabajos describen un aumento del adelgazamiento de la corteza a lo largo del curso evolutivo en áreas amplias del manto cortical, pero más pronunciado en córtex prefrontal y temporal (van Haren et al., 2011; Cobia et al., 2012; Gutiérrez Galve et al., 2015). Sin embargo, Nesvag y colaboradores (2012), no encontraron diferencias entre pacientes y controles sanos, describiendo un patrón de adelgazamiento cortical a lo largo del tiempo similar en ambos grupos. Resulta interesante reseñar en este sentido que Prasad y colaboradores (2009), en un estudio longitudinal con hijos adolescentes de pacientes con esquizofrenia, observaron un mantenimiento, e incluso un ligero incremento del grosor cortical.

Como ya hemos comentado, los pacientes portadores del alelo Phe presentaron un incremento en el grosor de la corteza cerebral, tras 3 años de seguimiento. Aunque este resultado es en cierta medida sorprendente, varios estudios previos sobre morfología cerebral en esquizofrenia han sugerido que las anomalías en la estructura cerebral presentes al inicio de la enfermedad podrían revertirse (Keshavan et al., 1998; Schaufelberger et al., 2011). En el mismo sentido, un estudio longitudinal reciente investigando, en pacientes con esquizofrenia y controles sano, los efectos a corto plazo del tratamiento con antipsicóticos atípicos sobre el grosor cortical, demostró que los pacientes mostraban un incremento significativo del grosor cortical tras 8 semanas de tratamiento (Goghari et al., 2013). Ello parece indicar que los antipsicóticos atípicos podrían inducir un proceso de remodelamiento sináptico y plasticidad neuronal (Horacek et al., 2006), el cual podría producir un incremento relativo del grosor cortical en pacientes comparado con controles sanos, disminuyendo así el adelgazamiento cortical natural que ha sido descrito en relación con el envejecimiento. Otros factores ambientales, como el estrés crónico (Blix et al., 2013), la dieta (Sizonenko et al., 2013), o incluso la actividad cognitiva (Engvig et al., 2010), se han descrito como factores que pueden tener un efecto sobre el grosor cortical. Se ha observado, por ejemplo, que el estrés crónico modula el adelgazamiento cortical, así como determinados cambios en el volumen de estructuras subcorticales, en sujetos sanos (Savic, 2015). Recientemente,

Mosconi y colaboradores (2014) han demostrado que la dieta Mediterránea puede proteger contra la disminución del tejido cerebral. Al mismo tiempo, el funcionamiento cognitivo se ha asociado con el grosor cortical en regiones fronto-temporales (Tuladhar et al., 2015), e incluso hay evidencias de un incremento del grosor cortical tras la práctica de tareas cognitivas (Haier et al., 2009).

Globalmente nuestra muestra presenta una reducción media del grosor cortical total de 0,02 mm después de 3 años de curso evolutivo tras un primer episodio de psicosis, reducción que se manifiesta en el 51% de los pacientes. Así, podemos afirmar que la reducción del grosor de la corteza cerebral observada en nuestro estudio es comparable con la observada en estudios previos realizados en pacientes con un trastorno del espectro de la esquizofrenia (van Haren et al., 2011; Nesvag et al., 2012; Cobia et al., 2012; Gutiérrez-Galve et al., 2015). Por ejemplo, en el estudio de van Haren y colaboradores (2011), que ha de ser considerado como el mayor estudio longitudinal sobre cambios en corteza cortical en pacientes con esquizofrenia crónica, se encontró, en el 75% de los pacientes, una reducción media del grosor cortical de 0,005 mm tras 5 años de seguimiento. A su vez Cobia y colaboradores (2012), también en una muestra de pacientes con esquizofrenia crónica, encontraron en las regiones frontal y temporal una reducción del grosor cortical de entre 0,06 y 0,08 mm tras 2 años de seguimiento. Finalmente Gutiérrez-Galve y colaboradores (2015), en un estudio longitudinal de los cambios corticales a dos años de seguimiento tras un primer episodio de psicosis, encontraron reducciones del grosor de entre 0,02 y 0,06 mm, dependiendo del área estudiada.

En nuestro estudio no observamos ninguna asociación significativa entre el adelgazamiento cortical y variaciones en el polimorfismo rs821616. Sin embargo, cuando lo combinamos con el otro polimorfismo estudiado (rs6675281), encontramos un efecto gradual sobre la tasa de adelgazamiento cortical tras 3 años de seguimiento. Los pacientes Phe/-+Cys/- mostraron un incremento significativo en el grosor cortical en diversas áreas cerebrales. El resto de pacientes, por el contrario, mostraron reducciones en el grosor cortical, siendo estas reducciones más prominentes en aquellos pacientes homocigotos para ambos alelos de riesgo de los dos SNPs (Ser/Ser+Leu/Leu). Una vez más, estos resultados van en la misma dirección que lo observados por Raznahan y colaboradores (2011), quienes encontraron que los pacientes portadores de

los alelos Phe y Cys (i.e., Phe/-+Cys/-) mostraban una menor tasa de adelgazamiento cortical en las regiones orbito-frontal, temporal medial, y parietal superior.

Los análisis transversales realizados en nuestro estudio, tanto a nivel basal como a los tres años del seguimiento, no evidenciaron la presencia de una asociación significativa entre alguno de los polimorfismos del gen *DISC1* estudiados (rs6675281 y rs821616) y variaciones en el grosor cortical. De manera similar, estudios previos sobre el polimorfismo rs821616 no pudieron demostrar cambios en la estructura cerebral de los pacientes estudiados (Chakravarty et al., 2012; Kahler et al., 2012). Respecto al polimorfismo rs6675281, varios estudios previos han aportado resultados contradictorios. Por ejemplo, Chakravarty y colaboradores (2012) no encontraron diferencias significativas en función del genotipo, mientras que Brauns y colaboradores (2011) observan que los pacientes portadores del alelo Phe mostraban reducciones significativas en el grosor de la corteza cerebral en la circunvolución supramarginal, comparado con los homocigotos Leu.

## **7.6. Visión integral del efecto de polimorfismos *DISC1* sobre la psicosis no afectiva**

A partir de los resultados de los estudios que componen esta tesis, y de los análisis estadísticos complementarios presentados en la misma, podemos concluir que las variaciones en el gen *DISC1* podrían tener un papel relevante sobre la fisiopatología de la esquizofrenia, a través de sus efectos sobre la estructura cerebral, y también modulando aspectos clínicos como la gravedad clínica y la variabilidad en el curso de los déficits cognitivos.

El análisis integral del efecto de cada polimorfismo sobre los endofenotipos y características clínicas relevantes nos permite establecer las siguientes conclusiones:

En primer lugar, el polimorfismo rs821616 (Ser704Cys), se encuentra asociado a una mayor gravedad inicial de los síntomas psicóticos positivos (*dimensión positiva*) y en concreto de las alucinaciones. Además el efecto de este genotipo (Ser/Ser) se expresa, en el inicio del tratamiento, también en el contexto de una peor cognición (*destreza motora*), aunque esta función cognitiva evolucionará más favorablemente a lo largo de

los 3 años de tratamiento, hasta igualar finalmente a la de los pacientes portadores del alelo Cys. A nivel de estructura cerebral, la presencia del alelo Ser (en combinación con el alelo Leu del rs6675281) conlleva un mayor nivel de adelgazamiento cortical a largo plazo, siendo más prominente esta reducción del grosor cuando los pacientes son homocigotos Ser/Ser y Leu/Leu (rs6675281).

En segundo término, el rs6675281 en solitario también se muestra asociado a cambios longitudinales en el grosor cortical. Así, aquellos pacientes homocigotos para el alelo de riesgo, Leu/Leu, presentaron una peor evolución en el cambio del grosor de la corteza cerebral a lo largo de 3 años de seguimiento. En contraposición, los pacientes portadores del alelo Phe, mostraron un engrosamiento de su corteza cerebral globalmente.

Por último, el polimorfismo rs1000731 está asociado en nuestra muestra a diferencias clínicas al inicio de la enfermedad, tanto en sintomatología positiva y desorganizada, como en función cognitiva. Además este SNPs aparece asociado a diferencias longitudinales cognitivas y diferencias en respuesta terapéutica. Así, los pacientes homocigotos G/G, aunque presentan una menor gravedad en la *dimensión positiva*, sus puntuaciones en la *dimensión desorganizada*, serán mayores que en el resto de pacientes (portadores del alelo A). Estos mismos pacientes (G/G) presentan un mejor nivel de funcionamiento cognitivo al inicio del tratamiento (*dominio atención*) pero una peor evolución a largo plazo de las funciones cognitivas de *atención y memoria de trabajo*, que los portadores de alelo A. Por último, los pacientes G/G son menos frecuentemente *respondedores* (identificados según la respuesta de la *sintomatología negativa*) y presentan una tendencia a una menor mejoría clínica a lo largo del seguimiento (longitudinal) en la dimensión positiva.

Actualmente, no existe un conocimiento completo de cuál es la función biológica de la proteína DISC1, no pudiéndose explicar de forma exacta y detallada todavía cómo variaciones en este gen podrían tener una implicación en la fisiopatología de la esquizofrenia. De la misma manera, tampoco se ha llegado todavía a entender con exactitud cómo variaciones en este gen podrían tener un efecto modulador sobre el riesgo de presentar la enfermedad, o sobre la gravedad u otras características de la misma. Sin embargo, sí está hoy en día bien establecido que el gen *DISC1* codifica una

proteína andamio, que interactúa a su vez con varias proteínas formando lo que se ha llamado el DISC1-Interactome.

Así, el efecto de la variabilidad de secuencia de *DISC1* debería interpretarse en el contexto de interacciones múltiples gen-gen, en el cual el rol final de un gen/proteína es dependiente de su peso dentro de una vía biológica específica. Es más, debido a que la proteína DISC1 se expresa en el cerebro a nivel neuronal, y de forma predominante en el hipocampo y en el córtex cerebral (Wang et al., 2008), podría hipotetizarse que las variaciones genéticas pueden modificar la disponibilidad de la proteína, y consecuentemente, alterar la eficacia de las vías biológicas en las que la proteína está implicada de manera más específica en estas áreas cerebrales. En línea con esta idea, se ha demostrado que la expresión periférica, en linfocitos, de la proteína DISC1 se ve reducida en los pacientes con esquizofrenia (Millar et al., 2005; Rampino et al., 2014). Y además, que expresiones bajas de DISC1 correlacionan con bajas expresiones de algunas de sus proteínas compañeras (DISC1 Interactome) en esas mismas áreas cerebrales (Lipska et al., 2006).

Se sabe también que estas proteínas con las que interactúa están implicadas en procesos de neurodesarrollo, señalamiento neuronal y en otros procesos de neuroplasticidad en etapas embrionarias y adultas (Millar et al., 2003; Sawa y Snyder, 2003; Camargo et al., 2007; Chubb et al., 2008; Jaaro-Peled et al., 2009; Bradshaw y Porteous, 2012). Estudios en modelos animales han demostrado también una relación entre mutaciones en el gen *DISC1* y cambios cerebrales estructurales e histológicos reminiscentes de la esquizofrenia, apoyando así la implicación del gen *DISC1* en procesos de neurodesarrollo y maduración cortical (Niwa et al., 2010; Lee et al., 2011).

Resulta interesante señalar, que varios estudios científicos demuestran que varios polimorfismos de la *DISC1* aparecen asociados a cambios estructurales en el hipocampo y el córtex pre-frontal (Duff et al., 2013). Al mismo tiempo, estas variaciones genotípicas de *DISC1* parecen estar asociadas a alteraciones funcionales, con predominio en dichas regiones cerebrales, durante la realización de tareas cognitivas en sujetos sanos y en pacientes con psicosis del espectro de la esquizofrenia (DiGiorgio et al., 2008; Prata et al., 2008; Brauns et al., 2011; Callicott et al., 2013), sugiriéndose que dicha asociación podría actuar como un posible indicador de un funcionamiento cerebral menos eficiente.

Estas dos áreas cerebrales (hipocampo y córtex pre-frontal), que mostraron diferencias estructurales y cambios funcionales en relación con variaciones en el gen *DISC1*, juegan un papel central en la fisiopatología de la esquizofrenia, estando implicadas en la génesis de la sintomatología psicótica y de los déficits cognitivos, de acuerdo con la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia (Abi-Dargham, 2005; Howes y Kapur, 2009). Interesantemente, en una revisión reciente sobre el gen *DISC1* se detallan varios hallazgos sobre la relación entre este gen y el sistema dopaminérgico en estudios celulares y animales con ratones knock-down (Soares et al., 2011).

Por lo tanto, es plausible que alteraciones en el gen *DISC1* puedan afectar, a través de la modulación de las proteínas del complejo DISC1 Interactome, algunos de los procesos de neurodesarrollo y maduración cerebral en los que intervienen. Se generarían así, a través de dichos procesos, unos circuitos cerebrales menos eficientes, produciendo finalmente un cerebro más vulnerable, posiblemente con una predisposición a una presentación clínica más grave, con un mayor déficit cognitivo y a largo plazo con un mayor adelgazamiento cortical.

En línea con este razonamiento, dos estudios recientes encuentran variaciones del gen *DISC1* asociadas a diferencias significativas en la integridad de la sustancia blanca, medida con técnicas de neuroimagen de tensor de difusión magnética (Sprooten et al., 2011; Whalley et al., 2015). Sugiriendo que estas disrupciones de la sustancia blanca podrían producir deficiencias en la transmisión de la información entre áreas cerebrales.

### **7.7. Fortalezas y debilidades de los trabajos**

A pesar de la actual controversia suscitada sobre si sigue siendo válido el estudio de genes candidatos para la investigación de las bases genéticas de una enfermedad compleja como la esquizofrenia, frente a aproximaciones más complejas como los GWAS, creemos que esta aproximación todavía es válida, e incluso complementaria a la de los GWAS. Así, consideramos que esta metodología de estudio de genes candidatos sigue siendo de interés, sobre todo cuando el objetivo es establecer el rol de un gen en fenotipos específicos. Sin embargo, en la aplicación de esta estrategia de estudio la selección de genes debe ser muy rigurosa y la justificación científica para su estudio muy sólida, criterios que en la medida de lo posible hemos tratado de incorporar en

nuestros estudios. Pese a todo, los datos encontrados en estos trabajos deberán interpretarse con cierta cautela dada las limitaciones que en ellos se pueden encontrar, y que pasaremos a analizar a continuación.

La primera limitación a mencionar es que los estudios que componen esta tesis están realizados sobre tres SNPs del gen *DISC1*, y por consiguiente para conseguir una mayor y más exacta representación de la variabilidad del gen deberían haberse incluido otros polimorfismos del gen y seguirse una metodología de análisis por haplotipos.

Otra de las limitaciones está en relación con las características de la muestra objeto de estudio, tanto en lo que concierne al número y edad de los pacientes, como al hecho de la presencia en ella de factores ambientales que puedan tener un efecto sobre los endofenotipos estudiados, como puede ser el caso del consumo de sustancias tóxicas sobre la estructura cerebral. En este sentido en nuestra muestra el consumo de cannabis y alcohol está muy extendido, y comienza a unas edades muy tempranas. Sin embargo, estos factores de confusión (potenciales) fueron controlados en los análisis estadísticos. En relación con la edad de la muestra incluida en nuestros estudios (edad media de inicio de la enfermedad 27,8 años) vemos que es más alta que la descrita en otros estudios de primeros episodios. Si bien esto podría valorarse como una limitación e interpretarse como la obtención de una muestra atípica, lo cierto es que esta derivada del hecho de haber establecido en nuestro programa de Intervención Temprana como criterio de inclusión de pacientes un rango de edad más amplio (15-65 años) del normalmente utilizado en estudios de primeros episodios de psicosis, y que consideramos más acorde con la edad de inicio de la psicosis en la práctica clínica habitual. Otra limitación tiene que ver con el tamaño muestral, el cual si bien es grande para el estudio de alguna de las variables, como por ejemplo los estudios de neuroimagen, no resulta tan grande para los estudios genéticos. Sería conveniente la replicación de estos trabajos en muestras independientes y más amplias.

Así, y a modo de conclusión general sobre la características de la población muestral, tenemos que decir que si bien las características señaladas podrían condicionar los hallazgos encontrados, ocurre que como hemos indicado están en gran medida condicionadas por el hecho de que uno de los objetivos de nuestros estudios era investigar las bases genéticas del trastorno en una población muestral representativa de los pacientes que desarrollan la enfermedad en la comunidad. La intención ha sido por

lo tanto superar en nuestros estudios las limitaciones derivadas del diseño de estudios previos en los que se utilizan muestras seleccionadas y por lo tanto sesgadas de pacientes, las cuales por lo tanto no pueden ser consideradas como representativas del global de los pacientes que desarrollan la enfermedad.

La estrategia de agrupación de los genotipos en los análisis estadísticos, la cual fue adoptada con el fin de poder comparar nuestros resultados con los de estudios previos, ha generado en ciertos casos un desequilibrio entre los grupos de genotipos, que pueden haber afectado a los análisis estadísticos posteriores, limitando nuestra capacidad de detectar asociaciones significativas. A ella habría que añadir la limitación inherente a la necesidad de realizar en algunos de los análisis múltiples pruebas estadísticas, introduciendo así la posibilidad de que algunos de los hallazgos surjan por azar. Hay que señalar no obstante que tras corregir por “pruebas múltiples”, algunas de las asociaciones significativas encontradas no se mantuvieron. Es de señalar, sin embargo, que dicha anulación de la significación podría también explicarse como derivada de un relativamente limitado tamaño muestral, siendo por ello posible considerar que en una muestra más grande la significación estadística hubiera sobrevivido a la corrección por pruebas múltiples.

Finalmente, otra debilidad de los estudios incluidos relativos a los endofenotipos cognición y estructura cerebral, ha sido la ausencia de una muestra de controles sanos suficientemente grande como para poder ser incorporada en los análisis. Ello ha impedido que hayamos podido comparar el efecto de las variaciones del gen *DISC1* en la cognición y en el grosor de la corteza cerebral entre pacientes con psicosis y sujetos sanos.

Los estudios que componen esta tesis, a pesar de las limitaciones previamente indicadas, presentan una serie de importantes fortalezas. Una de las principales es precisamente la naturaleza de la muestra sobre la que están realizados. Se trata, como ya hemos indicado, de una muestra muy homogénea y que presenta un elevado nivel de representatividad de la población que, en la comunidad de Cantabria, desarrolla la enfermedad y que por lo tanto plantea una “demanda de atención” en el sistema público de salud. Al mismo tiempo al estar incluida en un programa de intervención clínica especializado de 4º nivel, se asegura una gran fiabilidad en el proceso de elaboración diagnóstica, así como en la recogida de datos psicopatológicos y de datos relativos al

tratamiento tanto a nivel basal como todo a lo largo de seguimiento. Además, y como característica positiva adicional dicha población está incorporada en un programa de seguimiento, con un diseño clínico asistencial e investigador, a largo plazo que se extiende a lo largo de los tres primeros años del curso evolutivo de la enfermedad. Ello confiere al estudio una naturaleza excepcional que la hace única en el contexto nacional.

Finalmente, la muestra utilizada en los estudios incluidos, está formada por una amplia gama de diagnósticos de psicosis no afectiva del espectro de la esquizofrenia. Si bien este hecho podría interpretarse como una limitación ya que los resultados obtenidos podrían ser menos específicos de la sub-muestra nuclear con diagnóstico de esquizofrenia, sin embargo tienen la ventaja de permitir investigar las asociaciones entre las variaciones en el gen *DISC1* y diversas características clínicas y endofenotipos de la enfermedad de forma amplia en las psicosis no afectivas.

### **7.8. Futuras líneas de investigación**

En primer lugar, sería de gran interés en futuras investigaciones, completar el estudio del gen *DISC1*, incorporando como indicamos anteriormente una representación más completa de su variabilidad, a través del estudio de más SNPs y del uso de análisis haplotípicos.

En segundo lugar, cabe recordar que el modelo explicativo más ampliamente aceptado para la fisiopatología de la esquizofrenia postula la acción convergente de varios factores, tanto los relacionados con los genes, como con el medio ambiente. En este sentido, endofenotipos tan complejos como los aquí estudiados, como son el grosor cortical, la neurocognición y la respuesta terapéutica, serían difícilmente explicados por la acción individual de un solo gen. En este sentido sería de gran relevancia el estudio de la interacción con otros genes como por ejemplo los que codifican para las proteínas con las que interactúa la proteína DISC1 (DISC1 Interactome), u otros genes que codifican para proteínas con las que interactúa por ejemplo en la vía glutamatérgica, a través de la cual puede tener un papel en la farmacorrespuesta.

En tercer lugar, es de alto interés ampliar el estudio del efecto de este gen en la psicosis a través de otros endofenotipos que nos pueden ayudar a explicar las alteraciones

estructurales y funcionales subyacentes a la psicopatología psicótica y en concreto a los déficits cognitivos, como es el caso de la integridad de la sustancia blanca (Hashimoto et al., 2006; Sproote et al., 2011; Li et al., 2013; Voineskos, 2014). Para el estudio de este endofenotipo contamos ya con datos obtenidos del análisis de neuroimagen, de pacientes del programa PAFIP, con DTI realizado por nuestro equipo y el Laboratorio de Neuroimagen del IDIVAL.

Por último, sería de gran interés acometer el estudio de endofenotipos más específicos y más cercanos al nivel genético, como los que se están proponiendo en los últimos años en el área de la proteómica o la transcriptómica, y acerca de los cuales hay líneas de investigación abiertas en nuestro grupo.



## **8. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS**



A partir de los datos obtenidos en los estudios que componen esta tesis doctoral, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. En nuestra muestra, al contrario de lo esperado, variaciones en el polimorfismo rs821616 (Ser704Cys) del gen *DISC1* no se asocian a un diferente riesgo de padecer un trastorno psicótico del espectro de la esquizofrenia.

**Contrary to our hypothesis, variations in Ser704Cys polymorphism (rs821616) are not associated to risk of suffering a schizophrenia-spectrum psychotic disorder.**

2. El alelo Ser del polimorfismo Ser704Cys (rs821616) contribuye a una presentación psicopatológica de mayor gravedad, con sintomatología psicótica positiva, sobre todo del tipo de las alucinaciones, en pacientes afectos de un primer episodio de psicosis no afectiva.

**Ser allele in Ser704Cys polymorphism contributes to a more severe psychopathological presentation, with more severe positive symptoms, and in particular hallucinations, at the onset of a first episode of psychosis.**

3. Variaciones en el gen *DISC1* se asocian a diferencias longitudinales en la estructura cerebral en pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva; así, en estos pacientes, el grosor de la corteza cerebral evoluciona a largo plazo de diferente forma en función del genotipo *DISC1*.

**We observed significant association between the *DISC1* gene polymorphism rs6675281 alone, and the combination of rs6675281 and rs821616, and differences in long-term cortical thickness growth. We observed an overall difference in cortical thickness, as well as heightened disparities in the frontal and temporal brain regions.**

4. Variaciones en el gen *DISC1* se asocian a patrones diferenciados de evolución a largo plazo del déficit cognitivo presente al inicio de la enfermedad, en pacientes con un primer episodio de psicosis.

**Variations in *DISC1* gene polymorphisms determine differences in the long-term course in cognitive performance deficits that are present at the beginning of the illness in patients suffering from a first episode of non-affective psychosis.**

5. Variaciones en el gen *DISC1* tienen un efecto sobre la respuesta terapéutica a fármacos antipsicóticos durante las fases iniciales de un primer episodio de psicosis.

**Variations in *DISC1* gene have an effect on treatment response to antipsychotics at the initial phase of treatment in patients suffering from a first episode of non-affective psychosis.**

6. El análisis integrado de estos hallazgos nos sugiere un posible papel del gen *DISC1* en la fisiopatología de la esquizofrenia, probablemente a través de alteraciones en los procesos de neurodesarrollo en los que está implicado este gen. Se propone así la posibilidad de llegar a identificar nuevas dianas terapéuticas, en la ruta molecular del gen *DISC1*, para el tratamiento de pacientes con un primer episodio de psicosis no afectiva.

**An integrative analysis of the results suggests a possible role of *DISC1* gene in the pathophysiology of schizophrenia, probably through altered neurodevelopment processes in which it is involved. It is that way suggested the possibility of identifying new drug targets, in the *DISC1* molecular pathway, for the treatment of patients suffering from a first episode of non-affective psychosis.**

## **9. BIBLIOGRAFÍA**



1. Abi-Dargham A. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia. Schizophrenia Research Forum 2005. Available at: <http://www.schizophreniaforum.org/for/curr/AbiDargham/>
2. Addington J, Saeedi H, Addington D. The course of cognitive functioning in first episode psychosis: changes over time and impact on outcome. Schizophr Res. 2005;78:35–43.
3. Albus M, Hubmann W, Mohr F, Hecht S, Hinterberger-Weber P, Seitz NN, Küchenhoff H. Neurocognitive functioning in patients with first-episode schizophrenia: results of a prospective 5-year follow-up study. Eur Arch Psychiatry ClinNeurosci. 2006;256(7):442-51.
4. Aleman A, Khan RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. Archives of General Psychiatry. 2003;60:565-71.
5. Allott K, Liu P, Proffitt TM, Killackey E. Cognition at illness onset as a predictor of later functional outcome in early psychosis: systematic review and methodological critique. Schizophr Res. 2011;125(2-3):221-35.
6. Andlin-Sobocki P, Rossler W. Cost of psychotic disorders in Europe. Eur J Neurol. 2005;12(Suppl 1):74-77.
7. Andreasen NC. Scale for the assessment of negative symptoms (SANS). Iowa City: University of Iowa. 1983.
8. Andreasen NC. Scale for the assessment of positive symptoms (SAPS). Iowa City: University of Iowa. 1984.
9. Andreasen NC, Flaum M, Arndt S. The Comprehensive Assessment of Symptoms and History (CASH). An instrument for assessing diagnosis and psychopathology. Arch Gen Psychiatry. 1992;49(8):615-23.
10. Andreasen NC, Cohen G, Harris G, Cizadlo T, Parkkinen J, Rezai K, Swayze VW 2nd. Image processing for the study of brain structure and function: problems and programs. The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences. 1992b;4(2):125-33
11. Andreasen NC, Nopoulos P, Magnotta V, Pierson R, Ziebell S, Ho BC. Progressive brain changes in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first episode schizophrenia. Biol Psychiatry. 2011;79(7):672-679.

12. Arias B, Fabbri C, Serretti A, Drago A, Mitjans M, Gastó C, Catalán R, Fañanás L. DISC1-TSNAX and DAOA genes in major depression and citalopram efficacy. *J Affect Disord.* 2014;168:91-7.
13. Arranz MJ, de Leon J. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research. *Molecular Psychiatry.* 2007;12:707-747.
14. Atalay F, Atalay H. Gender differences in patients with schizophrenia in terms of sociodemographic and clinical characteristics. *German Journal of Psychiatry.* 2006;162:2337-2343
15. Austin CP, Ma L, Ky B, Morris JA, Shughrue PJ. DISC1 (Disrupted in Schizophrenia-1) is expressed in limbic regions of the primate brain. *Neuroreport.* 2003;14:951-954.
16. Austin CP, Ma L, Ky B, Morris JA, Shughrue PJ. Expression of Disrupted-in-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development. *Neuroscience.* 2004;124:3-10.
17. Ayalew M, Le-Niculescu H, Levey DF, Jain N, Changala B, Patel SD, Winiger E, Breier A, Shekhar A, Amdur R, Koller D, Nurnberger JI, Corvin A, Geyer M, Tsuang MT, Salomon D, Schork NJ, Fanous AH, O'Donovan MC, Niculescu AB. Convergent functional genomics of schizophrenia: from comprehensive understanding to genetic risk prediction. *Mol Psychiatry.* 2012;17(9):887-905.
18. Ayesa-Arriola R, Pérez-Iglesias R, Rodríguez-Sánchez JM, Pardo-García G, Tabares-Seisdedos R, Ayuso-Mateos JL, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Predictors of neurocognitive impairment at 3 years after a first episode non-affective psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;43:23-8.
19. Ayhan Y, Abazyan B, Nomura J, Kim R, Ladenheim B, Krasnova IN, Sawa A, Margolis RL, Cadet JL, Mori S, Vogel MW, Ross CA, Pletnikov MV. Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. *Mol Psychiatry.* 2011;16(3):293-306.
20. Badano JL, Teslovich TM, Katsanis N. The centrosome in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6(3):194-205.
21. Baldwin P, Browne D, Scully PJ, Quinn JF, Morgan MG, Kinsella A, Owens JM, Russell V, O'Callaghan E, Waddington JL. Epidemiology of first-episode psychosis: illustrating the challenges across diagnostic boundaries through the Cavan-Monaghan study at 8 years. *Schizophr Bull.* 2005;31(3):624-38.

22. Bartzoski G, Lu PH, Amar CP, Raven EP, Detore NR, Altshuler LL, Mintz J, Ventura J, Casaus LR, Luo JS, Subotnik KL, Nuechterlein KH. Long acting injection versus oral risperidone in first episode schizophrenia: differential impact on white matter myelination trajectory. *Schizophr Res.* 2011;132 (1):35-41.
23. Beauchamp G., Gagnon A. Influence of diagnostic classification on gender ratio in schizophrenia: a meta-analysis of youths hospitalized for psychosis. *Soc. Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2004;39:1017-1022.
24. Becker HE, Nieman DH, Wiltink S, Dingemans PM, van de Fliert JR, Velthorst E, de Haan L, van Amelsvoort TA, Linszen DH. Neurocognitive functioning before and after the first psychotic episode: does psychosis result in cognitive deterioration? *Psychol Med.* 2010;40(10):1599-606.
25. Bilder RM, Howe A, Novak N, Sabb F, and Parker DS. The Genetics of Cognitive Impairment in Schizophrenia: A Phenomic Perspective. *Trends Cogn Sci.* 2011;15(9):428–435.
26. Black DW, Andreasen NC. Schizophrenia, schizophreniform disorder and delusional (paranoid) disorders. In Hales RE, Yudofsky SC, Talbott JA (Eds.). *Textbook of Psychiatry.* American Psychiatric Press. APA. Washington DC, 1999.
27. Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and affective disorders cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *American Journal of Human Genetics.* 2001;69:428–433.
28. Blanc O, Brousse G, Meary A, Leboyer M, Llorca PM. Pharmacogenetic of response efficacy to antipsychotics in schizophrenia: pharmacodynamic aspects. Review and implications for clinical research. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24(2):139-60.
29. Blix E, Perski A, Berglund H, Savic I. Long-term occupational stress is associated with regional reductions in brain tissue volumes. *PLoS One.* 2013;8(6):e64065.
30. Bonner-Jackson A, Grossman LS, Harrow M, Rosen C. Neurocognition in schizophrenia: a 20-year multi-follow-up of the course of processing speed and stored knowledge. *Compr Psychiatry.* 2010;51(5):471-9.
31. Bora E, Yucel M, Pantelis C. Cognitive functioning in schizophrenia, schizoaffective disorder and affective psychoses: meta-analytic study. *Br J Psychiatry.* 2009;195(6):475-82.

32. Bose SK, McKinnon T, Mehtha MA, Turkheimer FE, Howes OD, Selvaraj S, Kempton MJ, Grasby PM. The effect of ageing on grey and White matter reductions in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2009;112(1-3):7-13
33. Bradshaw NJ, Porteous DJ. DISC1-binding proteins in neural development, signaling and schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012;62(3):1230–1241.
34. Bramon E, Pirinen M, Strange A, Lin K, Freeman C, Bellenguez C, et al. A genome-wide association analysis of a broad psychosis phenotype identifies three loci for further investigation. *Biological Psychiatry*. 2014;75(5):386-97.
35. Brandl EJ, Kennedy JL, Müller DJ. Pharmacogenetics of antipsychotics. *Can J Psychiatry*. 2014;59(2):76-88.
36. Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J Neurosci*. 2009;29(41):12768-75.
37. Brauns S, Gollub RL, Roffman JL, Yendiki A, Ho BC, Wassink TH, Heinz A, Ehrlich S. DISC1 is associated with cortical thickness and neural efficiency. *Neuroimage*. 2011;57(4):1591-600.
38. Brown AS, Begg MD., Gravestain S., Schaefer CA., Wyatt RJ, Bresnahan M. Serologic evidence of prenatal influence in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:774-780.
39. Burdick KE, Hodgkinson CA, Szeszko PR, Lencz T, Ekholm JM, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK. DISC1 and neurocognitive function in Schizophrenia. *Neuroreport*. 2005;16:1399-1402.
40. Byun MS, Kim JS, Jung WH, Jang JH, Choi JS, Kim SN, Choi CH, Chung CK, An SK, Kwon JS. Regional cortical thinning in subjects with high genetic loading for schizophrenia. *Schizophr Res*. 2012;141(2-3):197-203.
41. Callicott JH, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Verchinski BA, Meyer-Lindenberg A, Balkissoon R, Kolachana B, Goldberg TE, Weinberger DR. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *P Natl Acad Sci USA*. 2005;102:8627–32.
42. Callicott JH, Feighery EL, Mattay VS, White MG, Chen Q, Baranger DA, Berman KF, Lu B, Song H, Ming GL, Weinberger DR. DISC1 and SLC12A2 interaction affects human hippocampal function and connectivity. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2961-4.

43. Camargo LM, Collura V, Rain J-C, Mizuguchi K, Hermjakob H, Kerrien S, Bonnert TP, Whiting PJ, Brandon NJ. Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiat*. 2007;12:74–86.
44. Cannon M., Jones PB, Murray RM. Obstetric complication and schizophrenia: Historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry*. 2002;159:1080-1092.
45. Cannon M., Caspi A., Moffit TE., Harrington H., Taylor A., Murray RM. Evidence for early-childhood pan-developmental impairment specific to schizophreniform disorder: result from a longitudinal birth cohort. *Arch gen Psychiatry*. 2002;59:449-456.
46. Cannon TD, Hennah W, van Erp TGM, Thompson PM, Lonnqvist J, Huttunen M, Gasperoni T, Tuulio-Henriksson A, Pirkola T, Toga AW, Kaprio J, Mazziotta J, Peltonen L. Association of DISC1/TRAX Haplotypes With Schizophrenia, Reduced Prefrontal Gray Matter, and Impaired Short- and Long-term Memory. *Arch Gen Psychiat*. 2005;62:1205-1213.
47. Cannon TD. The inheritance of intermediate phenotypes for schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry*. 2005;18:135–140.
48. Cannon TD, Keller MC. Endophenotypes in the genetic analyses of mental disorders. *Annu Rev Clin Psychol*. 2006;2:267-90.
49. Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry*. 2005;162:12-24.
50. Cegalis J, Bowlin J. *Vigil: Software for the Assessment of Attention*. Nashua, NH: Forthought. 1991.
51. Chakravarty MM, Felsky D, Tampakeras M, Lerch JP, Mulsant BH, Kennedy JL, Voineskos AN. DISC1 and Striatal Volume: A Potential Risk Phenotype For mental Illness. *Front Psychiatry*. 2012;3:57.
52. Chandran JS, Kazanis I, Clapcote SJ, Ogawa F, Millar JK, Porteous DJ, Ffrench-Constant C. Disc1 variation leads to specific alterations in adult neurogenesis. *PLoS One*. 2014;9(10):e108088.
53. Chen Q-Y, Chen Q, Feng G-Y, Lindpaintner KI, Wang L-J, Chen Z-X, Gao ZS, Tang JS, Huang G, He L. Case-control association study of Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) gene and schizophrenia in the Chinese population. *J Psychiatr Res*. 2007;41:428–434.

54. Chiba S, Hashimoto R, Hattori S, Yohda M, Lipska B, Weinberger DR, Kunugi H. Effect of antipsychotic drugs on DISC1 and dysbindin expression in mouse frontal cortex and hippocampus. *J Neural Transm.* 2006;113(9):1337-46.
55. Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiat.* 2008;13(1):36-64.
56. Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, Mackie S, Christie S, Ogawa F, Lerch JP, Trimble K, Uchiyama M, Sakuraba Y, Kaneda H, Shiroishi T, Houslay MD, Henkelman RM, Sled JG, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JC. Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. *Neuron.* 2007; 54: 387–402.
57. Cobia DJ, Smith MJ, Wang L, Csernansky JG. Longitudinal progression of frontal and temporal lobe changes in schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2012;139:1-6.
58. Crespo-Facorro B, Pérez-Iglesias R, Ramírez-Bonilla M, Martínez-García O, Llorca J, Vázquez-Barquero JL. A practical clinical trial comparing haloperidol, risperidone, and olanzapine for the acute treatment of first-episode non-affective psychosis. *J ClinPsychiat.* 2006;67(10):1511–1521.
59. Crespo-Facorro B, Barbadillo L, Pelayo-Teran JM, Rodriguez-Sanchez JM. Neuropsychological functioning and brain structure in schizophrenia. *Int Rev Psychiatr.* 2007;19:325-36.
60. Crespo-Facorro B, Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Ramírez-Bonilla M, Martínez-García O, Pardo-García G, Vázquez-Barquero JL. Predictors of acute treatment response in patients with a first episode of non-affective psychosis: Sociodemographics, premorbid and clinical variables. *Journal of Psychiatric Research.* 2007b;41:659–666.
61. Crespo-Facorro B, Roiz-Santiañez R, Pérez-Iglesias R, Rodriguez-Sanchez JM, Mata I, Tordesillas-Gutierrez D, Sanchez E, Tabarés-Seisdedos R, Andreasen N, Magnotta V, Vázquez-Barquero JL. Global and regional cortical thinning in first-episode psychosis patients: relationships with clinical and cognitive features. *Psychological Medicine.* 2011;41(7), 1449-1460.
62. Davidson LL, Heinrichs RW. Quantification of frontal and temporal lobe brain-imaging findings in schizophrenia: a meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2003;122:69-87.
63. Deary IJ, Yang J, Davies G, Harris SE, Tenesa A, Liewald D, Luciano M, Lopez LM, Gow AJ, Corley J, Redmond P, Fox HC, Rowe SJ, Haggarty P, McNeill G, Goddard ME, Porteous DJ, Whalley LJ, Starr JM, Visscher PM. Genetic contributions to stability and change in intelligence from childhood to old age. *Nature.* 2012;482(7384):212-5

- 
64. DeRosse P, Hodgkinson CA, Lencz T, Burdick KE, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK. Disrupted in Schizophrenia 1 genotype and positive symptoms in schizophrenia. *Biol Psychiat*. 2007; 61:1208–1210.
65. DiGiorgio A, Blasi G, Sambataro F, Rampino A, Papazacharias A, Gambi F, Romano R, Caforio G, Rizzo M, Latorre V, Popolizio T, Kolachana B, Callicott JH, Nardini M, Weinberger DR, Bertolino A. Association of the Ser704Cys DISC1 polymorphism with human hippocampal formation gray matter and function during memory encoding. *Eur J Neurosci*. 2008;28:2129–2136.
66. Duff BJ, Macritchie KA, Moorhead TW, Lawrie SM, Blackwood DH. Human brain imaging studies of DISC1 in schizophrenia, bipolar disorder and depression: a systematic review. *Schizophr Res*. 2013;147(1):1-13.
67. Eastwood SL, Hodgkinson CA, Harrison PJ. DISC-1 Leu607Phe alleles differentially affect centrosomal PCM1 localization and neurotransmitter release. *Mol Psychiatry*. 2009;14:556–557.
68. Ekelund J, Hovatta I, Parker A, Paunio T, Varilo T, Martin R, Suhonen J, Ellonen P, Chan G, Sinsheimer JS, Sobel E, Juvonen H, Arajärvi R, Partonen T, Suvisaari J, Lönnqvist J, Meyer J, Peltonen L. Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1611–1617.
69. Ekelund J, Hennah W, Hiekkalinna T, Parker A, Meyer J, Lönnqvist J, Peltonen L. Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees. *Mol Psychiat*. 2004;9:1037–41.
70. Ellison-Wright I, Glahn DC, Laird AR, Thelen SM, Bullmore E. The anatomy of first-episode and chronic schizophrenia: an anatomical likelihood estimation meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2008;165:1015–1023.
71. Emsley RA, Roberts MC, Rataemane S, Pretorius J, Oosthuizen PP, Turner J, Niehaus DJ, Keyter N, Stein DJ. Ethnicity and treatment response in schizophrenia: a comparison of 3 ethnic groups. *J Clin Psychiatry*. 2002;63:9–14.
72. Engvig A, Fjell AM, Westlye LT, Moberget T, Sundseth Ø, Larsen VA, Walhovd KB. Effects of memory training on cortical thickness in the elderly. *Neuroimage*. 2010;52(4):1667-1676.
73. Ertugrul A, Ulug B. The influence of neurocognitive deficits and symptoms on disability in schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*. 2002;105(3):196-201.

74. Fanous AH, Kendler KS. Genetics of clinical features and subtypes of schizophrenia: a review of the recent literature. *Curr Psychiatry Rep.* 2008;10(2):164-70.
75. Fanous AH, Zhou B, Aggen SH, Bergen SE, Amdur RL, Duan J, et al. Genome-wide association study of clinical dimensions of schizophrenia: polygenic effect on disorganized symptoms. *Am J Psychiatry.* 2012;169(12):1309-1317.
76. Feng Y, Walsh CA. Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(6):408-16
77. Flaum M, O'Leary DS, Swayze VW, Miller DD, Arndt S, Andreasen NC. Symptom dimensions and brain morphology in schizophrenia and related psychotic disorders. *J Psychiat Res.* 1995;29:261-276.
78. Gasperoni TL, Ekelund J, Huttunen M, Palmer CGS, Tuulio-Henriksson A, Lönnqvist J, Kaprio J, Peltonen L, Cannon TD. Genetic Linkage and Association Between Chromosome 1q and working Memory Function in Schizophrenia. *Am J Med Genet B.* 2003;116:8–16.
79. Geddes JR, Verdoux H, Takei N, Lawrie SM, Bovet P, Eagles JM. Schizophrenia and complications of pregnancy and labor: an individual patient meta-analysis. *Schizophr Bull.* 1999;25:413-423.
80. Glahn DC, Curran JE, Winkler AM, Carless MA, Kent JW Jr, Charlesworth JC, Johnson MP, Göring HH, Cole SA, Dyer TD, Moses EK, Olvera RL, Kochunov P, Duggirala R, Fox PT, Almasy L, Blangero J. High dimensional endophenotype ranking in the search for major depression risk genes. *Biol Psychiatry.* 2012;71(1):6-14.
81. Glahn DC, Knowles EE, McKay DR, Sprooten E, Raventós H, Blangero J, Gottesman II, Almasy L. Arguments for the sake of endophenotypes: examining common misconceptions about the use of endophenotypes in psychiatric genetics. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2014;165B(2):122-30.
82. Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA, Jarskog LF. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2006; 81(1):47-63.
83. Goghari VM, Smith GN, Honer WG, Kopala LC, Thornton AE, Su W, Macewan GW, Lang DJ. Effects of eight weeks of atypical antipsychotic treatment on middle frontal thickness in drug-naïve first-episode psychosis patients. *Schizophrenia Research.* 2013;149(1-3):149-155.

84. Goldman AL, Pezawas L, Mattay VS, Fisl B, Verchinski BA, Chen Q, Weinberger DR, Meyer-Lindenberg A. Widespread reductions of cortical thickness in schizophrenia and spectrum disorders and evidence of heritability. *Archives General Psychiatry*. 2009;66:467–477.
85. Gottesman II, Shields J. *Schizophrenia and genetics: a twin study vantage point*. New York. Academic Press. 1971. (citado en: Glahn et al., 2014)
86. Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*. 2003;160(4):636-45.
87. Gratten J, Wray NR, Keller MC, Visscher PM. Large-scale genomics unveils the genetic architecture of psychiatric disorders. *Nature Neuroscience*. 2014;17(6):782-790.
88. Greenhill SD, Juczewski K, de Haan AM, Seaton G, Fox K, Hardingham NR. NEURODEVELOPMENT. Adult cortical plasticity depends on an early postnatal critical period. *Science*. 2015;349(6246):424-7.
89. Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, et al. Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(11):1242-50.
90. Grube BS, Bilder RM and Goldman RS. Meta-analysis of symptom factors in schizophrenia. *Schizophr Res*. 1998;31:113–120.
91. Gutiérrez-Galve L, Chu EM, Leeson VC, Price G, Barnes TR, Joyce EM, Ron MA. A longitudinal study of cortical changes and their cognitive correlates in patients followed up after first-episode psychosis. *Psychological Medicine*. 2015;45(1):205-216.
92. Haier RJ1, Karama S, Leyba L, Jung RE. MRI assessment of cortical thickness and functional activity changes in adolescent girls following three months of practice on a visual-spatial task. *BMC Res Notes*. 2009;2:174.
93. Haijma SV, Van Haren N, Cahn W, Koolschijn PC, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophr Bull*. 2013;39:1129-1138.
94. Haram M, Tesli M, Bettella F, Djurovic S, Andreassen OA, Melle I. Association between genetic variations in the oxytocin receptor gene and emotional withdrawal, but no between oxytocin pathway genes and diagnosis of psychotic disorders. *Front Hum Neurosci*. 2015;9:9.

95. Hariri AR, Weinberger DR. Imaging genomics. *Br Med Bull.* 2003;65:259-70
96. Haro JM, Salvador-Carulla L, Cabañes J, Madoz V, Vázquez-Barquero JL. Utilisation of mental health services and costs of patients with schizophrenia in three areas of Spain. *Br J Psychiatry.* 1998;173:334-40.
97. Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry.* 2005;10:40-68.
98. Hashimoto R, Numakawa T, Ohnishi T, Kumamaru E, Yagasaki Y, Ishimoto T, Mori T, Nemoto K, Adachi N, Izumi A, Chiba S, Noguchi H, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Kamiya A, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Weinberger DR, Sawa A, Kunugi H. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signalling. *Hum Mol Genet.* 2006;15:3024–3033.
99. Haukvik UK, Hartberg CB, Agartz I. Schizophrenia--what does structural MRI show? *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2013;133(8):850-3.
100. Heaton RK, Gladsjo JA, Palmer BW, Kuck J, Marcotte TD, Jeste DV. Stability and course of neuropsychological deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2001;58(1):24-32.
101. Hegarty JD, Baldessarini RJ, Tohen M, Wateraux C, Oepen G. One hundred years of schizophrenia: a meta-analysis of the outcome literature. *American Journal of Psychiatry.* 1994;151:1409-1416.
102. Heinrichs RW, Zakzanis KK. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. *Neuropsychology.* 1998;12(3):426-45.
103. Hennah W, Varilo T, Kestila M, Paunio T, Arajärvi R, Haukka J, Parker A, Martin R, Levitzky S, Partonen T, Meyer J, Lönnqvist J, Peltonen L, Ekelund J. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum Mol Genet.* 2003;12:3151–3159.
104. Hennah W, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Ekelund J, Varilo T, Partonen T, Cannon TD, Lönnqvist J, Peltonen L. A haplotype within the DISC1 gene is associated with visual memory functions in families with a high density of schizophrenia. *Mol Psychiat.* 2005;10:1097–1103.

105. Hennah W, Porteous D. The DISC1 pathway modulates expression of neurodevelopmental, synaptogenic and sensory perception genes. *PLoS One*. 2009;4(3):e4906.
106. Hikida T, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Oishi K, Hookway C, Kong S, Wu D, Xue R, Andradé M, Tankou S, Mori S, Gallagher M, Ishizuka K, Pletnikov M, Kida S, Sawa A. Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(36):14501-6.
107. Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, Malhotra AK. Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1): Association with Schizophrenia, Schizoaffective Disorder, and Bipolar Disorder. *Am J Hum Genet*. 2004;75:862–872.
108. Hoff AL, Svetina C, Shields G, Stewart J, DeLisi LE. Ten year longitudinal study of neuropsychological functioning subsequent to a first episode of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2005;78(1):27-34.
109. Horacek J, Bubenikova-Valesova V, Kopecek M, Palenicek T, Dockery C, Mohr P, Höschl C. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs*. 2006;20(5):389-409.
110. Hotta Y, Ohnuma T, Hanzawa R, Shibata N, Maeshima H, Baba H, Hatano T, Takebayashi Y, Kitazawa M, Higa M, Suzuki T, Arai H. Association study between Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) and Japanese patients with treatment-resistant schizophrenia (TRS). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(2):636-9.
111. Howes OD, Kapur S. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bull*. 2009;35:549–562.
112. Howes OD, Murray RM. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model. *Lancet*. 2014;383(9929):1677-1687.
113. Insel T, Cuthbert B, Garvey M, Heinssen R, Pine DS, Quinn K, Sanislow C, Wang P. Research Domain Criteria (RDoC): towards a new classification framework for research on mental disorders. *Am J Psychiatry*. 2010;167(7):748-751.
114. Jaaro-Peled H, Hayashi-Takagi A, Seshadri S, Kamiya A, Brandon NJ, Sawa A. Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends Neurosci*. 2009;32:485–495.

115. John B, Lewis KR. Chromosome variability and geographic distribution in insects. *Science*. 1966;152:711-721.
116. Johnstone M, Thomson PA, Hall J, McIntosh AM, Lawrie SM, Porteous DJ. DISC1 in schizophrenia: genetic mouse models and human genomic imaging. *Schizophrenia Bulletin*. 2011;37(1):14-20.
117. Juan LW, Liao CC, Lai WS, Chang CY, Pei JC, Wong WR, Liu CM, Hwu HG, Lee LJ. Phenotypic characterization of C57BL/6J mice carrying the Disc1 gene from the 129S6/SvEv strain. *Brain Struct Funct*. 2014;219(4):1417-31
118. Jung RE, Haier RJ. The parieto-frontal integration theory (P-FIT) of intelligence: converging neuroimaging evidence. *Behav Brain Sci*. 2007;30(2):135-54; discussion 154-87.
119. Kahler AK, Rimol LM, Brown AA, Djurovic S, Hartberg CB, Melle I, Dale AM, Andreassen OA, Agartz I. Effect of DISC1 SNPs on Brain Structure in Healthy Controls and Patients with a History of Psychosis. *American Journal of Medical Genetics Part B*. 2012;159B:722–730.
120. Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol*. 2005;7(12):1167-78.
121. Kamiya A, Sedlak TW, Pletnikov MV. DISC1 Pathway in Brain Development: Exploring Therapeutic Targets for Major Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. 2012;3:25.
122. Kane JM. Pharmacologic treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1999;46(10):1396-408.
123. Kaplan & Sadock's Synopsis of Psychiatry. Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry, 10th edition. Sadock BJ & Sadock VA (Ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2009. ISBN: 978-0-7817-7327-0
124. Kato T, Abe Y, Sotoyama H, Kakita A, Kominami R, Hirokawa S, Ozaki M, Takahashi H, Nawa H. Transient exposure of neonatal mice to neuregulin-1 results in hyperdopaminergic states in adulthood implication in neurodevelopmental hypothesis for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2011;16(3):307-320.

125. Keshavan MS, Haas GL, Kahn CE, Aguilar E, Dick EL, Schooler NR, Sweeney JA, Pettegrew JW. Superior temporal gyrus and the course of early schizophrenia: progressive, static, or reversible? *Journal Psychiatry Research*. 1998;32(3-4):161-167.
126. Knapp M, Mangalore R, Simon J. The global costs of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2004;30(2):279-93
127. Knickmeyer RC, Wang J, Zhu H, Geng X, Woolson S, Hamer RM, Konneker T, Lin W, Styner M, Gilmore JH. Common variants in psychiatric risk genes predict brain structure at birth. *Cereb Cortex*. 2014;24(5):1230-46.
128. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971;68:820-3.
129. Kockelkorn TT, Arai M, Matsumoto H, Fukuda N, Yamada K, Minabe Y, Toyota T, Ujike H, Sora I, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association study of polymorphisms in the 5' upstream region of human DISC1 gene with schizophrenia. *NeurosciLett*. 2004;368:41-45.
130. Koike H, Arguello PA, Kvajo M, Karayiorgou M, Gogos JA. Disc1 is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3693-7.
131. Konick LC, Friedman L. Meta-analysis of thalamic size in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2001;49:28-38.
132. Kubo K, Tomita K, Uto A, Kuroda K, Seshadri S, Cohen J, Kaibuchi K, Kamiya A, Nakajima K. Migration defects by DISC1 knockdown in C57BL/6, 129X1/SvJ, and ICR strains via in utero gene transfer and virus-mediated RNAi. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400(4):631-7.
133. Laruelle M. Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;14:97-102.
134. Lee FH, Fadel MP, Preston-Maher K, Cordes SP, Clapcote SJ, Price DJ, Roder JC, Wong AH. Disc1 point mutations in mice affect development of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(9):3197-3206.
135. Leliveld SR, Hendriks P, Michel M, Sajnani G, Bader V, Trossbach S, Prikulis I, Hartmann R, Jonas E, Willbold D, Requena JR, Korth C. Oligomer assembly of the C-terminal DISC1 domain (640-854) is controlled by self-association motifs and disease-associated polymorphism S704C. *Biochemistry*. 2009;48(32):7746-7755.

136. Lepagnol-Bestel AM, Dubertret C, Benmessaoud D, Simonneau M, Adès J, Kacha F, Hamdani N, Gorwood P, Ramoz N. Association of DISC1 gene with schizophrenia in families from two distinct French and Algerian populations. *Psychiatr Genet.* 2010;20(6):298-303.
137. Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:409-32.
138. Lezak MD. *Neuropsychological assessment.* O. U. Press. 1995
139. Lezenweger MF. Endophenotype, intermediate phenotype, biomarker: definitions, concept comparisons, clarifications. *Depress Anxiety.* 2013;30(3):185-189.
140. Li Y, Liu B, Hou B, Qin W, Wang D, Yu C, Jiang T. Less efficient information transfer in Cys-allele carriers of DISC1: a brain network study based on diffusion MRI. *Cereb Cortex.* 2013;23(7):1715-23.
141. Li W, Zhou Y, Jentsch JD, Brown RA, Tian X, Ehninger D, Hennah W, Peltonen L, Lönnqvist J, Huttunen MO, Kaprio J, Trachtenberg JT, Silva AJ, Cannon TD. Specific developmental disruption of disrupted-in-schizophrenia-1 function results in schizophrenia-related phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(46):18280-5.
142. Lipina TV, Niwa M, Jaaro-Peled H, Fletcher PJ, Seeman P, Sawa A, Roder JC. Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: implications for schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 2010;9(7):777-89.
143. Lipska BK. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci.* 2004;29(4):282-6.
144. Lipska BK, Peters T, Hyde TH, Halim N, Horowitz C, Mitkus S, Weickert CS, Matsumoto M, Sawa A, Straub RE, Vakkalanka R, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1245–1258.
145. Liu Y-L, Fann CS-J, Liu C-M, Chen WJ, Wu J-Y, Hung S-I, Chen CH, Jou YS, Liu SK, Hwang TJ, Hsieh MH, Ouyang WC, Chan HY, Chen JJ, Yang WC, Lin CY, Lee SF, Hwu HG. A Single Nucleotide Polymorphism Fine Mapping Study of Chromosome 1q42.1 Reveals the Vulnerability Genes for Schizophrenia, GNPAT and DISC1: Association with Impairment of Sustained Attention. *Biol Psychiat.* 2006;60:554–562.

- 
146. Liu B, Fan L, Cui Y, Zhang X, Hou B, Li Y, Qin W, Wang D, Yu C, Jiang T. DISC1 Ser704Cys impacts thalamic-prefrontal connectivity. *Brain Struct Funct.* 2015;220(1):91-100.
  147. Mackie S, Millar JK, Porteous DJ. Role of DISC1 in neural development and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17:95-102.
  148. Magnotta VA, Harris G, Andreasen NC, O'Leary DS, Yuh WT, Heckel D. Structural MR image processing using the BRAINS2 toolbox. *Computerized Medical Imaging and Graphics.* 2002;26:251–264.
  149. Maher BJ, LoTurco JJ. Disrupted-in-schizophrenia (DISC1) functions presynaptically at glutamatergic synapses. *PLoS One.* 2012;7(3):e34053.
  150. Malhotra AK, Murphy GM Jr, Kennedy JL. Pharmacogenetics of psychotropic drug response. *Am J Psychiatry.* 2004;161(5):780-96.
  151. Manoach DS. Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: reconciling discrepant findings. *Schizophr Res.* 2003;60(2-3):285-98
  152. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461:747-753.
  153. Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell.* 2009;136(6):1017-31.
  154. Mata I, Madoz V, Arranz MJ, Sham P, Murray RM: Olanzapine: concordant response in monozygotic twins with schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 2001;178:86.
  155. Mata I, Rodríguez-Sánchez JM, Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, González-Blanch C, Ramírez-Bonilla M, Martínez-García O, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Cannabis abuse is associated with decision-making impairment among first-episode patients with schizophrenia-spectrum psychosis. *Psychol Med.* 2008;38(9):1257-66.

156. Mata I, Perez-Iglesias R, Roiz-Santiañez R, Tordesillas-Gutierrez D, Pazos A, Gutierrez A, Vazquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Gyrfication brain abnormalities associated with adolescence and early-adulthood cannabis use. *Brain Res.* 2010;1317:297-304.
157. Mata I, Perez-Iglesias R, Roiz-Santiañez R, Tordesillas-Gutierrez D, Gonzalez-Mandly A, Berja A, Vazquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Additive effect of NRG1 and DISC1 genes on lateral ventricle enlargement in first episode schizophrenia. *Neuroimage.* 2010;53(3):1016-22.
158. Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS. Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2001;27:457-476.
159. McGrath J, Saha S, Welham J., El-Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Medicine.* 2004;2:13 .
160. McIntosh AM, Gow A, Luciano M, Davies G, Liewald DC, Harris SE, Corley J, Hall J, Starr JM, Porteous DJ, Tenesa A, Visscher PM, Deary IJ. Polygenic risk for schizophrenia is associated with cognitive change between childhood and old age. *Biol Psychiatry.* 2013;73(10):938-43.
161. Menezes NM, Arenovich T, Zipursky RB. A systematic review of longitudinal outcome studies of first-episode psychosis. *Psychol Med.* 2006;36(10):1349-62.
162. Mesholam-Gately RI, Giuliano AJ, Goff KP, Faraone SV, Seidman LJ. Neurocognition in first-episode schizophrenia: a meta-analytic review. *Neuropsychology.* 2009;23(3):315-36.
163. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Human Molecular Genetics.* 2000;9:1415–1423.
164. Millar JK, Christie S, Porteous DJ. Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function. *BiochemBioph Res Co.* 2003;311:1019–1025.
165. Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, Malloy MP, Chubb JE, Huston E, Baillie GS, Thomson PA, Hill EV, Brandon NJ, Rain JC, Camargo LM, Whiting PJ, Houslay MD, Blackwood DH, Muir WJ, Porteous DJ. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signalling. *Science.* 2005;310(5751):1187-1191.

166. Mosconi L, Murray J, Tsui WH, Li Y, Davies M, Williams S, Pirraglia E, Spector N, Osorio RS, Glodzik L, McHugh P, de Leon MJ. Mediterranean Diet and Magnetic Resonance Imaging-Assessed Brain Atrophy in Cognitively Normal Individuals at Risk for Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis.* 2014;1(1):23-32.
167. Mouaffak F, Kebir O, Chayet M, Tordjman S, Vacheron MN, Millet B, Jaafari N, Bellon A, Olié JP, Krebs MO. Association of Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) missense variants with ultra-resistant schizophrenia. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(4):267-73.
168. Muñoz-Estrada J, Benítez-King G, Berlanga C, Meza I. Altered subcellular distribution of the 75-kDa DISC1 isoform, cAMP accumulation, and decreased neuronal migration in schizophrenia and bipolar disorder: implications for neurodevelopment. *CNS Neurosci Ther.* 2015;21(5):446-53.
169. Muraki K, Tanigaki K. Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia. *Front Neurosci.* 2015;9:74.
170. Murray C, Lopez A. The global burden of disease. World Health Organization, 1996. World Health Organization and the World Bank; Geneva.
171. Nakata K, Lipska BK, Hyde TM, Ye T, Newburn EN, Morita Y, Vakkalanka R, Barenboim M, Sei Y, Weinberger DR, Kleinman JE. DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(37):15873-8.
172. Narr KL, Bilder RM, Toga AW, Woods RP, Rex DE, Szeszko PR, et al. Mapping cortical thickness and gray matter concentration in first episode schizophrenia. *Cereb Cortex.* 2005;15(6):708-19.
173. Narr KL, Toga AW, Szeszko P, Thompson PM, Woods RP, Robinson D, et al. Cortical thinning in cingulate and occipital cortices in first episode schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2005;58(1):32-40.
174. Nesvåg R, Bergmann Ø, Rimol LM, Lange EH, Haukvik UK, Hartberg CB, Fagerberg T, Söderman E, Jönsson EG, Agartz I. A 5-year follow-up study of brain cortical and subcortical abnormalities in a schizophrenia cohort. *Schizophrenia Research.* 2012;142(1-3):209-216.
175. Nicodemus KK, Elvevåg B, Foltz PW, Rosenstein M, Diaz-Asper C, Weinberger DR. Category fluency, latent semantic analysis and schizophrenia: a candidate gene approach. *Cortex.* 2014;55:182-91.

176. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo K, Gruber AJ, Tomita K, Lu L, Tomisato S, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Hiyama H, Huang B, Kohda K, Noda Y, O'Donnell P, Nakajima K, Sawa A, Nabeshima T. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron*. 2010;65(4):480-489.
177. Nour MM, Howes OD. Interpreting the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia in the context of normal brain development and ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(21):E2745.
178. Olabi B, Ellison-Wright I, McIntosh AM, Wood SJ, Bulmore E, Lawrie SM. Are there progressive brain changes in schizophrenia? A meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *Biol Psychiatry*. 2011;70(1):88-96.
179. Olincy A, House R, Gao B, Recksiek P, Phang TL, Sullivan B, Hollis JP, Hopkins J, Shade T, Edwards MG, Vianzon R, Griffiths C, Ceilley J, Helfrich RW, Ritvo J, Weis E, Weiss D, Gault J. Elevated DISC1 transcript levels in PBMCs during acute psychosis in patients with schizophrenia. *Transl Biomed*. 2011;2(1). pii: 183.
180. Osterrieth PA. Contribution à l'étude de la perception et de la mémoire (The test of copying a complex figure: a contribution to the study of perception and memory). *Arch Psychol*. 1944;30:286–350.
181. Overall JE, Gorham DR. The brief psychiatric rating scale. *Psychological Reports*. 1962;10:799-812.
182. Owen MJ, Craddock N, O'Donovan MC. Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet*. 2005;21:518–525.
183. Owen MJ, Craddock N, Jablensky A. The genetic deconstruction of psychosis. *Schizophr Bull*. 2007;33(4):905-11.
184. Ozeki Y1, Tomoda T, Kleiderlein J, Kamiya A, Bord L, Fujii K, Okawa M, Yamada N, Hatten ME, Snyder SH, Ross CA, Sawa A. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to Nude-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):289-94.
185. Palo OM, Antila M, Silander K, Henna W, Kilpinen H, Soronen P, Tuulio-Henriksson A, Kieseppä T, Partonen T, Lönnqvist J, Peltonen L, Paunio T. Association of distinct allelic haplotypes of DISC1 with psychotic and bipolar spectrum disorders and with underlying cognitive impairments. *Hum Mol Genet*. 2007;16:2517–2528.

- 
186. Panizzon MS, Fennema-Notestine C, Eyler LT, Jernigan TL, Prom-Wormley E, Neale M, Jacobson K, Lyons MJ, Grant MD, Franz CE, Xian H, Tsuang M, Fischl B, Seidman L, Dale A, Kremen WS. Distinct Genetic Influences on Cortical Surface Area and Cortical Thickness. *Cerebral Cortex*. 2009;19:2728-2735
187. Pantelis C, Velakoulis D, McGorry PD, Wood SJ, Suckling J, Phillips LJ. Neuroanatomical abnormalities before and after onset of psychosis: a cross-sectional and longitudinal MRI comparison. *Lancet*. 2003;361:281-288.
188. Papaleo F, Yang F, Garcia S, Chen J, Lu B, Crawley JN, Weinberger DR. Dysbindin-1 modulates prefrontal cortical activity and schizophrenia-like behaviours via dopamine/D2 pathways. *Mol Psychiatry*. 2012;17(1):85-98.
189. Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Ramírez-Bonilla M, González-Blanch C, Martínez-García O, Pardo-García G, Rodríguez-Sánchez JM, Roiz-Santíañez R, Tordesillas-Gutiérrez D, Mata I, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Epidemiological factors associated with treated incidence of first-episode non-affective psychosis in Cantabria: insights from the Clinical Programme on Early Phases of Psychosis. *Early Interv Psychiatry*. 2008;2(3):178-87.
190. Pelayo-Terán JM, Suárez-Pinilla P, Chadi N, Crespo-Facorro B. Gene-environment interactions underlying the effect of cannabis in first episode psychosis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(32):5024-35.
191. Pelayo-Terán JM, Diaz FJ, Pérez-Iglesias R, Suárez-Pinilla P, Tabarés-Seisdedos R, de León J, Crespo-Facorro B. Trajectories of symptom dimensions in short-term response to antipsychotic treatment in patients with a first episode of non-affective psychosis. *Psychol Med*. 2014;44(1):37-50.
192. Pełka-Wysiecka J, Wroński M, Jasiewicz A, Grzywacz A, Tybura P, Kucharska-Mazur J, Bieńkowski P, Samochowiec J. BDNF rs 6265 polymorphism and COMT rs 4680 polymorphism in deficit schizophrenia in Polish sample. *Pharmacol Rep*. 2013;65(5):1185-93.
193. Pletnikov MV, Ayhan Y, Xu Y, Nikolskaia O, Ovanesov M, Huang H, Mori S, Moran TH, Ross CA. Enlargement of the lateral ventricles in mutant DISC1 transgenic mice. *Mol Psychiatry*. 2008;13(2):115.
194. Pletnikov MV, Ayhan Y, Nikolskaia O, Xu Y, Ovanesov MV, Huang H, Mori S, Moran TH, Ross CA. Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2008;13(2):173-86

195. Plomin R, Deary IJ. Genetics and intelligence differences: five special findings. *Mol Psychiatry*. 2015;20(1):98-108.
196. Prata DP, Mechelli A, Fu CHY, Picchioni M, Kane F, Kalidindi S, et al. Effect of disrupted-in-schizophrenia-1 on pre-frontal cortical function. *Mol Psychiatr*. 2008;13:915–917.
197. Psychosis and schizophrenia in adults: treatment and management. National Institute for Health Care and Excellence, 2014. Available at: <http://www.nice.org.uk/guidance/cg178/resources>
198. Rampino A, Walker RM, Torrance HS, Anderson SM, Fazio L, Di Giorgio A, Taurisano P, Gelao B, Romano R, Masellis R, Ursini G, Caforio G, Blasi G, Millar JK, Porteous DJ, Thomson PA, Bertolino A, Evans KL. Expression of DISC1-interactome members correlates with cognitive phenotypes related to schizophrenia. *PLoSOne*. 2014;9(6):e99892.
199. Randall AD, Kurihara M, Brandon NJ, Brown JT. Disrupted in schizophrenia 1 and synaptic function in the mammalian central nervous system. *European Journal of Neuroscience*. 2014;39(7):1068-1073.
200. Rapoport JL, Addington AM, Frangou S. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Molecular Psychiatry*. 2005;10: 434-449.
201. Rapoport JL, Giedd JN, Geogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Molecular Psychiatry*. 2012;17:1228-38.
202. Raznahan A, Lee Y, Long R, Greenstein D, Clasen L, Addington A, Rapoport JL, Giedd JN. Common functional polymorphisms of DISC1 and cortical maturation in typically developing children and adolescents. *Molecular Psychiatry*. 2011;16(9):917-926.
203. Reichenberg A. The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci*. 2010;12(3):383-92.
204. Reitan RM, Wolfson D. The Halstead–Reitan neuropsychological test battery: therapy and clinical interpretation. Neuropsychological Press. 1985.
205. Rey A. L'examenclinique en psychologie. Presses Universitaires de France. 1964.
206. Rimol LM, Nesvåg R, Hagler DJ Jr, Bergmann O, Fennema-Notestine C, Hartberg CB, Haukvik UK, Lange E, Pung CJ, Server A, Melle I, Andreassen OA, Agartz I, Dale AM. Cortical volume, surface area, and thickness in schizophrenia and bipolar disorder. *Biological Psychiatry*. 2012;71:552–560.

207. Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kähler AK, Akterin S, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature Genetics*. 2013;45(10):1150-1159.
208. Rodríguez-Sánchez JM, Ayesa-Arriola R, Rérez-Iglesias R, Periañez JA, Martínez-García O, Gomez-Ruiz E, Tabares-Seisdedos R, Crespo-Facorro B. Course of cognitive deficits in first episode of non-affective psychosis: A 3-year follow-up study. *Schizophrenia Research*. 2013;150:121–128.
209. Roiser JP, Wigton R, Kilner JM, Mendez MA, Hon N, Friston KJ, Joyce EM. Dysconnectivity in the frontoparietal attention network in schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2013;4:176.
210. Roiz-Santianez R, Perez-Iglesias R, Quintero C, Tordesillas-Gutierrez D, Mata I, Ayesa R, et al. Insular cortex thinning in first episode schizophrenia patients. *Psychiatry Res*. 2010;182(3):216-22.
211. Roiz-Santiañez R, Tordesillas-Gutiérrez D, Ortiz-García de la Foz V, Ayesa-Arriola R, Gutiérrez A, Tabarés-Seisdedos R, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Effect of antipsychotic drugs on cortical thickness. A randomized controlled one-year follow-up study of haloperidol, risperidone and olanzapine. *Schizophrenia Research*. 2012;141(1):22-28.
212. Roiz-Santiañez R, Ortiz-García de la Foz V, Ayesa-Arriola R, Tordesillas-Gutiérrez D, Jorge R, Varela-Gómez N, Suárez-Pinilla P, Córdova-Palomera A, Navasa-Melado JM, Crespo-Facorro B. No progression of the alterations in the cortical thickness of individuals with schizophrenia-spectrum disorder: A three-year longitudinal MRI study of first-episode patients. *Psychol Med*. 2015;45(13):2861-71.
213. Rössler W, Salize HJ, van Os, Riecher-Rössler A. Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005;15(4):399-409.
214. Saha S, Chant D, Welham J y McGrath J. A systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia. *PloS Med*. 2005;2(5):e141,0413-0433.
215. Sanjuan J. Etiopatogenia de las alucinaciones auditivas en la esquizofrenia. *Revista de Neurologia*. 2006;43(5):280-286.
216. Savic I. Structural changes of the brain in relation to occupational stress. *Cereb Cortex*. 2015;25(6):1554-64.

217. Sawa A, Snyder SH. Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science*. 2002;296:692–695
218. Sawa A, Snyder SH. Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies. *Mol Med*. 2003;9(1-2):3–9.
219. Sawamura N, Sawamura-Yamamoto T, Ozeki Y, Ross CA, Sawa A. A form of DISC1 enriched in nucleus: altered subcellular distribution in orbitofrontal cortex in psychosis and substance/alcohol abuse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(4):1187-92.
220. Schaufelberger MS, Lappin JM, Duran FL, Rosa PG, Uchida RR, Santos LC, Murray RM, McGuire PK, Scazufca M, Menezes PR, Busatto G. Lack of progression of brain abnormalities in first-episode psychosis: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Psychological Medicine*. 2011;41(8):1677-1689.
221. Schmitt A, Malchow B, Hassan A., Falkai P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front. Neurosci*. 2014;8:19.
222. Schulze B, Rossler W. Caregiver burden in mental illness: review of measurement, findings and interventions in 2004-2005. *Curr Opin Psychiatry*. 2005;18(6):684-691.
223. Shen S, Lang B, Nakamoto C, Zhang F, Pu J, Kuan SL, Chatzi C, He S, Mackie I, Brandon NJ, Marquis KL, Day M, Hurko O, McCaig CD, Riedel G, St Clair D. Schizophrenia-related neural and behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Disc1. *J Neurosci*. 2008;28(43):10893-904.
224. Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001;49:1–52.
225. Shoji H, Toyama K, Takamiya Y, Wakana S, Gondo Y, Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of ENU-induced Disc1-Q31L and -L100P mutant mice. *BMC Res Notes*. 2012;5:108.
226. Sizonenko SV, Babiloni C, de Bruin EA, Isaacs EB, Jönsson LS, Kennedy DO, Latulippe ME, Mohajeri MH, Moreines J, Pietrini P, Walhovd KB, Winwood RJ, Sijben JW. Brain imaging and human nutrition: which measures to use in intervention studies? *British Journal of Nutrition*. 2013;110(Suppl 1):1-30.
227. Soares DC, Carlyle BC, Bradshaw NJ, Porteous DJ. DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness. *ACS ChemNeurosci* 2011;2(11):609-632.

- 
228. Sprooten E, Sussmann JE, Moorhead TW, Whalley HC, French-Constant C, Blumberg HP, Bastin ME, Hall J, Lawrie SM, McIntosh AM. Association of white matter integrity with genetic variation in an exonic DISC1 SNP. *Mol Psychiatry*. 2011;6(7):685-9.
229. Stacey D, Redlich R, Opel N, Grotegerd D, Arolt V, Kugel H, Heindel W, Baune BT, Dannlowski U. No evidence of DISC1-associated morphological changes in the hippocampus, anterior cingulate cortex, or striatum in major depressive disorder cases and healthy controls. *J Affect Disord*. 2014;166:103-7.
230. St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans HJ. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet*. 1990;336:13-16.
231. Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry*. 2006;188:510-518.
232. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*. 2009;460(7256):744-747.
233. Steinecke A, Gampe C, Valkova C, Kaether C, Bolz J. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons. *J Neurosci*. 2012;32(2):738-45.
234. Steinecke A, Gampe C, Nitzsche F, Bolz J. DISC1 knockdown impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:190.
235. Su P, Li S, Chen S, Lipina TV, Wang M, Lai TK, Lee FH, Zhang H, Zhai D, Ferguson SS, Norega JN, Wong AH, Roder JC, Fletcher PJ, Liu F. A dopamine D2 receptor-DISC1 protein complex may contribute to antipsychotic-like effects. *Neuron*. 2014;84(6):1302-16.
236. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(12):1187-92.
237. Szeszko PR, Hodgkinson CA, Robinson DG, DeRosse P, Bilder RM, Lencz T, Burdick KE, Napolitano B, Betensky JD, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK. DISC1 is associated with prefrontal cortical gray matter and positive symptoms in schizophrenia. *BiolPsychol*. 2008;79:103-110.

238. Szöke A, Trandafir A, Dupont ME, Méary A, Schürhoff F, Leboyer M. Longitudinal studies of cognition in schizophrenia: meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2008;192(4):248-57.
239. Takahashi T, Suzukia M, Tsunodaa M, Maeno N, Kawasakia Y, Zhou S-Y, Hagino H, Niu L, Tsuneki H, Kobayashi S, Sasaoka T, Seto H, Kurachi M, Ozaki N. The Disrupted-in-Schizophrenia-1 Ser704Cys polymorphism and brainmorphology in schizophrenia. *Psychiat Res*. 2009;172:128–135.
240. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, “Just the Facts”. What we know in 2008: 2- Epidemiology and Etiology. *Schizophrenia Research*. 2008;102:1-18.
241. Terzić T, Kastelic M, Dolžan V, Plesničar BK. Genetic variability testing of neurodevelopmental genes in schizophrenic patients. *J Mol Neurosci*. 2015;56(1):205-11.
242. Thompson PM, Stein JL, Medland SE, Hibar DP, Vasquez AA, Renteria ME, et al. The ENIGMA Consortium: large-scale collaborative analyses of neuroimaging and genetic data. *Brain Imaging Behav*. 2014;8(2):153-82
243. Thomson PA, Harris SE, Starr JM, Whalley LJ, Porteous DJ, Deary IJ. Association between genotype at an exonic SNP in DISC1 and normal cognitive aging. *NeurosciLett*. 2005;389:41–45.
244. Thomson PA, Malavasi EL, Grünwald E, Soares DC, Borkowska M, Millar JK. DISC1 genetics, biology and psychiatric illness. *Front Biol*. 2013;8(1):1-31.
245. Tolosa A, Sanjuán J, Dagnall AM, Moltó MD, Herrero N, de Frutos R. FOXP2 gene and language impairment in schizophrenia: association and epigenetic studies. *BMC Med Genet*. 2010;11:114.
246. Tomppo L, Hennah W, Miettunen J, Järvelin M-R, Veijola J, Ripatti S, Lahermo P, Lichtermann D, Peltonen L, Ekelund J. Association of Variants in DISC1 with Psychosis-Related Traits in a Large Population Cohort. *Arch Gen Psychiat*. 2009;66:134-141.
247. Trossbach SV, Fehsel K, Henning U, Winterer G, Luckhaus C, Schäble S, Silva MA, Korth C. Peripheral DISC1 protein levels as a trait marker for schizophrenia and modulating effects of nicotine. *Behav Brain Res*. 2014;275:176-82.

248. Trost S, Platz B, Usher J, Scherk H, Wobrock T, Ekawardhani S, Meyer J, Reith W, Falkai P, Gruber O. DISC1 (disrupted-in-schizophrenia 1) is associated with cortical grey matter volumes in the human brain: a voxel-based morphometry (VBM) study. *Journal of Psychiatry Research*. 2013;47(2):188-196.
249. Tuladhar AM, Reid AT, Shumskaya E, de Laat KF, van Norden AG, van Dijk EJ, Norris DG, de Leeuw FE. Relationship between white matter hyperintensities, cortical thickness, and cognition. *Stroke*. 2015;46(2):425-32.
250. Ustun TB, Rehm J, Chaterji S, y col. Multiple-informant ranking of the disabling effects of different health conditions in 14 countries. WHO/NIH Joint Project CAR Study Group. *Lancet*. 1999;354(9173):111-115.
251. van Haren NE, Schnack HG, Cahn W, van den Heuvel MP, Lepage C, Collins L, Evans AC, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Changes in cortical thickness during the course of illness in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 2011;68(9):871-880.
252. van Os J, Kenis G, Rutten. The environment and the schizophrenia. *Nature*. 2010;468:203-212
253. Vázquez-Bourgon J, Arranz MJ, Mata I, Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Medina-González L, Carrasco-Marín E, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. Serotonin transporter polymorphisms and early response to antipsychotic treatment in first episode of psychosis. *Psychiatry Res*. 2010;175(3):189-94.
254. Vázquez-Polo FJ, Negrim M, Cabases JM y col. An analysis of the costs of treating schizophrenia in Spain: a hierarchical Bayesian approach. *J Ment Health Policy Econ*. 2005;8(3):153-165.
255. Venkatasubramanian G, Jayakumar PN, Gangadhar BN, Keshavan MS. Automated MRI parcellation study of regional volume and thickness of prefrontal cortex (PFC) in antipsychotic-naive schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*. 2008;117(6):420-31.
256. Vita A, De Peri L, Silenzi C, Dieci M. Brain morphology in first-episode schizophrenia: a meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies. *Schizophr Res*. 2006;82:75–88.
257. Voineskos AN. Genetic underpinnings of white matter 'connectivity': heritability, risk, and heterogeneity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2015;161(1):50-60.

258. Wang Q, Jaaro-Peled H, Sawa A, Brandon NJ. How has DISC1 enabled drug discovery? *Mol Cell Neurosci*. 2008;37:187-195.
259. Weschsler D. *Weschler Adult Intelligence Scale-III*. The Psychological Corporation. 1997.
260. Whalley HC, Dimitrova R, Sprooten E, Dauvermann MR, Romaniuk L, Duff B, Watson AR, Moorhead B, Bastin M, Semple SI, Giles S, Hall J, Thomson P, Roberts N, Hughes ZA, Brandon NJ, Dunlop J, Whitcher B, Blackwood DH, McIntosh AM, Lawrie SM. Effects of a Balanced Translocation between Chromosomes 1 and 11 Disrupting the DISC1 Locus on White Matter Integrity. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130900.
261. White T, Andreasen NC, Nopoulos P, Magnotta V. Gyrfication abnormalities in childhood- and adolescent-onset schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2003;54(4):418-26.
262. WHO World Health Report: new understanding, new hope, 2001, Geneva
263. Winkler AM, Kochunov P, Blangero J, Almasy L, Zilles K, Fox PT, Duggirala R, Glahn DC. Cortical thickness or grey matter volume? The importance of selecting the phenotype for imaging genetics studies. *Neuroimage*. 2010;53(3):1135-46.
264. Witthaus H, Kaufmann C, Bohner G, Ozgürdal S, Gudlowski Y, Gallinat J, Ruhrmann S, Brüne M, Heinz A, Klingebiel R, Juckel G. Gray matter abnormalities in subjects at ultra-high risk for schizophrenia and first-episode schizophrenic patients compared to healthy controls. *Psychiatry Res*. 2009;173(3):163-9.
265. Woods SW. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry*. 2003;64(6):663-667.
266. Wood SJ, Kennedy D, Phillips LJ, Seal ML, Yücel M, Nelson B, Yung AR, Jackson G, McGorry PD, Velakoulis D, Pantelis C. Hippocampal pathology in individuals at ultra-high risk for psychosis: a multimodal magnetic resonance study. *Neuroimage*. 2010;52:62-68.
267. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000;157:16–25.
268. Wu EQ, Birnbaum HG, Shi L, Ball DE, Kessler RC, Moulis M, Aggarwal J. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2002. *J Clin Psychiatry*. 2005;66(9):1122-1129.

269. Yang Y, Nuechterlein KH, Phillips O, Hamilton LS, Subotnik KL, Asarnow RF, Toga AW, Narr KL. The contributions of disease and genetic factors towards regional cortical thinning in schizophrenia: the UCLA family study. *Schizophr Res.* 2010;123(2-3):116-25.
270. Zhang X, Tochigi M, Ohashi J, Maeda K, Kato T, Okazaki Y, Kato N, Tokunaga K, Sawa A, Sasaki T. Association study of the DISC1/TRAX locus with schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res.* 2005;79:175–180.
271. Zipursky RB, Reilly TJ, Murray RM. The myth of schizophrenia as a progressive brain disease. *Schizophr Bull.* 2013;39(6):1363-72.