

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

***“Estudio de variación genética de la monoamino oxidasa tipo A (MAO-A)
y tipo B (MAO-B) en pacientes con esquizofrenia”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

M. en C. BEATRIZ ELENA CAMARENA MEDELLIN

Director de tesis

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez

México, D.F. Mayo 2013.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez

Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

ASESOR

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

ASESORA

Dra. Mavil López Casamichana

Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

ASESORA

Dra. Ana Fresán Orellana

Investigador en Ciencias Médicas “C”, Instituto Nacional de Psiquiatría
Ramón de la Fuente Muñiz

ASESORA

Dra. Rebeca Robles García

Investigador en Ciencias Médicas “C”, Instituto Nacional de Psiquiatría
Ramón de la Fuente Muñiz

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) y en particular a los profesores del Posgrado de Ciencias Genómicas por la formación recibida, la cual me ayudará en mi desempeño profesional.

A mi tutor, el Dr. Humberto Nicolini Sánchez, porque ha sido mi guía y maestro en un área tan interesante como es la Genética Psiquiátrica.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Genética, por su gran apoyo y amistad y en especial a mi grupo de trabajo, Sandra Hernandez y Alejandro Aguilar; así como también a Alfonso Tovilla, en el tiempo que compartimos experiencias.

A mis colaboradores de la Clínica de Esquizofrenia del INPRFM, Dr. Raúl Escamilla, Dr. Ricardo Saracco y Dr. Iván Vargas, por el apoyo de sus pacientes.

A mis asesores, Dra. Ana Fresán, Dra. Rebeca Robles, Dr. Mauricio Castañón y Dra. Mavil López Casamichana por las valiosas aportaciones a mi trabajo de tesis.

A todos los pacientes que de manera desinteresada y voluntaria aceptaron participar en el estudio.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi papá, mamá, hermanos Daniel, Nacho y Jaime^t, con mucho cariño y agradecimiento.

A mis sobrinos, Vania, Lalo, Paulina, César y Carlitos, con mucho cariño.

A todos mis amigos y familiares que siempre me han apoyado en mi desarrollo académico y profesional.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES GENERALES	10
1.1 Introducción	10
1.2 La esquizofrenia	11
1.3 Estudios neurobiológicos	14
1.3.1 Reconceptualización de la hipótesis dopaminérgica en la esquizofrenia	14
1.4 Genética de la esquizofrenia	23
1.4.1 Estudios de familias	23
1.4.2 Estudios de gemelos	25
1.4.3 Estudios de adopción	26
1.4.4 Estudios de segregación	28
1.4.5 Estudios de ligamiento	29
1.5 La enzima monoamino oxidasa (MAO)	31
1.5.1 Localización de la MAO	33
1.6 Genes de la <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i>	34
1.6.1 Organización de la región promotora de los genes <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i>	36
1.6.2 Ratones knock-out del gen <i>MAOA</i>	41
1.6.3 Requisitos estructurales de <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i> que son esenciales para su actividad catalítica	42
1.6.4 Variantes moleculares descritas en el gen <i>MAOA</i>	46
1.6.5 Variantes moleculares descritas en <i>MAOB</i>	53

2. ESTADO DEL ARTE	55
El estudio genético de la <i>MAO</i> en esquizofrenia	55
3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	60
4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DE LOS GENES <i>MAOA</i> Y <i>MAOB</i> EN ESQUIZOFRENIA	62
5. OBJETIVOS	63
Objetivo general	63
Objetivos particulares	63
6. ESTRATEGIA GENERAL	64
7. METODOLOGÍA	65
7.1 Descripción de la muestra	65
7.2 Análisis genético	67
7.2.1 Extracción de ADN genómico	67
7.2.2 Análisis de los polimorfismos en el gen <i>MAOA</i>	68
7.2.3 Análisis del polimorfismo del gen <i>MAOB</i>	70
7.2.4 Análisis estadístico de la muestra	71
8. RESULTADOS	76
8.1 Análisis de las características clínicas y demográficas de la muestras analizadas	76
8.2 Análisis de las frecuencias de genotipos y alelos en las muestras estudiadas	77
8.3 Estudios de asociación basado en familia	80

8.3.1	Análisis por X-APL en las familias estudiadas	80
8.3.2	Análisis por género de lamuestra de familias con esquizofrenia	80
8.3.3	Análisis de los subtipos de esquizofrenia en las 60 familias	81
8.3.4	Análisis cuantitativo por FBAT de las características clínicas de las familias con esquizofrenia	82
8.3.5	Análisis de la transmisión de haplotipos asociados a las características clínicas	86
8.4	Estudio de casos y controles	88
8.4.1	Análisis cuantitativo entre los polimorfismos de la <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i> y los síntomas psicóticos en pacientes con esquizofrenia	88
8.4.2	Análisis por haplotipos en las muestras de casos y controles	90
9.	DISCUSIÓN	92
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características de la monoamino oxidasa	32
Tabla 2	Estudios de asociación de los genes <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i> en esquizofrenia	58
Tabla 3	Características clínicas por género de los pacientes con esquizofrenia	76
Tabla 4	Frecuencia de alelos de los polimorfismos de los genes <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i> en las muestras analizadas	79
Tabla 5	Análisis X-APL de las familias con múltiples afectados con esquizofrenia	80
Tabla 6	Análisis X-APL por género de las familias con múltiples afectados con esquizofrenia	81
Tabla 7	Subtipos de esquizofrenia en pares de hermanos	81
Tabla 8	Análisis X-APL de las familias con pares de hermanos concordantes para el subtipo de esquizofrenia paranoide	82
Tabla 9	Análisis cuantitativo por FBAT de la edad de inicio de la esquizofrenia	83
Tabla 10	Análisis cuantitativo por FBAT de los síntomas positivos	84
Tabla 11	Análisis cuantitativo por FBAT de los síntomas negativos	85
Tabla 12	Análisis del LD (D') de los polimorfismos uVNTR, C1460T y A644G en las familias estudiadas	86
Tabla 13	Análisis cuantitativo por FBAT entre haplotipos uVNTR/C1460T del gen de la <i>MAOA</i> y la gravedad de los síntomas positivos y negativos	87
Tabla 14	Efecto de los genes de la <i>MAO</i> en los síntomas negativos en las mujeres con esquizofrenia	89
Tabla 15	Frecuencias de haplotipos del gen <i>MAOA</i> en pacientes con esquizofrenia y controles sanos utilizando el programa THESIAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Riesgo para desarrollar esquizofrenia en familiares de pacientes con esquizofrenia	24
Figura 2	Tasas de concordancia para esquizofrenia en estudios de gemelos	26
Figura 3	Estudios de adopción en esquizofrenia	28
Figura 4	Estudios de ligamiento genético en esquizofrenia	30
Figura 5	Esquema tridimensional de la enzima MAO	33
Figura 6	Esquema de la localización y constitución de los genes <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i>	35
Figura 7	Mapa de la región promotora <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i>	37
Figura 8	Esquema de los factores de transcripción de <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i>	39
Figura 9	Sitios de unión de la <i>MAOA</i> y <i>MAOB</i> a sustratos y a FAD	43
Figura 10	Estructura 3D de la <i>MAOA</i> humana	45
Figura 11	Esquema del polimorfismo uVNTR del gen <i>MAOA</i>	51
Figura 12	Esquema de la estructura y secuencia del polimorfismo VNTR P2	52
Figura 13	Esquema de los polimorfismos analizados en pacientes con esquizofrenia	57
Figura 14	Foto del análisis del polimorfismo <i>MAOA</i> /uVNTR	77
Figura 15	Foto del análisis del polimorfismo <i>MAOA</i> /C1460T en geles de agarosa	78
Figura 16	Foto del análisis del polimorfismo <i>MAOB</i> /A644G en geles de agarosa	78

1. ANTECEDENTES GENERALES.

1.1 Introducción

La genética clásica tiene como propósito principal determinar si una enfermedad es heredable y de esta manera delinear el modelo de herencia. Los estudios realizados en esta área han llegado a establecer que la herencia juega un papel muy importante en la transmisión de enfermedades. En el área de la psiquiatría, la contribución de genes ha sido sugerida a partir de los datos generados en estudios de familias, de gemelos y de adopción. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible establecer de manera precisa el patrón de herencia. La conclusión derivada de este tipo de estudios es que los trastornos mentales son genéticamente heterogéneos, sugiriendo más bien que múltiples genes interaccionan para producir la vulnerabilidad a desarrollar este tipo de trastornos.

La meta de la genética psiquiátrica es identificar cada uno de los loci genéticos que participan en el desarrollo de un determinado trastorno. Sin embargo, actualmente esto no es suficiente, la heterogeneidad de los trastornos obliga a tratar de desmenuzar el trastorno en pequeñas características fenomenológicas que puedan explicar cada uno de los diversos síntomas que describen a una enfermedad, y que resulta ser el caso de los trastornos mentales. Tan complicado como la interacción gen-gen en las enfermedades mentales, resulta la interacción entre genes y factores no genéticos para convertir esa vulnerabilidad a enfermedad. Entre los factores no genéticos tenemos a los factores ambientales, por ejemplo las diferentes experiencias a lo largo de la vida del individuo.

Otra de las dificultades a la que se enfrenta el estudio de los trastornos mentales, es la definición de fenotipos, es decir, la identificación de grupos de individuos con síntomas mentales que demuestren ser genéticamente homogéneos y que permitan un análisis lo suficientemente robusto y confiable. Recientemente se ha propuesto que además de agrupar a los pacientes por trastorno, se clasifiquen también por rasgos conductuales o características clínicas similares, a los que se denomina "endofenotipos".

La identificación de variantes genéticas que produzcan vulnerabilidad a padecer enfermedades mentales nos permitirá obtener mayor información sobre los agentes etiológicos, su función en el cerebro, los estados del desarrollo en que son activos y bajo que circunstancias; así como también identificar nuevos blancos moleculares para el desarrollo de medicamentos (farmacogenómica).

1.2 La esquizofrenia

La esquizofrenia es definida como una condición compleja, la cual puede ser una enfermedad o un conjunto de enfermedades mentales con causas diferentes, debido a esto, no todos los pacientes diagnosticados con esquizofrenia presentan los mismos síntomas.

La aparición del primer síntoma psicótico es la principal manifestación del desarrollo de la esquizofrenia. La "psicosis" es un síndrome, es decir una serie de síntomas que pueden estar asociados a diversos trastornos psiquiátricos. La persona que la padece se encuentra fuera de contacto con la realidad o incapaz de separar las experiencias reales de las no reales.

La esquizofrenia se divide en cinco tipos: paranoide, desorganizada, catatónica, indiferenciada y residual (American Psychiatric Association 1994).

La paranoide se caracteriza por la presencia de delirios y alucinaciones; la desorganizada es asignada cuando existe la presencia de un lenguaje y conducta desorganizada y afecto inapropiado o aplanado; la catatónica es asignado cuando se encuentran presentes síntomas catatónicos; indiferenciado se refiere cuando los síntomas en fase activa no cumplen los criterios diagnósticos para cualquiera de las anteriores; y residual se refiere a la presencia de síntomas negativos o de la presencia de delirios, alucinaciones o lenguaje desorganizado, pero en una forma atenuada.

Los síntomas psicóticos se dividen en síntomas positivos, síntomas negativos y síntomas desorganizados.

Los síntomas positivos reflejan un exceso de las funciones normales, e incluyen los delirios y alucinaciones. Estos pueden estar acompañados de un lenguaje y comunicación distorsionado y exagerado.

Los delirios son ideas extrañas y fuera de la realidad que no pueden ser desterradas mediante un razonamiento lógico.

Las alucinaciones, son percepciones que el individuo experimenta de manera similar a los sueños pero que ocurren cuando la persona esta despierta, de tal manera que el paciente puede escuchar y en ocasiones ver cosas que no existen.

Los síntomas desorganizados incluyen el pensamiento y lenguaje confuso o una conducta desorganizada que generalmente no tiene sentido.

Los síntomas negativos incluyen el afecto aplanado, disminución de la motivación o energía y comunicación limitada. Además, son considerados como una reducción en las funciones normales, e incluyen al menos cinco tipos de síntomas: afecto aplanado, dificultad de expresar claramente sus emociones mostrando poca emotividad; alogia, limitación en la fluidez de pensamiento y lenguaje; limitación en conductas orientadas a la obtención de metas; anhedonia, pérdida del placer; y deterioro en la atención.

Aunque estos síntomas no son tan severos como los síntomas positivos, estos síntomas pueden interferir con las actividades diarias de una persona.

Estudios epidemiológicos han reportado una prevalencia de esquizofrenia a lo largo de la vida del 1% (McGrath et al 2008; Gottesman, 1991). De acuerdo a esta información, en nuestro país existen alrededor de un millón de personas con esquizofrenia.

Estudios clínicos y epidemiológicos han reportado diversos factores de riesgo para su desarrollo, entre los que se encuentra la presencia de historia familiar, complicaciones durante el embarazo, enfermedades durante la niñez, el género y la presencia de infecciones virales (Tsuang and Faraone, 1995).

Esta enfermedad afecta tanto a hombres como a mujeres. La edad de inicio es temprana, en la adolescencia o alrededor de los 20 años en hombres y entre los 20 y 30 años en mujeres. De manera interesante, se ha observado en la esquizofrenia diferencias por género en la edad de inicio del trastorno, en el tipo de síntomas y curso de la enfermedad, en la que los hombres, por ejemplo, tienen una edad de inicio más temprana y un curso más severo, comparado con las

mujeres (Lewine 1988; De Lisi et al., 1989).

Algunos estudios clínicos han reportado diferencias por género en cuanto a la sintomatología, en la que las mujeres muestran una tendencia a desarrollar síntomas afectivos y de paranoia, mientras que los hombres más frecuentemente muestran síntomas negativos, en especial una falta de motivación y de energía (Seeman 1982; Lewine 1985).

1.3 Estudios neurobiológicos

Hasta la fecha, no se conocen las bases biológicas en la esquizofrenia. Sin embargo, se ha sugerido que el sistema dopaminérgico juega un papel importante en el desarrollo de la esquizofrenia. Hallazgos obtenidos durante varias décadas han transformado la hipótesis original sugiriendo tres diferentes etapas, e involucran a la dopamina como uno de los agentes etiológicos en el desarrollo de una enfermedad tan compleja como la esquizofrenia (Howes y Kapur, 2009).

1.3.1 Reconceptualización de la hipótesis dopaminérgica en la esquizofrenia.

Hasta la fecha se desconoce la etiología de la esquizofrenia, sin embargo desde hace varias décadas se ha propuesto una disfunción en el sistema dopaminérgico en el desarrollo de esta enfermedad (Carlsson y Lindqvist 1963).

La evidencia obtenida a partir de estudios clínicos, farmacológicos, de imagen y en modelos animales, ha reconceptualizado la hipótesis dopaminérgica. A continuación se hace una descripción de éstos cambios, en la que Howes y Kapur

(2009) proponen tres diferentes versiones a lo largo del tiempo y que han tenido como propósito tratar de entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la esquizofrenia.

Versión I

La primera versión de la hipótesis dopaminérgica ha sido titulada “la hipótesis del receptor dopaminérgico” y surge a partir del descubrimiento de los antipsicóticos y del trabajo de Carlsson y Lindqvist (1963) en el cual reportan un incremento del metabolismo de dopamina en animales tratados con este tipo de fármacos. Estudios posteriores surgen a partir del uso de la riserpina, fármaco utilizado para tratar los síntomas psicóticos y que demostraron que bloquea la recaptura de dopamina y otras monoaminas llevando al alivio de estos síntomas.

Evidencia obtenida a partir de un meta-análisis que incluyó 36 estudios reportados sobre el uso de psicoestimulantes en pacientes con esquizofrenia demostró que el uso de anfetaminas incrementa los niveles de monoaminas sinápticas induciendo síntomas psicóticos (Lieberman et al., 1987). Sin embargo, fue hasta los 70s cuando se plantea la hipótesis dopaminérgica con base en los hallazgos sobre la efectividad clínica de los antipsicóticos y su relación directa con la afinidad por los receptores a dopamina (Mathysse et al., 1973; Snyder et al., 1976). Todos estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que una función hiperdopaminérgica estaba involucrada en la etiología de la esquizofrenia.

Versión II

En 1991, Davis et al (1991) publicó un trabajo en el que propuso una nueva modificación a la hipótesis, a la que llamó “Modificación a la hipótesis dopaminérgica en la esquizofrenia”, basada en los nuevos hallazgos publicados hasta esa fecha. La principal modificación, es la referente a especificar las regiones cerebrales involucradas y las inconsistencias reportadas sobre un elevado metabolismo dopaminérgico en líquido cefalorraquídeo y suero de pacientes esquizofrénicos. Otro hallazgo que puso en duda que los receptores dopaminérgicos eran esenciales para el desarrollo de la esquizofrenia, son los reportes que muestran una asociación eficacia terapéutica con clozapina y baja afinidad y ocupación de los receptores D2 a dopamina en pacientes refractarios a otros antipsicóticos. Los estudios post-mortem del receptor D2 a dopamina en esquizofrenia y los estudios de los receptores D2 y D3 mediante tomografía por emisión de positrones (PET) mostraron resultados contradictorios.

De tal forma que los hallazgos anteriores, resultaban incompatibles con un simple exceso de la neurotransmisión dopaminérgica propuesta en la versión I. Aunado a lo anterior, diversos estudios reportan una disminución de los metabolitos de la dopamina en algunos pacientes con esquizofrenia, mientras que otros, lo relacionaban con la gravedad de los síntomas y la respuesta a los antipsicóticos. Drew et al., (1991) tomando en cuenta todas estas inconsistencias y la reciente evidencia que mostraba una distribución diferencial de los receptores dopaminérgicos, caracterizados como D1 predominantemente cortical y D2, subcortical, sugiere que los efectos de las anomalías dopaminérgicas podrían

variar de región a región cerebral. Más tarde, los estudios de PET mostraron un flujo cerebral reducido en la corteza frontal, proporcionando la mejor evidencia sobre una disfunción en una región cerebral en la esquizofrenia. La denominada “hipofrontalidad” se reportó relacionada con niveles bajos de metabolitos de dopamina en líquido cefalorraquídeo y, dado que estos niveles reflejan el metabolismo dopaminérgico cortical, los autores sugieren una hipodopaminergia prefrontal. De esta manera, la hipótesis dopaminérgica cambia de ser una hipótesis muy generalizada a una que define regiones más específicas, hipodopaminergia prefrontal y una hiperdopaminergia subcortical, proporcionando evidencia indirecta que apoyó a la hipótesis dopaminérgica. Sin embargo, los modelos animales proporcionaron evidencia directa de la hipo e hiperdopaminergia. La producción de lesiones en las neuronas dopaminérgicas de la corteza prefrontal, produce un incremento de dopamina y sus metabolitos y una mayor densidad de dopamina en el striatum. La aplicación de agonistas dopaminérgicos en las áreas prefrontales mostró una disminución de los metabolitos de dopamina en el striatum. Estos hallazgos proponen que la esquizofrenia esta caracterizada por una hipodopaminergia frontal que resulta en una hiperdopaminergia striatal.

Con base en la similitud de las conductas exhibidas por las lesiones de lóbulo frontal en los animales y los síntomas negativos en pacientes con esquizofrenia, se ha propuesto que los síntomas negativos de la esquizofrenia resultan de una hipodopaminergia frontal. Por otro lado, los hallazgos que muestran correlación entre niveles altos de los metabolitos de dopamina y gravedad de los síntomas

positivos y la respuesta al tratamiento con antipsicóticos sugieren que los síntomas positivos resultan de una hiperdopaminergia striatal

Sin embargo, también esta hipótesis muestra debilidades; una de ellas es que la mayor parte de la evidencia es inferida a partir de datos obtenidos en estudios en animales o determinadas condiciones clínicas. Aunado a lo anterior, no existía evidencia directa que apoyara los datos de niveles bajos de dopamina en la corteza frontal y una función striatal elevada. Tampoco era claro como las anormalidades dopaminérgicas se relacionaban con las características clínicas, es decir, cómo un hiperdopaminergia striatal se traducía en delirios o cómo la hipofrontalidad frontal en un afecto aplanado. En resumen, esta hipótesis no describe la etiología de estas anormalidades dopaminérgicas, ni los elementos de la transmisión dopaminérgica que podrían estar asociado con el funcionamiento anormal en la esquizofrenia.

Versión III

Las hipótesis más recientes sobre la dopamina y esquizofrenia se basa en datos publicados desde el año de 1991 hasta la fecha. Sin embargo, Howes y Kapur (2009) se enfocan a describir las tres principales evidencias que aportan nuevos datos en relación al papel de la dopamina en la esquizofrenia.

a) Función de dopamina presináptica y sináptica.

No podemos medir directamente los niveles de dopamina cerebral en humanos sin embargo, se han desarrollado técnicas que proporcionan índices indirectos de las síntesis, liberación y los niveles de dopamina sináptica. La función dopaminérgica

striatal a nivel presináptico puede ser medida utilizando L-dopa marcada con fluoro (^{18}F -dopa) y mediante tomografía por emisión de positrones o PET, la cual es convertida a dopamina y atrapado en las terminales nerviosas dopaminérgicas, lista para ser liberada. Este método proporciona información sobre la distribución de la dopamina en cerebro humano, de tal manera que se reportó datos sobre la síntesis y almacenamiento de dopamina en las neuronas dopaminérgicas de pacientes con esquizofrenia. Siete de 9 estudios en los que se utilizó esta metodología, reportaron una síntesis elevada de dopamina presináptica en terminales nerviosas del área striatal. Interesantemente, todos los estudios con PET reportaron una elevada disponibilidad de dopamina presináptica striatal en pacientes con un episodio psicótico agudo (Howes y Kapur, 2009).

El siguiente paso en la transmisión dopaminérgica, es la liberación de dopamina. La liberación de dopamina a nivel striatal puede ser medida a través de un reto farmacológico que libere dopamina de la neurona y es medida utilizando las técnicas de PET y SPECT (Tomografía computarizada por emisión de fotones sencillos). La dopamina liberada compite con el radioligando, llevando a una reducción de la unión del radiotrazador, dando una medición indirecta de la dopamina liberada. Todos los estudios reportan un desplazamiento del radiotrazador, en relación 2:1, en pacientes esquizofrénicos comparado con controles; una elevación que es congruente con los resultados mencionados anteriormente (Howes y Kapur, 2009).

Finalmente, si la síntesis de dopamina se encuentra incrementada y es más sensible a ser liberada frente a un reto farmacológico, uno podría esperar niveles

elevados de dopamina sináptica endógena cuando los pacientes se encuentran en estado psicótico. Las evidencias que apoyan este dato, provienen de estudios con SPECT en los que se reporta que la ocupación basal de receptores D2 por la dopamina se encuentra aumentado en pacientes con esquizofrenia.

Los resultados obtenidos mediante el uso de estas dos metodologías, apoyan la evidencia de una anomalía dopaminérgica cerebral en la esquizofrenia.

b) Receptores dopaminérgicos.

Los estudios de PET y SPECT han utilizado diversos radiotrazadores en la medición de los receptores D2/D3 en esquizofrenia. Davis et al (1991) notó que los resultados iniciales eran inconsistentes, algunos reportaban niveles elevados de unión a receptores D2/D3 en esquizofrenia y otros no encontraban diferencias con respecto a los controles. Actualmente, se han reportado no menos de 19 estudios sobre los receptores D2/D3 en pacientes con esquizofrenia y 3 meta-análisis. Los meta-análisis han concluido la existencia de un incremento modesto (10-20%) en la densidad de los receptores D2/D3 en esquizofrenia, que es independiente de los efectos producidos por los fármacos antipsicóticos. Este parece ser específico para la región estriatal, ya que no ha sido observado en otras regiones cerebrales, como el tálamo y el cíngulo anterior. Sin embargo, estos resultados no nos permiten concluir si existe un desbalance entre los dos tipos de receptores, ya que los radiotrazadores utilizados se unen a los dos subtipos de receptores (Seeman et al., 2006).

La transmisión dopaminérgica está principalmente mediada por receptores de la familia D1 en la corteza prefrontal, y se ha propuesto que el daño cognitivo y los síntomas negativos en la esquizofrenia podrían estar relacionados con una disfunción de dicho receptor (Goldman-Takic et al 2004, Tamminga, 2006). En tres estudios han investigado los niveles del receptor D1 en pacientes con esquizofrenia sin tratamiento farmacológico reportando asociación con el deterioro cognitivo y los síntomas negativos (Okubo et al., 1997; Karlsson et al., 2002; Abi-Dargham et al., 2002).

Los hallazgos obtenidos en los estudios de imagen muestran que la función dopaminérgica striatal a nivel presináptico se encuentra elevada en pacientes con esquizofrenia, correlacionando con los síntomas de psicosis; por otro lado, el bloqueo de esta transmisión (por un decremento de la dopamina) lleva a un alivio de dichos síntomas para la mayoría de los pacientes (Breier et al., 1997). Resulta interesante mencionar que esta elevación dopaminérgica a nivel striatal no ha sido reportada en manía, depresión y otros trastornos psiquiátricos que no presenten psicosis.

c) Tratamiento farmacológico y receptores dopaminérgicos

En el estudio del tratamiento de la esquizofrenia, se han reportado alrededor de 120 estudios de imagen investigando el efecto *in vivo* de los antipsicóticos en los receptores dopaminérgicos (Frankle y Laurelle, 2002). Los estudios muestran, que todos los medicamentos antipsicóticos, a dosis clínicas apropiadas, bloquean a los receptores D2 striatal. Para una adecuada eficacia terapéutica, se requiere de un determinado umbral de bloqueo de receptores D2 en la región striatal; sin

embargo, esto no es suficiente, algunos pacientes no presentan mejoría a pesar de que presentan un alta ocupación de los receptores D2 (Kapur et al., 2000). A pesar de esto, la hipótesis original, relacionada con el bloqueo de los receptores D2, permanece vigente y necesaria, a partir de que, actualmente es la única terapia farmacológica para el tratamiento antipsicótico, y los estudios de imagen han fortalecido los aspectos cuantitativos y temporales de esta relación (Howes y Kapur, 2009).

Howes y Kapur (2009) proponen en esta tercera versión tres aspectos: i) que el resultado final de la interacción de múltiples eventos generan una disfunción dopaminérgica que converge en el desarrollo de los síntomas psicóticos en la esquizofrenia; ii) que dicha disfunción dopaminérgica se origina a nivel de los receptores D2, provocando finalmente un descontrol a nivel presináptico y iii) que dicha disfunción dopaminérgica se encuentra asociada con la psicosis, en lugar de con la esquizofrenia.

En resumen, la hipótesis propone que múltiples factores de riesgo genéticos y ambientales interaccionan entre sí y convergen en una vía final común que provoca una disfunción hiperdopaminérgica striatal a nivel presináptico, provocando que la función cerebral sea afectada y generando el desarrollo de los síntomas negativos y cognitivos. De tal manera, que la esquizofrenia es generada por una disfunción dopaminérgica en el contexto de un cerebro comprometido (Howes y Kapur et al., 2009).

1.4 Genética de la esquizofrenia.

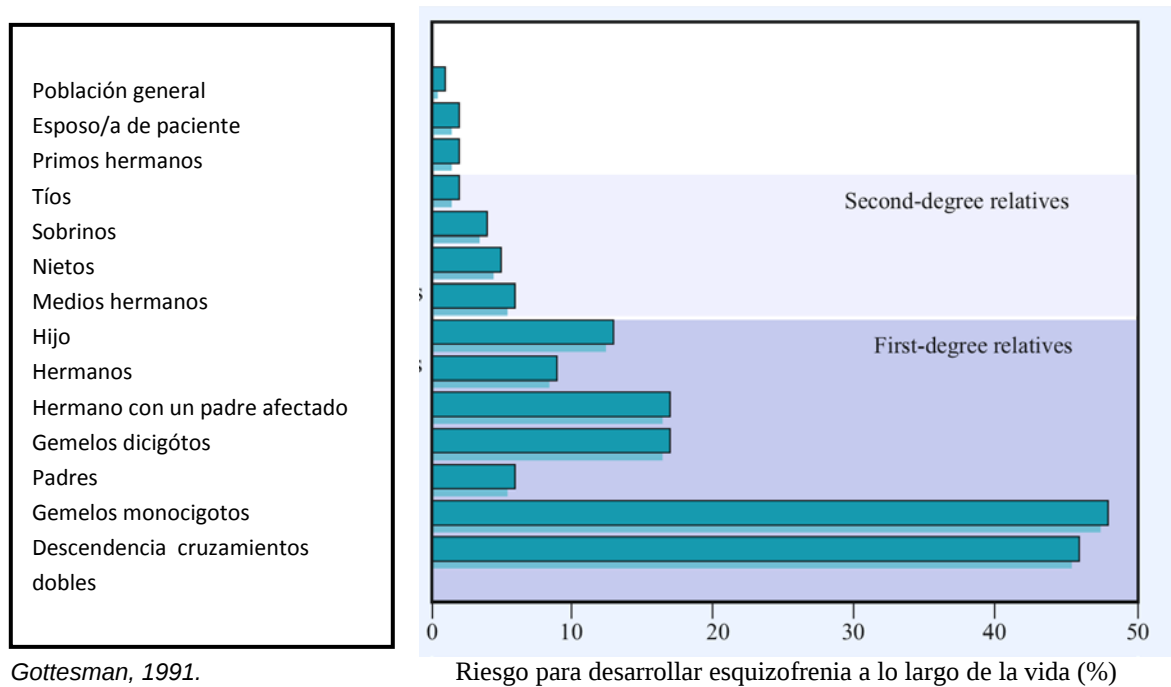
1.4.1 Estudios de familias.

Durante muchos años se ha descrito la naturaleza familiar de las enfermedades mentales, reportando de manera frecuente que el riesgo de desarrollarlo se encuentra incrementado si otro miembro de la familia también padece la misma condición (Duncan, 2004).

Los estudios de familias estiman la prevalencia de un trastorno entre los familiares de sujetos afectados con el trastorno. Esta prevalencia es comparada con la observada en población general o en grupos control; si la prevalencia es mayor a las tasas reportadas en la población general, se concluye que la enfermedad es familiar (Nicolini, 1999).

Se ha reportado que el riesgo más importante para desarrollar esquizofrenia, es tener un familiar afectado. En la figura 2, se muestra los riesgos a lo largo de la vida en relación al parentesco familiar con el probando afectado con esquizofrenia (Gottesman, 1991).

Figura 1. Riesgo para desarrollar esquizofrenia en familiares de pacientes con esquizofrenia.



Como resultado de este tipo de estudios se introdujo el término de espectro, el cual define a toda una gama de padecimientos que parecen heredarse concomitantemente con la esquizofrenia, sugiriendo que podrían ser consideradas como diferentes variaciones genéticas de la expresión clínica de la enfermedad. Dentro de este espectro se encuentra: la personalidad esquizotípica, paranoide y esquizoide, trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, trastorno esquizoafectivo y psicosis atípicas. (Kendler et al., 1996).

Otro dato interesante es el obtenido a partir de los estudios familiares, en los que se ha reportado que el riesgo para desarrollar una enfermedad psicótica en familiares de pacientes mujeres con esquizofrenia es significativamente mayor que para familiares de pacientes hombres (Reed et al., 1973; Macciardi et al., 1987; Penrose et al., 1991). Además, el análisis en pares de hermanos afectados con esquizofrenia muestran una alta concordancia por género, comparado con los discordantes (DeLisi et al., 1987).

1.4.2 Estudios de gemelos.

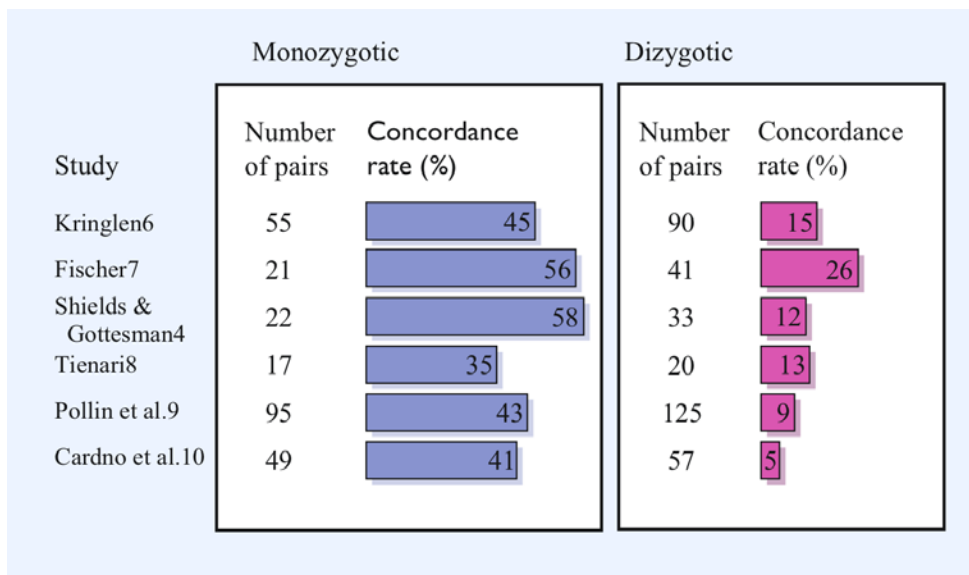
El estudio de gemelos emplea el fenómeno natural de los sujetos nacidos de partos gemelares. Los gemelos pueden ser de dos tipos: monocigotos y dicigotos dependiendo de cuánta información genética comparten entre sí. Los gemelos monocigotos, también llamados idénticos, comparten el 100% de sus genes. Los gemelos dicigotos o fraternos, comparten 50% de su información genética, es decir, el mismo porcentaje que comparten dos hermanos entre sí (Plomin et al., 1997). El grado de similitud fenotípica entre gemelos se denomina concordancia y se calcula al comparar el número de gemelos monocigotos en los cuales ambos miembros están afectados, con el número de pares de gemelos dicigóticos concordantes para el rasgo de interés. Cuando la concordancia de los gemelos monocigotos es significativamente más alta que la concordancia de los gemelos dicigóticos, nos indica la posibilidad de que factores genéticos estén involucrados en el desarrollo del trastorno que se encuentra bajo estudio (Nicolini, 1999).

Se ha reportado tasas de concordancia de hasta el 58% en gemelos monocigóticos y del 12% para dicigóticos (Shields y Gottesman, 1973). De esta manera, las tasas de concordancia menores al 100% demuestran la presencia de factores ambientales involucrados en el desarrollo del trastorno.

En la esquizofrenia se ha reportado una heredabilidad entre el 80 y 86% (Cannon T et al., 1998; Cardno et al., 1999; Farmer et al., 1987; Onstad et al., 1991).

Los estudios de gemelos han reportado una alta concordancia en pares del mismo sexo que de diferente sexo, además de que los gemelos mujeres tienen una mayor concordancia que los hombres (Kringlen et al., 1968).

Figura 2. Tasas de concordancia para esquizofrenia en estudios de gemelos.



Adaptado de Stefan, 2002.

1.4.3 Estudios de adopción.

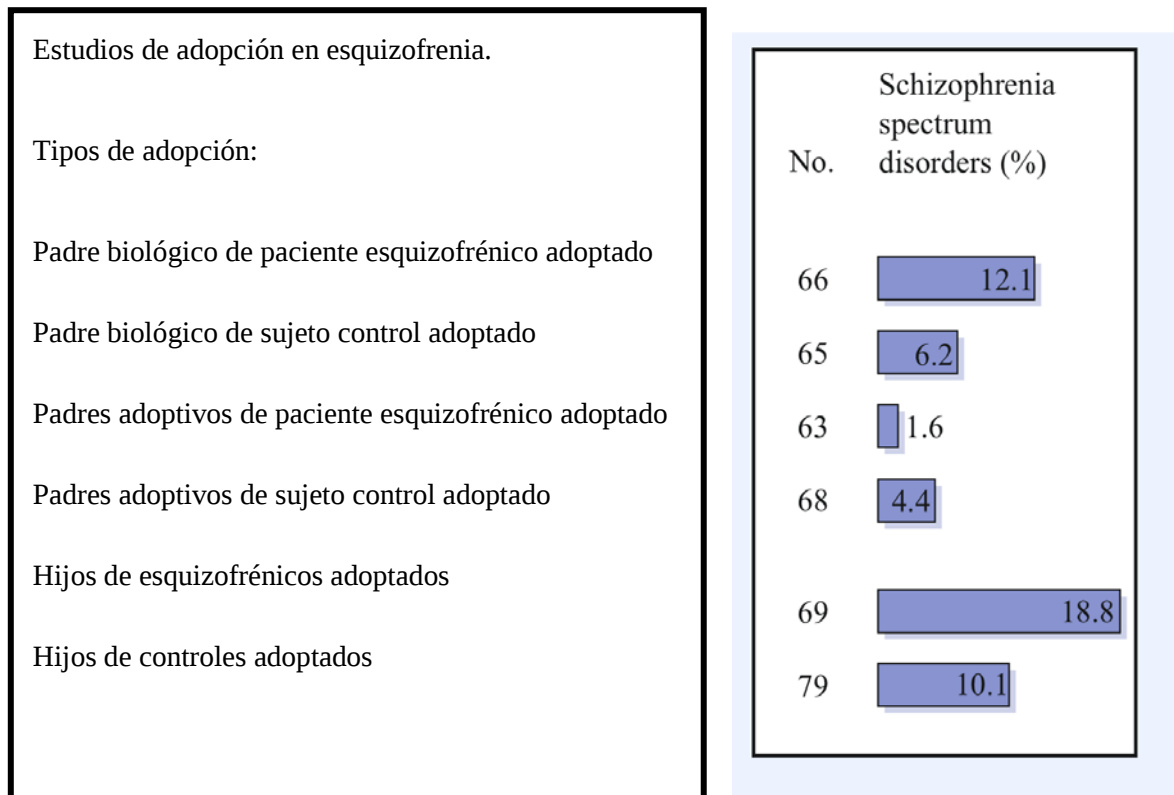
Este tipo de estudios también aportan información sobre la participación de factores genéticos y ambientales en un trastorno. El método consiste en establecer las concordancias diagnósticas entre los probandos adoptados y sus padres, tanto biológicos como adoptivos (McGuffin, 1994).

Existen tres tipos de diseño:

- I. El estudio de adopción: se estudia al probando adoptado con padres biológicos afectados y se compara con controles adoptados de padres biológicos sanos.
- II. El estudio de adopción familiar: personas adoptadas que desarrollan una enfermedad y se comparan con la tasa del trastorno en los parientes biológicos y adoptivos.
- III. Adopción cruzada: se compara la tasa de la patología en personas adoptadas que tienen padres biológicos afectados pero que fueron criados por padres adoptivos sanos con respecto a sujetos adoptados de padres biológicos sanos y que fueron criados por padres adoptivos que posteriormente desarrollaron la patología.

Los estudios realizados hasta la fecha señalan que la frecuencia con que aparece la esquizofrenia es mayor en los familiares biológicos que en los grupos control (Kety et al., 1968, 1994). En la figura 3 se muestran los diferentes estudios de adopción en esquizofrenia reportados hasta la fecha. Los estudios demuestran que el riesgo en la susceptibilidad para desarrollar esquizofrenia es mayor en hijos de padres biológicos que en padres adoptivos, lo que indica que factores genéticos se encuentran involucrados en la heredabilidad de este trastorno.

Figura 3. Estudios de adopción en esquizofrenia.



Adaptado de Stefan, 2002.

1.4.4 Estudios de segregación.

Una vez que se establece la existencia de agregación familiar en un trastorno, el siguiente paso es determinar si el patrón de agregación puede ser explicado por un modelo simple de herencia, mediante el análisis de segregación.

Éste se caracteriza por ser un método estadístico que analiza la frecuencia y distribución de individuos afectados y no afectados en familias, con el propósito de determinar el modo de herencia. Los resultados obtenidos a partir de esta metodología pueden ser tomados como una evidencia indirecta de que los genes en estudio pudieran estar involucrados en la etiología de un trastorno.

Con este tipo de estudios, se han sugerido tres modelos en la esquizofrenia: dominante, recesivo y multifactorial (Matthysse et al., 1986; Moldin et al., 1997; McGue et al., 1983). Sin embargo, el modelo que más se ha aceptado es el multifactorial (la acción de múltiples loci) con epistasis (interacción entre genes) (Risch, 1990).

1.4.5 Estudios de ligamiento

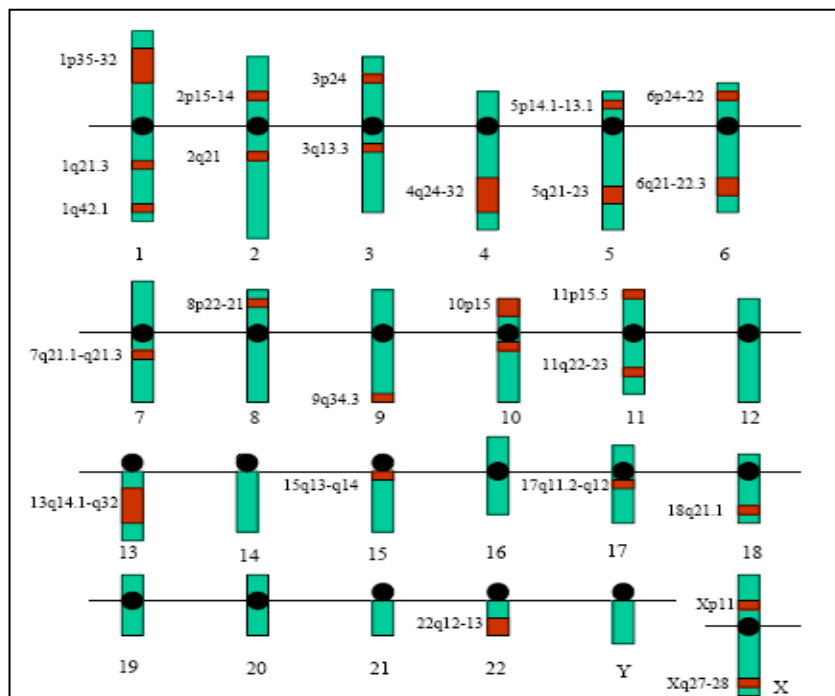
Esta metodología tiene por objeto establecer la probabilidad de que dos alelos (el alelo de la patología y el alelo marcador) segreguen juntos en las familias, basado en que sus loci se encuentren cercanos. Cuando se detecta un ligamiento entre un marcador genético y la enfermedad, se infiere que se ha encontrado un gen etiológicamente responsable de la enfermedad.

Se han reportado diversas regiones en las que sugieren la presencia de genes candidatos para el desarrollo de la esquizofrenia. Las regiones que han mostrado presencia de ligamiento se muestran en la figura 1. Entre las regiones que repetidamente ha presentado ligamiento genético son: 5q (Sherrington et al., 1988; Park et al., 2004; Paunio et al., 2001; Maziade et al., 2001; Kendler et al., 2000), 6p (Straub et al., 2002; Lin et al., 2009; Matthysse et al., 2004; Kendler et al., 2000), 8p (Kendler et al., 1996; Suárez et al., 2006; Ng et al., 2009; Fallin et al.,

2011; Kendler et al., 2000), 11q (Maziade et al., 1995; Maziade et al., 2001), 22q (Lewis et al., 2003; DeLisi et al., 2002) y Xp11 (DeLisi et al., 1994; Dann et al., 1997; Paunio et al., 2001).

Los datos publicados por Dann et al. (1997) y que replican los hallazgos publicados por DeLisi et al. (1994) en los que se muestra presencia de ligamiento en la región Xp11 en familias con múltiples afectados resultan interesantes debido a que en esta región se encuentran localizados los genes de la monoamino oxidasa (MAO). Esta enzima se ha postulado como un marcador biológico de la esquizofrenia, debido a que se reportaron niveles bajos de la actividad de MAO plaquetaria en gemelos monocigotos (DeLisi et al., 1982).

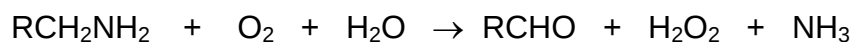
Figura 4. Estudios de ligamiento genético en esquizofrenia.



Adaptada de Prasad et al., 2002.

1.5 La enzima monoamino oxidasa (MAO).

La monoamino oxidasa (EC 1.4.3.4) es una enzima que se encuentra localizada en la membrana exterior mitocondrial y se encuentra en la mayoría de los tejidos del cuerpo (Tabla 1). Tiene la función de degradar una gran variedad de aminas biogénicas, incluyendo a los neurotransmisores: norepinefrina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5-HT). La desaminación de monoaminas por MAO puede ser descrita como sigue:



El aldehído formado es finalmente metabolizado al correspondiente alcohol y ácido mediante aldehído reductasas y deshidrogenasas (Fowler et al., 1982).

La MAO esta compuesta de dos subunidades, cada una de las cuales enlaza al flavin adenin dinucleótido (FAD) como cofactor. Se han identificado dos formas de la enzima, la MAO-A y la MAO-B, en base a la afinidad por ciertos sustratos y su sensibilidad a determinados inhibidores (Johnston, 1968).

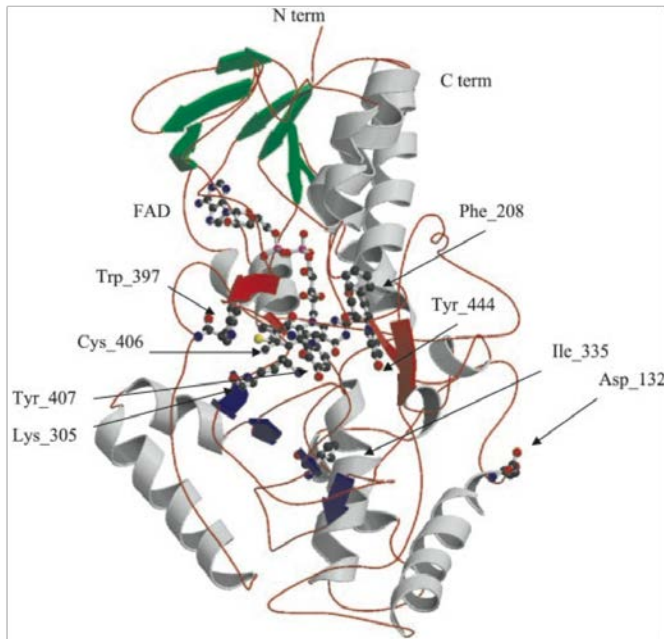
Johnston (1968) definió a las dos isoenzimas a partir de la observación de que una forma (A) pero no la otra (B) era sensible al inhibidor irreversible clorgilina. Estudios adicionales demostraron que la MAO-B es más sensible que la MAO-A a la pargilina y al deprenil. Además, la MAO-A preferencialmente oxida 5-HT y NE; mientras que la MAO-B feniletilamina (PEA) y benzilamina (Fowler et al., 1982). Aunque en humanos la DA es oxidada por la MAO-B (Glover et al., 1977) y en roedores por la MAO-A (Johnston 1968; Neff and Yang 1974), en la mayoría de las

especies la DA puede ser oxidada por ambas formas de la enzima (O'Carroll et al., 1983). Sin embargo, existen numerosas excepciones a estas reglas porque la especificidad de MAO por estos sustratos depende de la concentración, afinidad y la tasa de recambio del sustrato, así como de la concentración de la enzima (Tipton et al, 1987). Por ejemplo, 10 mM de PEA es oxidada por MAO-B, pero 1 mM de PEA es un sustrato común para ambas formas de la enzima en roedores, humano y bovino (Suzuki et al, 1981). Además, aunque la 5-HT es considerada como el sustrato preferencial para la MAO-A en rata y bovino, también puede ser oxidada por la MAO-B.

Tabla 1. Características de la monoamino oxidasa.

EC 1.	Oxidoreductasa
EC 1.4	Actúa sobre el grupo donador CH-NH ₂
EC 1.4.3.	Con oxígeno como aceptor
EC 1.4.3.4.	Amino oxidasa (conteniendo flavina)
Reacción:	$RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow RCHO + H_2O_2 + NH_3$
Otros nombres:	Monoamino oxidasa, tiramina oxidasa, tiraminasa, amino oxidasa, adrenalin oxidasa.
Cofactor:	FAD (flavin adenin dinucleótido).
Característica:	Actúa sobre aminas primarias y usualmente tambien sobre aminas secundarias y terciarias.

Figura 5. Esquema tridimensional de la enzima MAO



Tomado de Geha et al., 2001.

1.5.1 Localización de la MAO.

La distribución de la MAO-A y B varía entre especies y estirpes celulares. La MAO-A periférica se expresa principalmente en placenta humana y la MAO-B en plaquetas y linfocitos. En el cerebro humano la forma predominante es la MAO-B, la cual se expresa en astrocitos, glia radial y neuronas serotoninérgicas, mientras que la MAO-A se expresa predominantemente en las neuronas catecolaminérgicas (Garrick et al., 1982).

La presencia de MAO en la mayoría de los tejidos parece reflejar una necesidad funcional. Sin embargo, en algunas regiones del cerebro, tanto la enzima como su

sustrato no se encuentran en la misma neurona. Por ejemplo, el sustrato preferencial para la MAO-A es la 5-HT pero esta no se encuentra en las neuronas serotoninérgicas, y para el caso de la MAO-B, es la PEA pero se encuentra presente en las neuronas serotoninérgicas y las células gliales. El papel de MAO en estas regiones quizá sea el de proteger a las neuronas de la oxidación de aminas extrañas que pudieran actuar como falsos neurotransmisores (Saura et al., 1996).

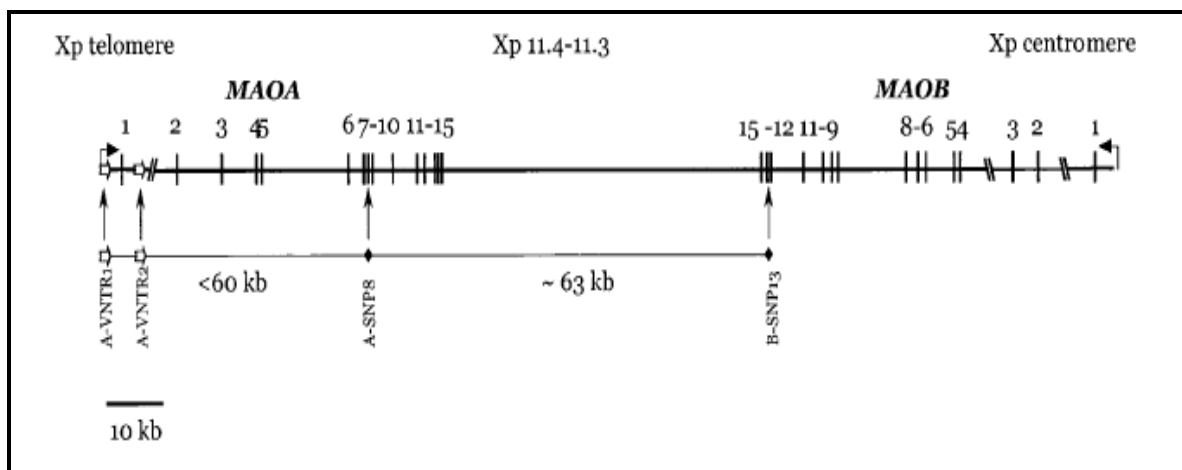
En humanos y roedores, la MAO-A se presenta antes que la MAO-B en la mayoría de los tejidos. Al nacimiento, la MAO-A alcanza casi los mismos niveles enzimáticos observados en la edad adulta, mientras que la actividad de la MAO-B se incrementa con la edad (Saura et al., 1994). Se piensa que debido a que la MAO-B se encuentra localizada predominantemente en las células gliales, el incremento es debido a la proliferación de estas células a lo largo de la vida (Saura et al., 1994).

1.6 Genes de la MAOA y MAOB.

En el año de 1986, se localizó a los genes de la MAOA y MAOB en el cromosoma X, utilizando anticuerpos monoclonales (Korchesperger et al., 1986), y años después mediante el uso de sondas de DNAc de MAOA y MAOB, se demostró nuevamente su localización en dicho cromosoma, en la región DXS7 (Lan et al., 1989). Estudios de hibridización in situ permitió la localización del gen MAOA en la región Xp11.23 y Xp21, y para el gen MAOB en Xp11.23, Xp21.2 y

Xp22.1 (Lan et al., 1989). En el año de 1988, se obtuvo la secuencia completa de los dos RNAm que codifican para la MAOA y MAOB humana de hígado (Bach et al., 1988). Los genes muestran una homología del 70% y están constituidos por 15 exones, presentando una organización idéntica entre exón-intrón, lo cual sugiere que las dos isoenzimas provienen de un evento de duplicación; es decir, de un gen común ancestral (Figura 6) (Shih et al., 1999). De manera interesante, el exón 12 de las dos enzimas, comparten un 93.9% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Grimsby et al., 1991).

Figura 6. Esquema de la localización y constitución de los genes MAOA y MAOB



Adaptado de Balciuniene et al., 2002.

Por otro lado, se ha observado una alta homología en la secuencia de aminoácidos entre diversas especies de mamíferos, el alto grado de conservación

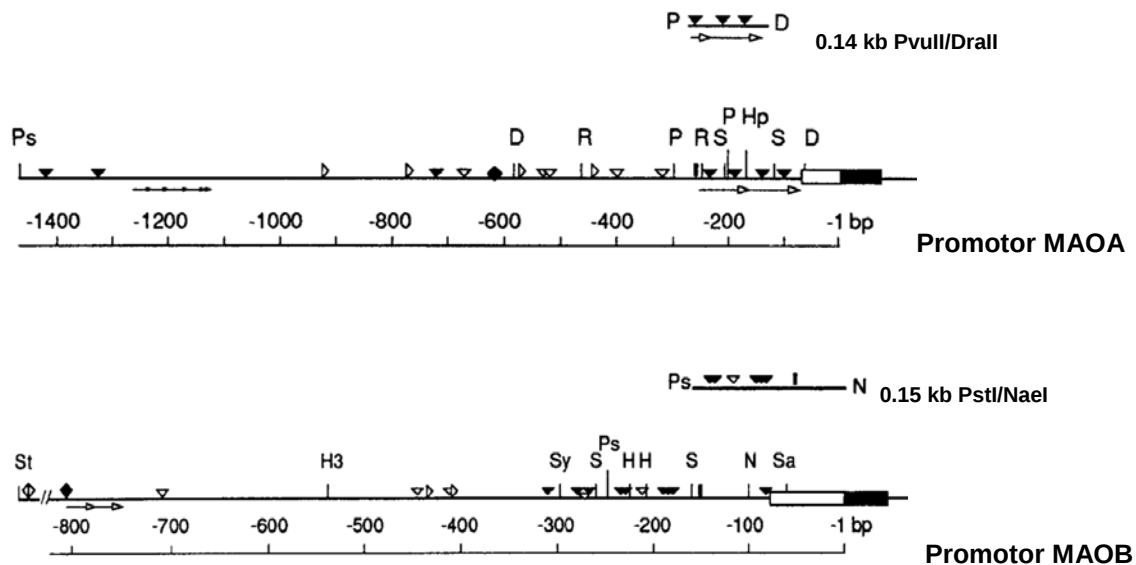
quizá refleja la presión evolutiva para mantener la función fisiológica específica de cada MAO. (Shih et al., 1999).

1.6.1 Organización de la región promotora de los genes de la MAOA y MAOB.

Con el propósito de identificar las secuencias de DNA involucradas en la actividad promotora de MAOA y MAOB, se utilizó una serie de secuencias flanqueadoras 5' insertadas a un vector de expresión (pOGH) conteniendo como gen reportero a la hormona del crecimiento humano. Las construcciones obtenidas, fueron transfectadas a células. Cuando estas construcciones fueron transfectadas a líneas celulares NIH3T3, SHSY-5Y y COS7, la actividad máxima del promotor de MAOA fue encontrada en el fragmento 0.14 kb PvuII/Drall y en el fragmento 0.15 kb PstI/NaeI para MAOB (Figura 8). Ambos fragmentos son ricos en GC, contienen sitios potenciales de unión Sp1, comparten en su secuencia aproximadamente un 60% de identidad y están localizados en una región similar con respecto a los sitios de iniciación del DNAC (3 pb río abajo y 21 pb río arriba del sitio de iniciación del DNAC para MAOA y MAOB, respectivamente) (Zhu et al., 1992). Los anteriores hallazgos han llevado a proponer, que los dos promotores quizá derivan de un mismo gen ancestral, como resultado de un proceso de duplicación del gen (Grimsby et al., 1991). Sin embargo, la secuencia de unión a los factores de transcripción no esta conservada en los dos promotores (Zhu et al., 1992).

Con respecto al promotor de *MAOA*, se observó que la actividad reside en las dos regiones de repetidos de 90 pb, los cuales pueden iniciar la transcripción, en ausencia de la caja TATA.

Figura 7. Mapa de la región promotora *MAOA* y *MAOB*.



D=Drall, Hp=Hinfl, Ps=PstI, P=PvuII, R=RsaI, S=SmaI; ▽ negro, sitios unión Sp1; ▽ blanco, elemento CACCC
Tomado de Zhu et al, 1992.

En la región promotora de *MAOB* existen dos agrupamientos de sitios Sp1 sobrepuestos y separados por un elemento CACCC (Figura 5), el cual ha demostrado ser un elemento represor (Ou et al, 2004). Se ha reportado que la actividad basal se incrementa hasta ocho veces cuando el elemento CACCC es mutado (Shih et al., 2011). Por otro lado, se ha descrito que el gen *TIEG2* (*Transforming growth factor- β -inducible early gene 2*) influye en la regulación de la *MAOB* (Figura 8), ejerciendo una función dual a nivel de la región promotora. El

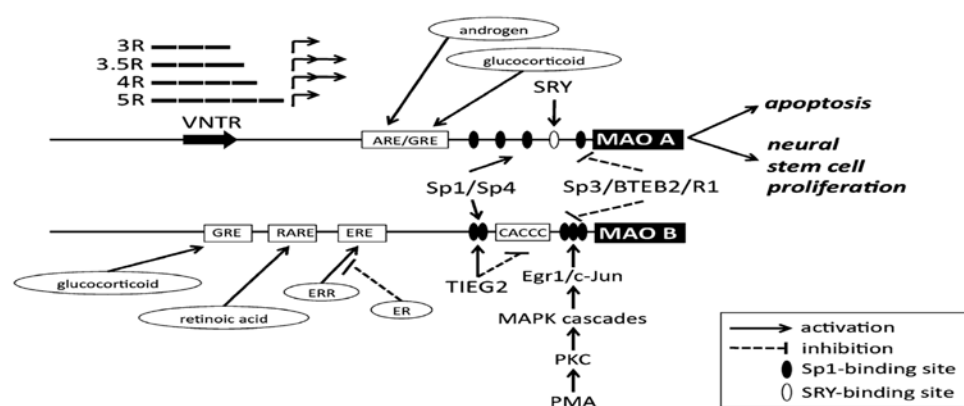
gen TIEG2 actúa como un represor a nivel del elemento CACCC y como un activador en la regiones distales Sp1 del promotor de MAOB, *in vivo* y también *in vitro*. Debido a que el TIEG2 presenta una mayor afinidad por los sitios Sp1 que por el elemento CACCC, por lo que TIEG2 ejerce un efecto de activación total sobre la actividad promotora de MAOB y a nivel de RNAm (Ou et al., 2004).

Con respecto al gen MAOA, fueron identificados dos nuevos factores de transcripción (Figura 8), uno de los cuales fue nombrado R1 (RAM2/CDCA7L/JPO2) (Chen et al., 2005), y el otro aún se encuentra en investigación (Shih et al., 2011). R1 actúa como un represor transcripcional de MAOA y represor de la actividad promotora de MAOA, compitiendo con los elementos Sp1 en la unión a los sitios Sp1, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Además, se ha visto que la sobre-expresión de R1 en líneas celulares neurales estables, provoca una regulación a la baja de la actividad enzimática de MAOA, demostrando así, su papel fisiológico (Chen et al., 2005). Debido a que R1 presenta diversas funciones en varios eventos celulares, tales como en la proliferación celular, resulta importante su estudio para entender su papel en los mecanismos de regulación transcripcional de MAOA. Los efectos de R1 en el gen de la MAOB se encuentran aún en estudio (Shih et al., 2011).

El hecho de que los genes de la MAO se encuentran localizados en el cromosoma X, ha llevado a proponer la existencia de factores de transcripción género-específicos que regulen la expresión de MAO, lo cual podría proporcionar las bases para especular los dimorfismos sexuales tan frecuentemente observados en los trastorno neuropsiquiátricos, asociados con una función anormal de MAO, como en el trastorno depresivo mayor y en esquizofrenia (Shih

et al., 2011). Interesantemente, fue identificado MAOA como un nuevo blanco neural para el gen SRY, el cual codifica para un factor de transcripcional esencial en la diferenciación sexual durante la embriogénesis (Wilhelm et al., 2007). SRY activa, tanto al promotor MAOA como a la actividad enzimática a través de sitios de unión SRY. Además, Sp1 incrementa la activación de SRY del promotor MAO de forma dosis-dependiente (Wu et al., 2009). Además, Sp1 interacciona y forma un complejo regulador transcripcional con SRY en la región promotora de MAOA, potencializando la unión de SRY por el promotor de MAOA (Wu et al., 2009). Este es el primer estudio que reporta que un factor de transcripción SRY que codificado en el cromosoma Y, es capaz de regular un gen localizado en el cromosoma X, sugiriendo un nuevo mecanismo molecular para el dimorfismo sexual en el desarrollo neural, funciones cerebrales y la posible iniciación/progresión de trastornos psiquiátricos asociado con una disfunción de MAO y que han demostrado un dimorfismo sexual.

Figura 8. Esquema de los factores de transcripción de MAOA y MAOB



Tomado de Shih et al., 2011.

Existe evidencia que demuestra que algunas hormonas esteroides y no esteroides tienen un efecto sobre la regulación de los genes de MAOA y MAOB. Su estudio surge a partir de la evidencia que muestra que los dos tipos de hormonas se encuentran involucradas en la regulación de diversos procesos neuropsiquiátricos, en los cuales la MAO juega un papel crítico; como en la respuesta al estrés, la adaptación conductual y de afecto. Se ha demostrado que los andrógenos, glucocorticoides (Ou et al., 2006) y el ácido retinoico (Wu et al., 2009) activan la expresión genética de MAOA y MAOB en diferentes células neuronales humanas; mientras que, los estrógenos muestran un efecto tejido-específico sobre los genes de la MAOA y MAOB. Debido a que las hormonas juegan un papel importante tanto en estados fisiológicos como patológicos, resulta importante identificar estas nuevas funciones de la MAO en los procesos que involucran a diferentes hormonas.

Los andrógenos y glucocorticoides tienen la capacidad de incrementar la transcripción de MAOA a través de la unión de sus receptores al elemento de respuesta funcional en la región promotora de MAOA. Por otro lado, los receptores a andrógenos y glucocorticoides interaccionan con los sitios Sp1, interacción que es incrementada en respuesta a ligandos (Shih et al., 2011). Del mismo modo, el ácido retinoico activa la transcripción de MAOB a través de la interacción ligando-receptor y por medio de la unión del receptor al factor de transcripción Sp1. Con respecto a los estrógenos, se ha observado que regulan la MAOB a través de los receptores estrogénicos (ER) y los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Figura 7) (Zhang et al., 2006).

MAOA y MAOB son regulados de distintas maneras, lo cual contribuye en las diferencias en su expresión temporal y espacial y a sus funciones fisiológicas. Del mismo modo, la identificación de nuevos factores de transcripción podrían proporcionar información sobre nuevas funciones de los genes de la MAO, así como también encontrar las bases moleculares de los trastornos neuropsiquiátricos en los cuales se ha sugerido una disfunción de MAO. Es posible que la modulación de los niveles endógenos de dichos factores podrían ser considerados como un abordaje alternativo para mantener la actividad normal de MAO, además del uso de los inhibidores de la MAO (Shih et al., 2011).

1.6.2 Ratones knock-out (KO) del gen MAOA.

La utilización de estrategias de KO ha permitido obtener importante información sobre la función de la enzima MAO *in vivo*. Particularmente, se ha generado una línea de ratones transgénicos en la que se interrumpió el exón 2 y 3 del gen que codifica para MAOA (Cases et al, 1995). Esta secuencia codifica la región de la proteína a la cual se une el cofactor FAD, necesario para la actividad de la enzima. En el cerebro de las crías KO de MAOA, se observó nueve veces mayor concentración de 5-HT al observado en los ratones silvestres (*wild-type*), mientras que en cerebro de ratones adultos KO, los niveles de 5-HT solo se encuentran incrementados al doble, sugiriendo que posiblemente es debido a la presencia de MAOB, la cual suple la función metabólica de la isoforma A (Cases et al, 1995).

En conclusión, el estudio demostró que las crías deficientes de MAO-A muestran un metabolismo de la serotonina dramáticamente alterado y cambios conductuales severos. En particular, los adultos machos manifestaron una conducta agresiva.

1.6.3 Requisitos estructurales de MAOA y MAOB esenciales para su actividad catalítica.

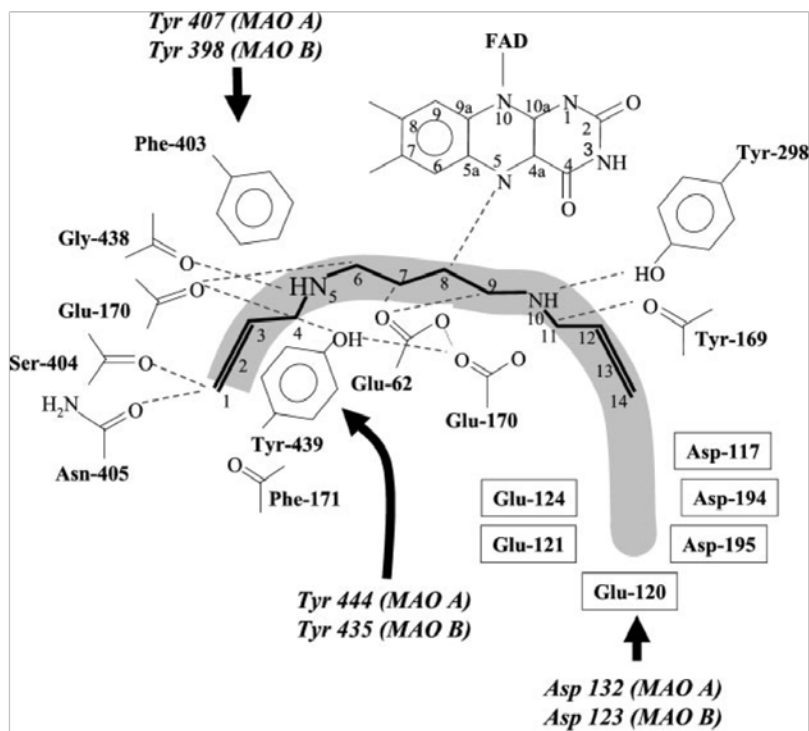
La estructura de MAO ha sido posible modelar mediante la utilización de estrategias tales como mutagénesis dirigida y métodos de cristalografía de rayos X. Geha et al (2002) utilizó el modelo descrito para la enzima poliamino oxidasa (PAO) como guía para obtener un modelo de la estructura tridimensional de la MAO, lo a partir de que las dos enzimas presentan un 20% de similitud y cataliza las mismas reacciones de oxidación, estas características sugieren que MAO y PAO tienen sitios similares de unión al cofactor FAD y a sustratos.

Mediante el alineamiento de múltiples secuencias, la predicción de estructuras secundarias, el asignamiento coordinado de regiones del templado (PAO) al blanco (MAOA y MAOB), modelamiento de hélices, minimización de energía y evaluación teórica de la geometría; fue posible tener la estructura de las dos isoformas. Mediante dichas estrategias fue posible identificar cuatro aminoácidos clave, Lys-305, Trp-397, Tyr-407 y Tyr-444 en MAOB; y Lys-296, Trp-388, Tyr-398, Tyr-435, en MAOA (Figura 9). Además, con base en la estructura tridimensional de PAO, se sugirió que Lys-355, Trp-397 y Tyr-407 en MAOA; y Lys-296, Trp-388 y Tyr-398 en MAOB quizá estén involucradas en la unión no

covalente a FAD (Figura 9). Tyr-407 y Tyr-444 en MAOA (Tyr-398 y Tyr-435 en MAOB) parecen formar un sándwich aromático que estabiliza la unión al sustrato. La Asp-132 en MAOA (Asp-123 en MAOB), no tiene ningún efecto sobre la actividad catalítica de las dos enzimas.

El conocimiento de la estructura tridimensional y la arquitectura de los sitios activos de las enzimas MAO, permitirá el diseño de nuevos, potentes y selectivos inhibidores de la MAOA como antidepresivos y de MAOB para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Geha et al., 2002).

Figura 9. Sitio de unión de la MAOA y MAOB a sustratos y a FAD.



Tomado de Geha et al., 2002.

Tres años mas tarde, fue reportado otro trabajo, utilizando también cristalografía de rayos X para el modelamiento de la estructura tridimensional de la MAO (De Colibus et al., 2005). En este trabajo, la elucidación de la estructura 3D se basó en las similitudes y diferencias entre la MAOA humana, MAOB humana y la MAOA de rata. Se ha demostrado que la MAOB humana y MAOA humana presentan un 72% de identidad en su secuencia con MAOA humana; y que la MAOA de rata y MAOA humana presenta una identidad del 92%, por lo que esta información ha proporcionado varios hallazgos con respecto a la función y diferencias en la estructura de estas tres enzimas con relación a su inhibición por ciertas sustancias. Lo anterior resulta de una gran importancia en el caso de que estructuras obtenidos en modelos animales, puedan ser utilizadas para el desarrollo de inhibidores específicos de MAOA con aplicación en humanos (De Colibus et al., 2005). Los hallazgos obtenidos en este trabajo muestran que el plegamiento de la cadena de MAOA humana es similar a la de MAOA de rata y de MAOB humana; sin embargo, la MAOA humana es única con respecto a que cristaliza como un monómero y exhibe en solución una conducta hidrodinámica de acuerdo a su forma de monómero, a diferencia de la MAOB humana y MAOA de rata, que presentan una forma dimérica (De Colibus et al., 2005). Los sitios activos de MAOA humana, consisten de una sencilla cavidad hidrofóbica de 550 Å, la cual es mas pequeña a la estructura reportada para el sitio de unión de clorgilina a MAOB humana (700 Å), pero mas larga que la de MAOA de rata (450 Å). Un importante componente del sitio activo de la estructura de MAOA humana, es la conformación de la hélice de los residuos de 210-216, el cual es diferente al de MAOB humana y MAOA de rata. El origen de esta alteración estructural sugiere

que es debido al amplio rango de interacciones en la forma monomérica de la enzima. Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, además de proporcionar información para el diseño de inhibidores específicos de MAOA, estos datos apoyan la propuesta de que MAOA humana involucra un cambio de la forma dimérica a la monomérica, por una mutación de Glu151 a Lys, la cual es específica de MAOA humana (Andrés et al., 2004). Todos estos hallazgos cuestionan sobre el uso de información obtenida de fuentes no humanas para el diseño de nuevos medicamentos para uso en humanos.

Figura 10. Estructura 3D de la MAOA humana.



En azul se muestra los dominios de unión a FAD; en rojo el dominio de unión a sustratos, en verde, el extremo C-terminal; se representa en esferas amarillas y verdes los sitios de unión de FAD y clorgilina, respectivamente; la línea negra representa la cavidad del sitio activo de la hélice 210-216. Tomada de De Colibus et al., 2005.

1.6.4 Variantes moleculares descritas en MAOA

A partir de la caracterización de la secuencia completa de clonas de DNA complementario de MAOA humano (HM11, A2R/D7), dos grupos independientes, identificaron 22 cambios en el apareamiento de los 43 nucleótidos del extremo 5' no codificante del cDNA de MAOA humano (Shih, 1991). Se sugirió que estas diferencias reflejaban variabilidad en el sitio de iniciación de la transcripción, polimorfismos alélicos o la existencia de múltiples genes MAOA.

Mediante la utilización de la clona de HM11, fué identificado un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). En el estudio se realizó un tamizaje en el loci MAO de cinco individuos no relacionados, utilizando 35 enzimas de restricción, detectando solo una variación polimórfica con la enzima *EcoRV*, la cual esta caracterizada por dos alelos, el A1 (10.2 kb) y A2 (6.5 y 3.7 kb); así como también dos bandas constantes de 5.8 y 5.4 kb (Ozelius et al., 1988). Subsecuentemente, se determinó la frecuencia de los alelos en un grupo de individuos caucásicos no relacionados (19 mujeres y 13 hombres), encontrándose una frecuencia de 65% para el alelo A1 y 35% para el alelo A2. Además, se observó que el 42% de las mujeres eran heterocigotas para este marcador. Al analizar este polimorfismo en tres familias nucleares (27 individuos), se encontró que parecía ser heredado en un modelo Mendeliano ligado al cromosoma X.

Un año mas tarde, Ozelius y cols. (1989) describieron otra región polimórfica mediante el uso de la clona de ADN genómico A2R/D7 y la enzima de restricción

MspI en una muestra de 27 sujetos caucásicos norteamericanos, encontrándose una frecuencia de 0.67 para el alelo 1 (9.4 kb) y de 0.33 para el alelo 2 (3.8 kb).

En 1991, Hotamisligil y Breakefield llevaron a cabo el análisis de la secuencia de líneas celulares de fibroblastos de la piel con baja y alta actividad enzimática. El análisis de la secuencia identificó dos diferencias, el cambio de una T por G en la posición 941 y localizada en el exón 8, y el cambio de una C por T en la posición 1460, situada en el exón 14. Los dos cambios ocurren en la tercera base del codón y no cambia la secuencia del aminoácido; sin embargo, crean dos sitios de restricción para las enzimas *Fnu4HI* (T941G; rs6323) y *EcoRV* (C1460T; rs1137070). El análisis de estos dos polimorfismos en 37 líneas celulares de hombres con diferentes niveles de actividad enzimática de la MAOA identificó que los alelos que no presentan los sitios de restricción para las dos enzimas (alelos T941 y C1460) se encuentran asociados con niveles bajos de la actividad enzimática de MAOA y los alelos que presentan el sitio de corte para las dos enzimas (alelos 941G y 1460T) con una alta actividad enzimática (Hotamisligil y Breakefield, 1991). El análisis de haplotipos conformados por estas dos regiones polimórficas y una previamente descrita, polimorfismo MspI, identificada en la clona A2R/D7 (Ozelius et al., 1988; 1989) reportaron la presencia de tres de los cuatro posibles haplotipos (debido a la presencia de un fuerte desequilibrio de enlace entre las regiones T941C y C1460T), revelando diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de estos haplotipos y niveles bajos o altos de la actividad enzimática medida en fibroblastos de piel humana en cultivo (Hotamisligil, Breakefield, 1991).

En ese mismo año, el análisis de la secuencia de una clona del gen *MAOA*, permitió la identificación de una región de dinucleótidos CA en el gen *MAOA*. Este polimorfismo de dinucleótidos se analizó en 86 cromosomas de sujetos caucásicos no relacionados, identificándose siete diferentes alelos (Black et al., 1991).

Los resultados que demostraron asociación entre variantes moleculares y niveles de la actividad enzimática, sugirió la importancia del uso de estos polimorfismos como marcadores moleculares en el estudio de diversos trastornos psiquiátricos y enfermedades neurológicas. Lo anterior fue sustentado por reportes previos que mostraban diferencias en los niveles de la actividad enzimática en algunas enfermedades.

Un año más tarde, la secuenciación del fragmento clonado de la clona de cDNA de *MAOA* de 2.9 kb, conteniendo la secuencia completa del exón 1, permitió la identificación de un polimorfismo de microsatélites caracterizado por una región de 19 repetidos de dinucleótidos GT y adyacente a una nueva región de duplicados imperfectos de tipo VNTR de 23 pb. La región básica de repetidos tiene una secuencia (GAAGT(GT)₂T₂(AT)₆), la cual se repite 5 veces sin ninguna alteración, seguida por 3 copias de una versión relacionada pero imperfecta de dicha secuencia. Variaciones en el número de repetidos internos GT y AT, incrementa el tamaño de la región, hasta 31 pb (Hinds et al., 1992). El análisis del polimorfismo en 56 mujeres no relacionadas, mostró 15 diferentes alelos, con un tamaño entre 285 y 388 pb. Además, se observó que los alelos difirieron en el número de

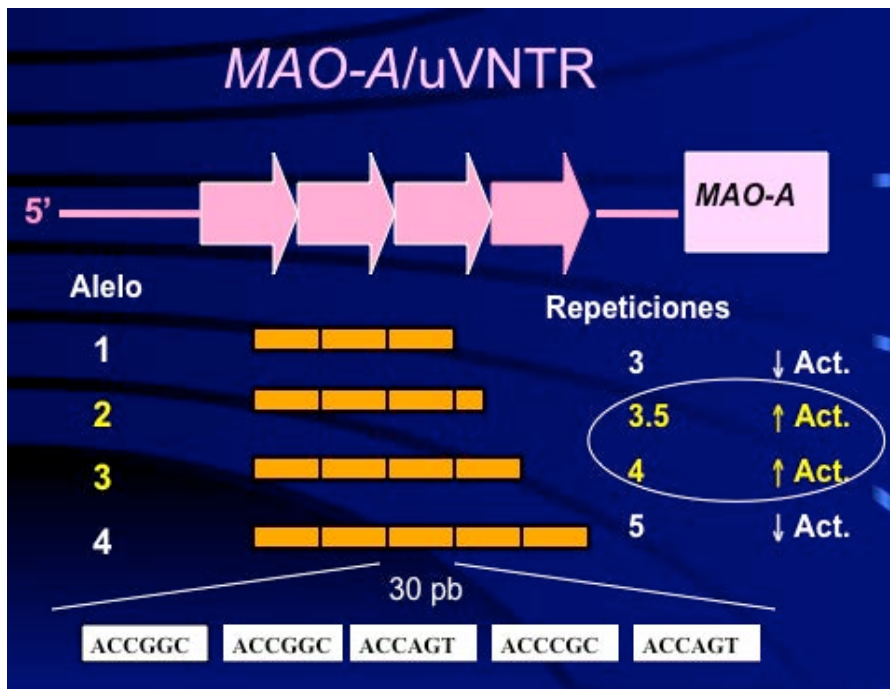
dinucleótidos y en el número de repetidos VNTR, caracterizándolo como una marcador altamente polimórfico, con un valor de heterocigocidad del 75% (Hinds et al., 1992).

Brunner y colaboradores (1993b) reportaron una familia holandesa en que varios integrantes del sexo masculino presentaban características clínicas similares al que algunos pacientes psicóticos presentan, caracterizado por retraso mental y conducta agresiva, además de presentar niveles elevados de las monoaminas, y al que se le denominó “Síndrome de Brunner”. El resultado de los estudios bioquímicos no reveló la presencia de actividad enzimática de MAOA medida en cultivo de fibroblastos de piel en los pacientes hombres ni en las mujeres que presentaban el trastorno (Brunner et al., 1993b). Con el objeto de establecer si la pérdida de la actividad era causada por una mutación en la estructura del gen MAOA, se llevó a cabo su secuenciación. Se detectaron cuatro substituciones, tres polimorfismos neutrales (posiciones: 941, 1077 y 1460) y una mutación no conservada de una citosina por una timina, en la posición 936. Esta mutación cambia una glutamina (CAG) a un codón de terminación (TAG) en la posición 296 de la secuencia de aminoácidos. Este último dato fue comprobado mediante la amplificación y secuenciación del octavo exón, confirmando su presencia en cada uno de los cinco pacientes hombres clínicamente afectados y en dos heterocigotos obligados. Además, la mutación fue excluida en 12 hombres no afectados de esta familia (Brunner et al., 1993a).

Tres años mas tarde, al llevar a cabo un análisis para identificar mutaciones en el gen *MAOA*, mediante RT-PCR, SSCP y secuenciación del RNAm o DNA genómico de 40 hombres que presentaban una actividad enzimática 100 veces mayor a los niveles normales, se pudo observar la alta conservación de la secuencia de *MAOA*, lográndose tan solo la identificación de 5 cambios, de los cuales, solo uno se encontró localizado en el exón 15, caracterizado por el cambio de una adenina a guanina (posición 1609), cambiando una lisina por arginina, no alterando la estructura de la proteína (Tivol et al., 1996).

Finalmente, otro de los polimorfismos mas estudiados en el gen de la *MAOA* es del tipo VNTR y se encuentra localizado en la región promotora (Sabol et al., 1998). Se caracteriza por una región de repetidos de 30 pb, expresando 4 variantes: el alelo 1, el cual contiene 3 repeticiones; el alelo 2, con 3.5 repeticiones; el alelo 3 con 4 repeticiones, y el alelo 4, con 5 repetidos. A este polimorfismo se le denominó *MAOA-uVNTR (upstream variable number of tandem repeats)* (Figura 11). La localización de esta región sugirió que posiblemente pudiera tener un efecto sobre la transcripción del gen, por lo que se llevó a cabo la transfección de las cuatro variantes en cultivos de líneas celulares. El análisis de la expresión de las cuatro construcciones mostró que aquellos que contenían los alelos 2 y 3 expresaban niveles más altos que los que contenían los alelos 1 y 4. Debido a que los alelos 2 y 3 parecen actuar como activadores de la transcripción y los alelos 1 y 4 no cuentan con esta habilidad, se ha sugerido que el gen requiere que dicha región tenga una longitud óptima para llevar a cabo su función de manera adecuada.

Figura 11. Esquema del polimorfismo uVNTR del gen MAOA



Recientemente, fue reportado un nuevo polimorfismo en la región promotora de MAOA (Philibert et al., 2011). Este nuevo polimorfismo se encuentra muy cercano al uVNTR descrito por Sabol et al. (1998), localizándose a 1500 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se caracteriza también por ser un VNTR, por lo que se le ha denominado VNTR P2, y esta constituido por dos regiones de repetidos de un fragmento de 10 pb, CCCCTCCCCG (repetido A) y CTCCTCCCCG (repetido B). La secuencia de los primeros 60 repetidos (6 unidades de repetición) de los elementos, no varía a excepción de un polimorfismo C por T, presente en la base 6365508 (Figura 16). El alelo T se encuentra únicamente en el alelo 10R, sugiriéndose que posiblemente inhiba la actividad del mismo modo que el polimorfismo rs25531 del gen *SLC6A4* (Hu et al., 2006).

1.6.5 Variantes moleculares descritas en MAOB

Con respecto a la identificación de variantes polimórficas en el gen *MAOB*, las mas estudias son tres; una es el polimorfismo conocido como SNP13, reportado por Kurth et al. (1993), el cual se encuentra localizado en el intrón 13 del gen *MAOB* y se caracteriza por el cambio de una adenina por guanina en la posición 644 (A644G; rs1799836). A pesar de que la substitución de A por G no cambia la secuencia de la proteína, se le ha asociado con variaciones en la actividad enzimática (Costa-Mallen et al., 2005). Además, en plaquetas de sujetos portadores del alelo G se observan altos niveles de actividad enzimática comparado con los portadores de la variante A (Garpenstrand et al., 2000). Sin embargo, en cerebro humano se reportó una asociación entre el alelo A y alto niveles de RNAm de *MAOB* (Balciuniene et al., 2002). Se ha sugerido que estas diferencias pudieran estar reguladas por mecanismos tejido-específicos. De manera interesante, en este mismo estudio se evaluaron las variantes moleculares de los genes *MAO*, la cantidad de RNAm y los niveles de actividad enzimática en muestras post-mortem de cerebro humano. El análisis de los haplotipos conformados por *MAOA*/uVNTR y *MAOB*/SNP13 mostró que los individuos portadores del haplotipo 3G se encontraban asociados con niveles bajos de la actividad de *MAOA*. Estos resultados podrían indicar que esta región produce un efecto inhibitorio en la actividad de esta enzima (Balciuniene et al., 2002).

El polimorfismo (GT)_n localizado en el segundo intrón del gen *MAOB* (Konradi et al., 1992), no muestra asociación con la actividad enzimática medida en plaquetas, (Girmen et al., 1992).

En el año 2004, fue reportado un polimorfismo en la región del promotor, en la posición -1114, caracterizado por un cambio de citosina por timina, con una frecuencia de 3.5% en pacientes con Parkinson, no mostrándo una clara asociación con la patología (Costa-Mallen et al., 2004).

2. ESTADO DEL ARTE

El estudio genético de *MAO* en esquizofrenia.

Como se mencionó en el capítulo anterior, existen datos que muestran niveles bajos de actividad enzimática de *MAO* de plaquetas en pacientes con esquizofrenia, por lo que se ha sugerido a esta enzima como un marcador biológico en el desarrollo de este trastorno. De forma alternativa a los análisis bioquímicos, se han llevado a cabo estudios genéticos en *MAOA* y *MAOB*; sin embargo, los hallazgos han resultado controversiales (Tabla 2).

Entre los estudios de asociación positivos, se encuentra el reporte de Coron et al. (1996) en el que se describe una mayor frecuencia del alelo C1460 de *MAOA* en pacientes con esquizofrenia de tipo paranoide. Dos años después Wei y Hemmings (1998) analizan dos regiones de dinucleótidos en los genes *MAO*, encontrando una mayor transmisión del alelo *MAOB*/(TG)₂₄ en pacientes hombres con esquizofrenia. Jonsson et al. (2003) encontró asociación con el alelo de baja actividad del polimorfismo *MAOA*/uVNTR en pacientes hombres con esquizofrenia. En un estudio farmacogenético, se reportó una mayor frecuencia de los alelos de baja actividad de *MAOA*/uVNTR y *COMT*/Val66Met en pacientes no respondedores a neurolépticos comparado con el grupo de los respondedores (Illi et al., 2003).

Posteriormente, el análisis de la conducta agresiva en pacientes con esquizofrenia reporta asociación entre el alelo de alta actividad (4R) del polimorfismo *MAO*/uVNTR y la agresión verbal (Fresán et al., 2007).

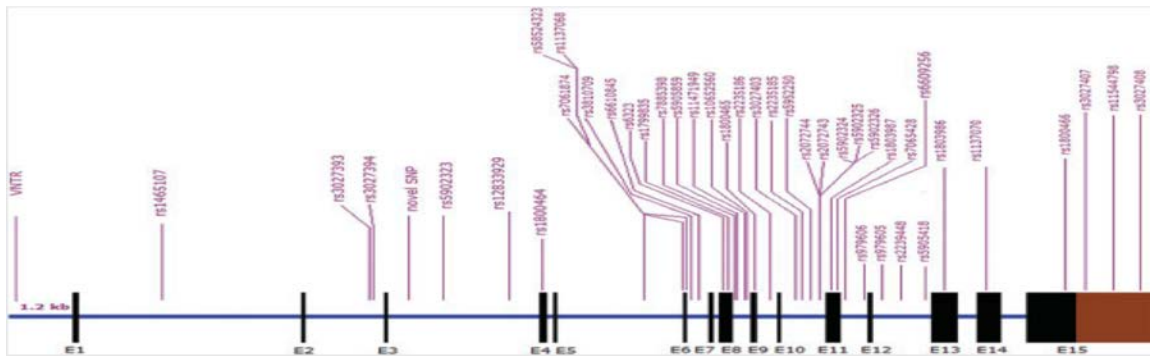
El análisis en población española, del polimorfismo A644G de *MAOB* mostró una mayor frecuencia del alelo G644 en pacientes mujeres con esquizofrenia comparado con un grupo control (Gassó et al., 2008). Del mismo modo, también se encontró una mayor frecuencia del alelo G644 en hombres, sin embargo, no alcanzó significancia al analizar el grupo de controles hombres (Gassó et al., 2008).

Un año después, el análisis en población China, reportó una mayor frecuencia del haplotipo 3TC (uVNTR/T941G/C1460T) en pacientes hombres con esquizofrenia comparado con un grupo de controles sanos ($\chi^2=7.15$, $gl=1$, $p=0.006$). (Qiu et al., 2009).

Hace un par de años, se llevó a cabo un estudio de meta-análisis de los reportes de asociación entre *MAOA* y esquizofrenia reportados hasta febrero del 2006. De los 10 estudios, sólo 8 cumplieron los criterios de inclusión en los que se analizó el polimorfismo uVNTR y 6 reportes con la variante T941G. El análisis no encontró asociación estadísticamente significativa para los polimorfismos analizados del gen *MAOA* con el desarrollo de la esquizofrenia (Li and He, 2008).

El análisis en población China del polimorfismo T941G del gen *MAOA* y A644G del gen *MAOB*, mostró que los portadores del alelo G644 del gen *MAOB* presentan un riesgo mayor a desarrollar esquizofrenia. Además, se observó asociación entre el haplotipo TG y las mujeres con esquizofrenia. Los autores concluyen que es importante el análisis por género en esquizofrenia y en particular al analizar genes localizados en el cromosoma X.

Figura 13. Esquema de los polimorfismos analizados en pacientes con esquizofrenia.



Tomado de Sun et al., 2012.

Recientemente, fue reportado un estudio de asociación en población China, analizando el polimorfismo *MAOA/uVNTR* y 41 SNPs localizados en el gen *MAOA* en pacientes con esquizofrenia paranoide. El análisis de asociación por SNPs no mostró asociación estadísticamente significativa con esquizofrenia paranoide en la muestra total. En el análisis por género, se observó una tendencia hacia la significancia entre el alelo G941 del polimorfismo *Fnu4HI* en hombres con esquizofrenia. El análisis por haplotipos de los polimorfismos *uVNTR/C1460T* mostró asociación con esquizofrenia en la muestra total. El análisis en los hombres con esquizofrenia paranoide reportó una tendencia hacia la significancia con los polimorfismos *Fnu4HI/C1460T*. Con respecto a las mujeres, se encontró asociación con los haplotipos *uVNTR-L/rs6323-T*, *uVNTR-L/rs1137070-C* y *uVNTR-L/rs6323-T/rs1137070-C*. Los resultados encontrados en este estudio sugieren que posiblemente exista un efecto combinado del *uVNTR*, *Fnu4HI* y *C1460T*, en la susceptibilidad para desarrollar esquizofrenia paranoide en las mujeres (Sun et al., 2012).

Tabla 2. Estudios de asociación de los genes *MAOA* y *MAOB* en esquizofrenia

Estudio	Polimorfismos	Hallazgo
Coron et al, 1996	<i>MAOA</i> /C1460T <i>MAOB</i> /A644G	Tendencia significancia entre el alelo <i>MAOA</i> /C1460 y esquizofrenia paranoide.
Sasaki et al, 1998	<i>MAOA</i> /T941G <i>MAOA</i> /A1609G	No se encontró asociación.
Wei y Hemmings, 1998	<i>MAOA</i> /(AC) _n <i>MAOB</i> /(TG) _n	Estudio de asociación basado en familias mostró una mayor transmisión del alelo <i>MAOB</i> /(TG) ₂₄ en pacientes hombres.
Syagailo et al, 2001	<i>MAOA</i> /uVNTR	No se encontró asociación.
Norton et al., 2002	<i>MAOA</i> /uVNTR	No se encontró asociación.
Iwata et al, 2003	<i>MAOA</i> /T941G <i>MAOA</i> /uVNTR	No se encontró asociación.
Jonsson et al, 2003	<i>MAOA</i> /uVNTR	Asociación alelos baja actividad transcripcional y pacientes hombres con esquizofrenia.
Illi et al, 2003	<i>MAOA</i> /uVNTR	Alelos baja actividad de <i>MAOA</i> asociado con no respuesta a neurolépticos.
Fan et al., 2004	<i>MAOA</i> /uVNTR	No se encontró la transmisión de un alelo particular.
Zammit et al., 2004	<i>MAOA</i> /T941G <i>MAOA</i> /uVNTR <i>MAOB</i> /(TG) _n	No se encontró asociación entre conducta agresiva y <i>MAOA</i> en pacientes con esquizofrenia.
Matsumoto et al, 2004	<i>MAOA</i> /uVNTR <i>MAOB</i> /A644G	No se encontró asociación con disquinesia tardía.
De Luca et al, 2006	<i>MAOA</i> /uVNTR	No se encontró asociación con conducta suicida.
Fresán et al, 2007	<i>MAOA</i> /uVNTR	Se reporta asociación entre del alelo de alta actividad y conducta agresiva.
Carrera et al., 2009	<i>MAOB</i> /rs12851487, rs4824562, rs5952799, rs5905512	Haplotipo asociado a esquizofrenia.
Gassó et al., 2008	<i>MAOB</i> /A644G	Alelo G asociado con esquizofrenia y el análisis por género se asoció con las mujeres.
Bergen et al., 2009	<i>MAOB</i> /A644G	No se encontró asociación al analizar por síntomas positivos y negativos.
Qiu et al., 2009	<i>MAOA</i> /uVNTR <i>MAOA</i> /T941G <i>MAOA</i> /C1460T	El 3% de hombres con esquizofrenia fueron portadores del haplotipo de riesgo 3TC.
Alvarez et al, 2009	<i>MAOA</i> /uVNTR <i>MAOA</i> /C1460T	No se encontró asociación.
Wei et al., 2011	<i>MAOA</i> /Fnu4HI <i>MAOB</i> /A644G	Alelo G como factor de riesgo para esquizofrenia y asociación entre haplotipo TG y mujeres con esquizofrenia.
Sun et al., 2012	<i>MAOA</i> /uVNTR, G941T, C1460T y 41 SNP	Asociaciones marginales haplotipos uVNTR-G941T-A644G en mujeres esquizofrenia paranoide.

En conclusión, hasta la fecha solo dos estudios muestran asociación entre polimorfismos de los genes *MAOA* y *MAOB* y esquizofrenia (Coron et al., 1996; Carrera et al., 2009) (Tabla 2). Sin embargo, la mayoría de los estudios positivos han reportado asociación con características muy particulares como el género, esquizofrenia de tipo paranoide y con conducta agresiva. Existe mucha evidencia que apoya la propuesta de analizar subtipos muy particulares en enfermedades que demuestran una gran heterogeneidad como la esquizofrenia; de tal manera, resulta importante proponer estudios que analicen subgrupos clínicos de los trastornos para tener grupos genéticamente más homogéneos. Hasta la fecha, solo un grupo ha analizado los síntomas positivos y negativos en relación con el gen *MAOB*, no encontrando asociación estadísticamente significativa (Bergen et al., 2009). De tal manera, es importante realizar estudios en otras poblaciones y en las que se proponga el análisis de diversas características clínicas con el propósito de analizar si los genes *MAO* se encuentran involucrados con fenotipos asociados con el desarrollo de la esquizofrenia en población mexicana.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

Existe evidencia controversial que sugiere la presencia de un locus en el cromosoma X asociada con el desarrollo de la esquizofrenia. Por ejemplo, los estudios clínicos que muestran una frecuencia alta de psicosis en individuos portadores de un cromosoma X extra (XXY en hombres y XXX en mujeres)(DeLisi et al., 1989). Aunado a estas observaciones, se reportó la presencia de ligamiento en la región Xp11 en familias con esquizofrenia con una transmisión materna de síntomas psicóticos (Dann et al., 1997; DeLisi et al., 1994). Estos hallazgos sugieren la presencia de genes candidatos en este cromosoma.

De manera interesante, en la región Xp11 se encuentran localizados los genes MAO. Esta enzima ha sido postulada como un posible marcador biológico de esquizofrenia con base a los reportes que muestran niveles bajos de la actividad de MAO plaquetaria en gemelos monocigotos (DeLisi et al., 1982; Wyatt, 1973).

La participación de la MAO en la degradación oxidativa de las monoaminas presentes en las neuronas presinápticas, regula su concentración citoplasmática y sustenta la idea de que una disfunción en la actividad de esta enzima podría producir concentraciones anormales de varios sustratos (entre los que han sido reportados, una alta concentración de dopamina y serotonina) modificando la transmisión neuroquímica.

Estudios de familias y de gemelos han sugerido una susceptibilidad genética en la esquizofrenia. Lo que se refuerza con los estudios en los que se ha demostrado que la actividad de MAO en plaquetas está genéticamente determinada y es altamente heredable (Breakefield y Eldstein, 1980). También, se ha reportado que

familiares de primer grado de individuos que muestran una baja actividad de *MAO* plaquetaria asociada a un trastorno psiquiátrico, tienen una alta probabilidad de tener una actividad disminuida de la enzima, comparado con la población general (Devor et al., 1993).

Finalmente, resulta importante mencionar que el único trabajo que analizó diversos SNPs localizados en el gen *MAOA*, encuentra hallazgos interesante únicamente con tres polimorfismos, los cuales son lo que ya previamente han sido analizados (uVNTR, Fnu4HI y C1460T) en esquizofrenia (Sun et al., 2012). De tal manera, se propuso analizar para este estudio, los polimorfismos que ya previamente ha mostrado asociación y que resultan ser interesantes de analizar en población mexicana. Estudios previos han mostrado que los polimorfismos Fnu4HI y C1460T se encuentran en desequilibrio de enlace, por lo que el estudio de tan solo uno de ellos, junto con el uVNTR, resultan ser importantes marcadores para estudiar en la esquizofrenia. Con respecto al gen *MAOB*, el que ha mostrado datos mas interesantes es el denomina A644G, por lo que es tambien importante su estudio en población mexicana.

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DE LOS GENES *MAOA* y *MAOB* EN ESQUIZOFRENIA.

Existe evidencia que apoya la hipótesis de que una disfunción en la actividad de la *MAO* pudiera estar involucrada en el desarrollo de la esquizofrenia. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios en los que se han analizado alguna de las variantes moleculares en este tipo de trastorno. Resulta aún más interesante el observar que en ninguno de los estudios reportados evitó el problema de estratificación poblacional, como lo son los métodos de asociación basado en familias. De tal manera que es posible que los datos que existen en la literatura sean asociaciones falsas (falso positivos) provocados por el tamaño de la muestra y por el tipo de metodología empleada.

En el presente estudio, se realizó el análisis de genes localizados en el cromosoma X en base a los hallazgos clínicos, epidemiológicos y moleculares que apoyan la presencia de genes candidatos en el desarrollo de la esquizofrenia en pacientes mexicanos. Además, con el propósito de realizar un estudio en grupos más homogéneos, se analizó la muestra por características clínicas, como edad de inicio, género, subtipo de trastorno y gravedad de la sintomatología psicótica, lo cual podría replicar o no, algunos de los hallazgos encontrados en otras poblaciones.

Con base en lo anterior, nosotros proponemos como hipótesis del presente estudio, que variaciones en el gen *MAOA* y *MAOB* se asocian al desarrollo de la esquizofrenia

5. OBJETIVOS

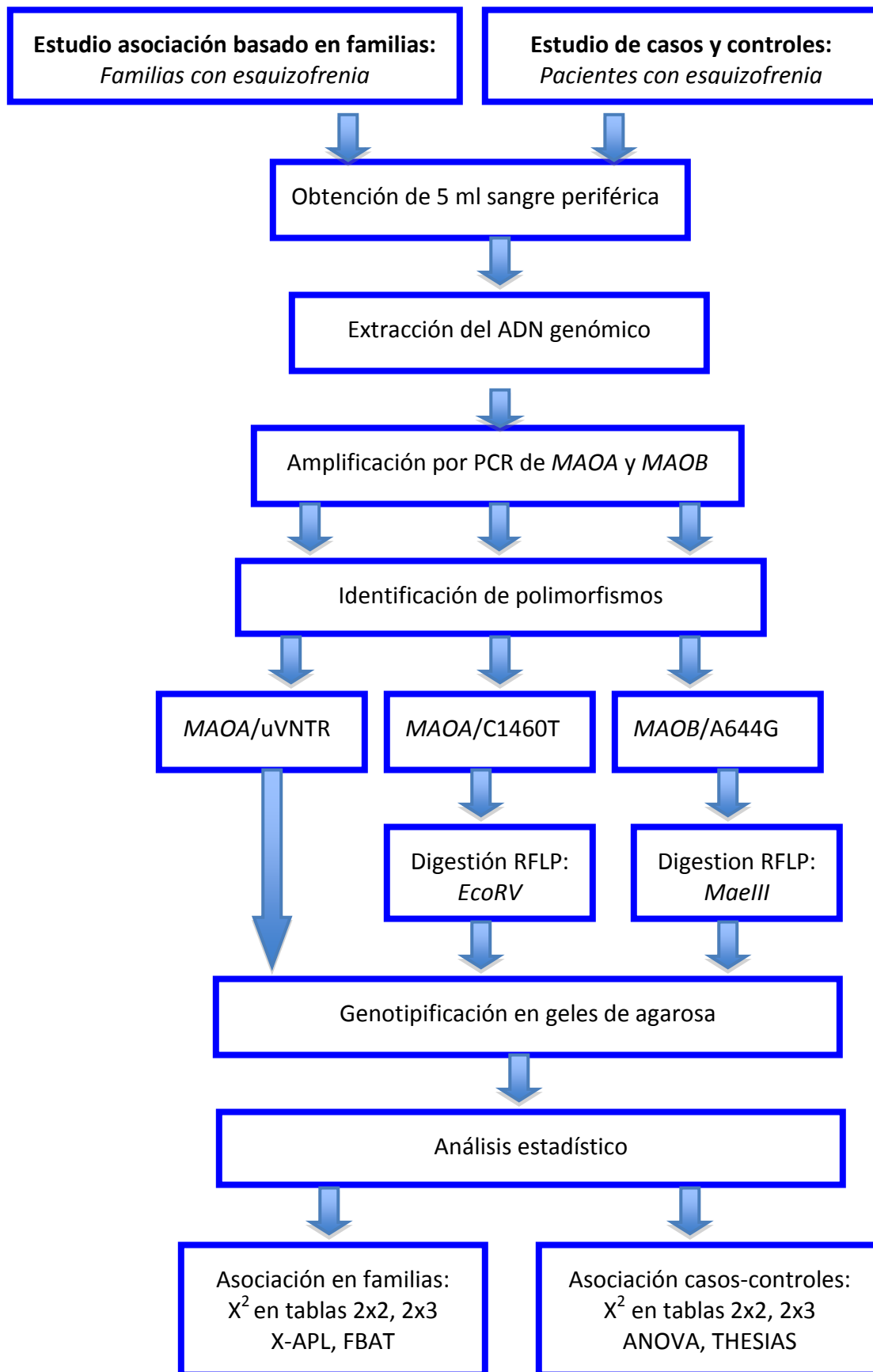
Objetivo general.

Determinar si existe asociación entre los polimorfismos de los genes *MAOA* y *MAOB* y la presencia de esquizofrenia.

Objetivos particulares.

- 1- Analizar la transmisión alélica de los polimorfismos C1460T y uVNTR del gen *MAOA* en un grupo de pacientes con esquizofrenia y sus familiares de primer grado.
- 2- Analizar la asociación de los polimorfismos con variables clínicas como la edad de inicio, género y sintomatología.
- 3- Analizar la transmisión alélica del polimorfismo A644G del gen *MAOB* en las familias con esquizofrenia y determinar si existe una asociación con la edad de inicio, género y sintomatología.
- 4- Análisis de la transmisión de haplotipos en las familias con esquizofrenia.
- 5- Determinar si existe asociación entre los polimorfismos de *MAOA* y *MAOB* y la esquizofrenia.
- 6- Analizar la asociación entre los polimorfismos de *MAOA* y *MAOB* con las características clínicas en pacientes con esquizofrenia.

6. ESTRATEGIA GENERAL.



7. METODOLOGÍA

7.1 Descripción de la muestra

Familias con esquizofrenia:

El estudio incluyó una muestra de 60 familias obtenidas de la consulta externa del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) y del Grupo Médico Carracci. Las familias incluyeron múltiples afectados dando un total de 132 pacientes con esquizofrenia (74 hombres y 58 mujeres).

Estudio de casos y controles:

Se reclutaron un total de 344 pacientes con esquizofrenia (135 mujeres y 209 hombres), obtenidos de la Clínica de esquizofrenia del Instituto Nacional de psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

La muestra control fue de 124 sujetos sanos (64 mujeres y 60 hombres), evaluados mediante la entrevista psiquiátrica DIS-versión en español. Los sujetos no cumplieron con los criterios diagnósticos de enfermedad mental, en el pasado y en el presente para poder ser definidos como controles sanos. Este grupo fue obtenido del banco de ADNg del laboratorio de genética del INPRFM.

El proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz y del Grupo Médico Carracci.

Los requisitos para la inclusión de los pacientes fueron:

- i) Que cumplieran los criterios diagnósticos del DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994*) para esquizofrenia. La evaluación clínica se realizó a través de la entrevista estructurada DIGS versión en español (*Diagnostic Interview for Genetic Studies*) (Salazar et al., 2004).
- ii) Que los probandos fueran de padres y abuelos de origen mexicano y que firmaran la carta de consentimiento informado para participar en el estudio.
- iii) Para el caso de las familias, se requirió que se obtuvieran familias con dos o más afectados con esquizofrenia.
- iv) Hombres y mujeres entre 18 a 60 años.

Criterios de exclusión:

- i) Menores de 18 años
- ii) Abuso severo de sustancias o enfermedad médica que confunda el diagnóstico de esquizofrenia.
- iii) Pacientes en donde dos de los abuelos tengan ascendencia distinta a la mexicana.
- iv) No desea dar su consentimiento para participar o no desea dar muestra de sangre.

Se tomaron 5 ml de sangre periférica, en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante, de cada uno de los participantes. Las muestras se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

Clinimetría

A todos los pacientes se les aplicó la escala de evaluación de síntomas negativos (SANS) y la escala para evaluación de síntomas positivos (SAPS) (Andreasen y Olsen, 1982).

La escala SANS contiene reactivos para calificar 30 síntomas negativos, que se incluyen en cinco síntomas globales (alogia, aplanamiento afectivo, avolición, atención y anhedonia).

La escala SAPS tiene reactivos para calificar 19 síntomas positivos, que se agrupan en cinco categorías (alucinaciones, delirios, trastorno formal del pensamiento y conducta bizarra) (Ver anexo).

7.2 Análisis genético

7.2.1 Extracción de DNA genómico.

Se llevó a cabo la extracción del DNA a partir de sangre total mediante la técnica de Lahiri (Lahiri, Nurnberger 1991). El método consiste en el rompimiento de la membrana de leucocitos mediante el uso de soluciones amortiguadores con altas concentraciones y liberación del material genético. El siguiente paso consiste en la separación del material genético de la células sanguíneas mediante el uso de fenol y fenol-cloroformo. Finalmente, se procede a la precipitación del DNA mediante el uso de una solución de NaCl y etanol al 70% frío, recuperación de la pastilla mediante centrifugación y disolución del DNA en buffer TE. La muestra disuelta es almacenada a 4°C.

7.2.2 *Análisis de los polimorfismos en el gen de la MAOA.*

Se analizaron los polimorfismos mediante la amplificación del ADN genómico de cada sujeto por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones para cada una de las regiones se describen a continuación.

Polimorfismo MAOA/C1460T (Hotamisligil, Breakefield, 1991).

Oligonucleótidos:

sentido: MAOAC1460TF 5'- TTA AAT GGT CTC GGG AAG G

antisentido: MAOAC1460TR 5' - GCC CAA TGA CAC AGC CTT T

a) La reacción de PCR consistió de: KCl 50 mM, Tris (pH 8.3) 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, gelatina 100 µg/ml, dNTP 1 mM de cada uno, 200 nM de cada oligonucleótido y 1 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) y 250 ng de DNA genómico, en un volumen final de 25 µl. Se programaron 35 ciclos de amplificación (94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos) con un tiempo de extensión final de 5 min a 72°C.

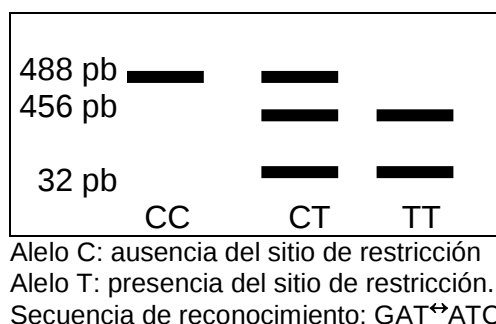
b) Para determinar el tamaño del amplicón: 3 µl del producto de amplificación se mezclan con 2 µl de colorante de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X. Finalmente el gel es teñido en bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml por 15 minutos. El tamaño del fragmento esperado es de 488 pb.

c) Digestión de la muestra: 10 µl de DNA amplificado es digerido con 10 U de la

enzima de restricción *EcoRV* con el buffer de reacción 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA) a una temperatura de 37°C toda la noche.

d) Genotipificación: el volumen total de digestión fué cargado en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X a 110 volts.

El patrón de bandas esperado es el siguiente:



Polimorfismo MAOA/uVNTR (Sabol et al., 1998).

Oligonucleótidos:

orientación sentido: MAOAuVNTRF 5'- ACA GCC TGA CCG TGG AGA AG

orientación antisentido: MAOAuVNTRR 5'- GAA CGG ACG CTC CAT TCG GA

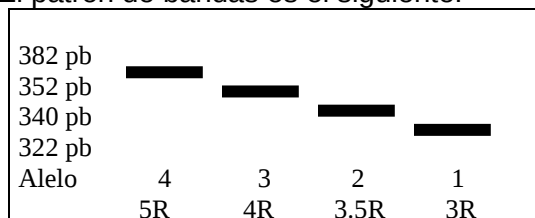
a) La reacción de PCR consistió de KCl 50 mM, Tris (pH 8.3) 10 mM, MgCl_2 1.5 mM, gelatina 100 $\mu\text{g/ml}$, dNTP 1 mM de cada uno, 200 nM de cada oligonucleótido y 0.5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) y 100 ng de DNA genómico, en un volumen final de 25 μl . Se programaron 35 ciclos de amplificación (94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) con un tiempo de extensión final de

10 min a 72°C.

b) Para determinar el tamaño del amplicón, se siguieron las mismas condiciones descritas para el polimorfismo EcoRV (paso b). El tamaño esperado del fragmento amplificado es de 352 pb.

c) Genotipificación: 10 µl del producto amplificado fueron mezclados con 8 µl de colorante de electroforesis y cargados en un gel de agarosa metaphor al 3% en TBE 1X a 110 volts.

El patrón de bandas es el siguiente:



R es el número de repeticiones de la secuencia de 30 pb.

3.5R= 30 + 18 pb

7.2.3 Análisis del polimorfismo del gen de MAOB.

Polimorfismo MAOB/A644G (SNP13) (Matsumoto et al., 2004).

Oligonucleótidos:

orientación sentido: SNP13F 5'-GAG ACA GTT ACT TAG TCC TTT AGG G

orientación antisentido: SNP13R 5'-AGA CTC TGG TTC TGA CTG CCA GAT

a) La reacción de PCR consistió de KCl 50 mM, Tris (pH 8.3) 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, gelatina 100 ug/ml, dNTP 1 mM de cada uno, 200 nM de cada oligonucleótido y 0.4 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) y 200 ng de DNA genómico, en

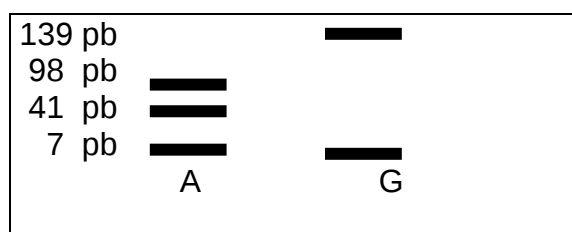
un volumen final de 25 μ l. Se programaron 30 ciclos de amplificación (94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) con un tiempo de extensión final de 10 min a 72°C.

b) Para determinar el tamaño del amplicón se siguieron las mismas condiciones descritas para el polimorfismo *EcoRV* (paso b). El tamaño esperado del fragmento amplificado es de 146 pb.

c) Digestión de la muestra: 10 μ l de DNA amplificado es digerido con 10 U de la enzima de restricción *MaeIII* con el buffer de reacción (50 mM tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl y 0.1 mg/ml BSA) y a una temperatura de 37°C toda la noche.

d) Genotipificación: el volumen total de digestión fueron cargados en geles de agarosa al 3% en TAE 1X a 110 volts.

El patrón de bandas esperado es el siguiente:



Alelo A: presencia del sitio de restricción

Alelo G: ausencia del sitio de restricción.

Secuencia de reconocimiento: $\rightarrow$ GTNAC

7.2.4 Análisis estadístico de la muestra.

a) Análisis de las familias con múltiples afectados.

Los métodos de asociación basados en familias son los más utilizados para analizar genes candidatos en enfermedades complejas cuando disponemos de la

información de los familiares. Sin embargo, este tipo de metodologías fueron desarrolladas principalmente para el análisis de marcadores autosómicos, por lo que los avances en el estudio de genes localizados en el cromosoma X ha sido lento debido a que no existen métodos estadísticos apropiados para el análisis de asociación basados en familias con genes en el cromosoma X.

Un método que es comúnmente utilizado en el mapeo de genes en enfermedades complejas es el uso de los estudios de asociación en regiones en ligamiento. Martin et al (2003) propuso una prueba estadística alternativa, que infiere genotipos parentales mediante el uso de los alelos compartidos IPD (idénticos por descendencia) en pares de hermanos afectados y a la que llama prueba de Asociación en Presencia de Ligamiento (*Association in Presence of Linkage, APL*). Chung et al. (2007) propuso una extensión a la metodología APL para marcadores en el cromosoma X y a la cual denomina X-APL. Este método también infiere genotipos parentales perdidos, en regiones que han demostrado enlace génico, considerando los alelos compartidos IPD para pares de hermanos afectados. X-APL realiza el análisis para un solo marcador e inclusive para haplotipos. Otra característica importante es que reconoce la existencia de rasgos ligados al X por lo que realiza el análisis separando por género a la muestra y permitiendo inferir efectos diferentes entre hombres y mujeres. La comparación entre diferentes modelos de análisis, mostró un mayor poder estadístico para el método de X-APL tanto en el análisis de la muestra total como por género (Chung et al, 2007).

Características del modelo X-APL.

La estadística del modelo X-APL está basada en diferencias entre el número de copias observadas de un alelo en los sujetos afectados y el número de copias esperadas y condicionadas por los genotipos de los padres, bajo la hipótesis nula de no asociación y sin presencia de enlace génico en las familias nucleares. El programa puede analizar familias con uno o más hermanos afectados y un número arbitrario de hermanos no afectados.

Cuando los genotipos de los padres están perdidos, X-APL infiere los genotipos mediante el uso de los genotipos de los hermanos y cuenta el ligamiento por medio de los alelos compartidos IPD. Como ejemplo, en un sistema dialélico, el alelo 1 en la mamá, puede tomar el valor de 0, 1 o 2 (alelos compartidos). En los papás, el alelo 1 toma el valor de 0 o 1.

Cuando los genotipos de los padres tienen que ser inferidos, los alelos compartidos IPD para un par de hermanos afectados son utilizados para la cuenta de eventos por ligamiento entre el marcador y el locus de la enfermedad. La estimación de la varianza se ve afectada por la estructura de las familias, por lo que el programa ajusta la varianza en función del número de hermanos afectados en cada familia.

b) Análisis cuantitativo mediante el método de asociación basado en familias.

El análisis cuantitativo de las características clínicas se realizó utilizando el método descrito por Horvath et al (2001) y analizado mediante la prueba de asociación basado en familias (*FBAT, Family Based Association Test*) utilizando el programa denominado FBAT versión 2.0.2c.

El método de Horvath et al. (2001) codifica cada rasgo cuantitativo como Y_{ij} , y el rasgo cuantitativo TDT lo define como el rasgo normalizado (T_{ij}), calculado por la ecuación: $T_{ij} = Y_{ij} - \mu$, en donde μ es el promedio de las calificaciones de un rasgo en la muestra en estudio. De tal manera, de la calificación individual de cada rasgo se obtiene el valor normalizado y éste es el dato que se introduce en la base de datos para su análisis por el método de FBAT cuantitativo.

Las características clínicas analizadas mediante el método de Horvath fueron la edad de inicio, severidad de los síntomas positivos (escala SAPS) y los síntomas negativos (escala SANS). Los síntomas psicóticos fueron analizados tomando en cuenta la calificación total de la escala y la calificación de cada sub-escala. Para el caso de los síntomas negativos se analizó el aplanamiento afectivo, alogia, anhedonia y atención; y para los síntomas positivos: alucinaciones, delirios, conducta bizarra y trastorno formal del pensamiento.

c) Análisis de asociación de casos-contróles.

El análisis de frecuencias de alelos y genotipos para cada una de las regiones analizadas entre la muestra de los pacientes con esquizofrenia y el grupo control se realizó mediante el análisis estadístico en tablas de contingencia de 2x2 y cálculo de la χ^2 cuadrada con el paquete estadístico denominado Tadpole versión R2, diseñado por Caradoc-Davies, Elsevier-Biosoft. El análisis de las características clínicas se realizó con el programa estadístico SPSS, versión 18.0, utilizando la prueba de MANOVA (*Multivariate Analysis of the Variance*) de cada uno de los polimorfismo estudiados.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se analizó con el programa EHW diseñado por Ott (Ott, 1988).

Los análisis estadísticos fueron ajustados por múltiples pruebas mediante la corrección de Bonferroni a una $p \leq 0.016$ (análisis de 3 polimorfismos: $0.05/3=0.016$).

d) Análisis por haplotipos.

El análisis de los haplotipos conformados por las variantes uVNTR/C1460T/A644G se realizó mediante el programa estadístico THESIAS (*Testing Haplotype Effects in Association Studies*) (Tregouet y Garelle, 2007). El programa permite obtener el cálculo del desequilibrio de enlace (LD) basado en el parámetro D' y de la frecuencia de haplotipos de las muestras analizadas. Del mismo modo efectúa un análisis del efecto de cada haplotipo sobre fenotipos cuantitativos, de tal manera que se llevó a cabo el análisis de los síntomas positivos y negativos.

8. RESULTADOS.

8.1 Análisis de las características clínicas y demográficas de las muestras analizadas.

Las 60 familias analizadas tuvieron las siguientes características: 9 familias con tres sujetos afectados, 50 con dos hermanos afectados y 1 familia con cinco hermanos afectados. Sólo en 13 familias se obtuvo muestra de ambos padres, 33 con un solo padre disponible y de 14 familias no se obtuvo muestra. Las familias incluyeron 132 pacientes esquizofrénicos (74 hombres y 58 mujeres).

La muestra total de pacientes con esquizofrenia fue de 344 pacientes esquizofrénicos (135 mujeres y 209 hombres). El análisis por género de la edad y edad de inició mostró diferencias estadísticamente significativas ($t=-3.4$, $gl=342$, $p=0.0009$; $t=-3.9$, $gl=342$, $p=0.0001$) (Tabla 3). Sin embargo, la gravedad de la sintomatología negativa y positiva no mostró diferencias significativas entre hombres y mujeres con esquizofrenia ($t=0.179$, $gl=342$, $p=0.86$; $t=0.62$, $gl=342$, $p=0.54$) (Tabla 3).

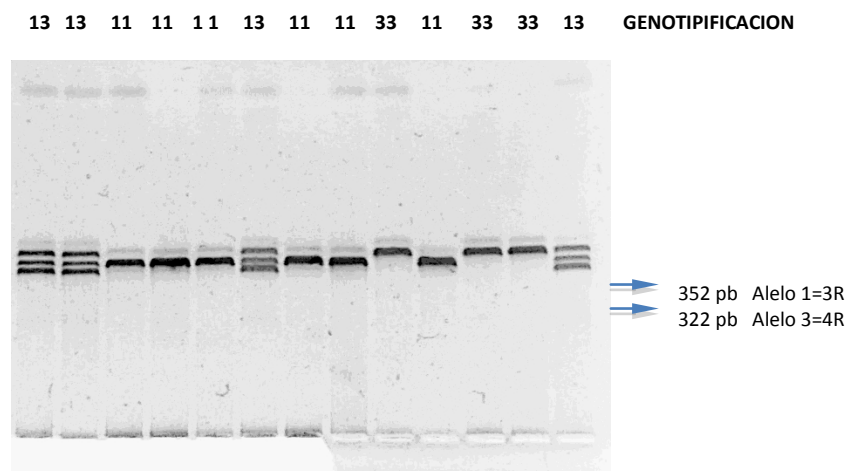
Tabla 3. Características clínicas por género de los pacientes con esquizofrenia.

Característica clínica	Esquizofrenia	
	Hombres (n=209)	Mujeres (n=135)
Edad (años)	31.2±9.3	34.8±10.2
Edad de inicio (años)	20.9±6.0	23.9±8.3
Síntomas negativos	10.1± 4.9	10.0±5.3
Síntomas positivos	5.8 ±4.4	5.5±4.4

8.2 Análisis de las frecuencias de genotipos y alelos en las muestras estudiadas.

El análisis de los polimorfismos de los genes *MAOA* y *MAOB* requirió que previamente se estandarizara cada una de la metodologías antes de llevar a cabo el análisis en las muestras de estudio. La figura 13 muestra un ejemplo del análisis del polimorfismo uVNTR del gen *MAOA*.

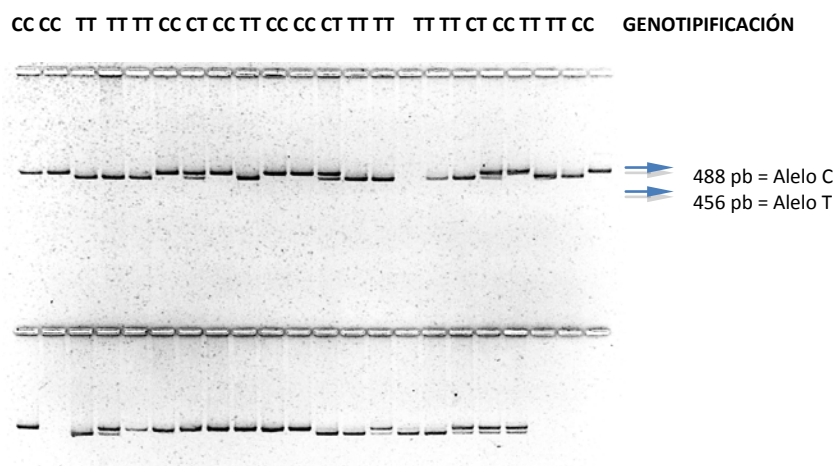
Figura 14. Foto del análisis del polimorfismo *MAOA*/uVNTR.



Gel de agarosa Metaphor al 3% en buffer TBE 1X teñido con Bromuro de etidio.

Del mismo modo, se realizó la estandarización de la metodología para la genotipificación del polimorfismo C1460T del gen *MAOA*. La figura 14 muestra una foto de la reacción con la enzima de restricción, mostrando el patrón de bandas característico.

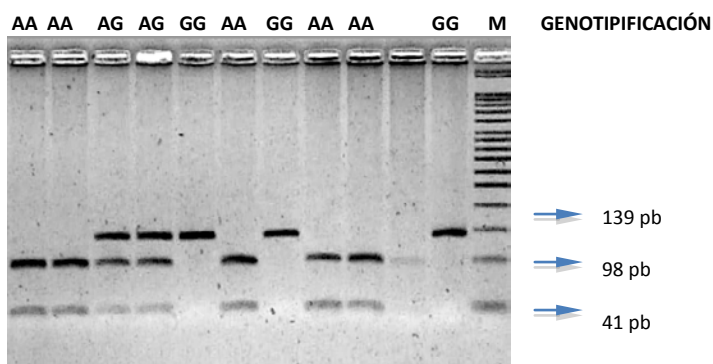
Figura 15. Foto del análisis del polimorfismo *MAOA/C1460T* en geles de agarosa.



Gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñido con Bromuro de etidio.

En la figura 15 se muestra una foto de la genotipificación del polimorfismo A644G del gen *MAOB*, en donde se observa el patrón de bandas característico después de la reacción con la enzima de restricción MaeIII.

Figura 16. Foto del análisis del polimorfismo *MAOB/A644G* en geles de agarosa.



Gel de agarosa al 3%/TAE 1X
M= marcador de peso molecular, escalera de 50 pb

Las frecuencias de alelos observadas en el estudio se muestran en la tabla 4. Se reportan las frecuencias de la muestra total de pacientes con esquizofrenia y el grupo de controles sanos mexicanos reportados por nuestro grupo para los polimorfismos uVNTR, C1460T (Camarena et al., 2001; Fresán et al., 2007) y A644G. No se encontraron desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra control para ninguna de las regiones analizadas (uVNTR: $\chi^2=0.004$, $df=1$, $p=0.95$; C1460T: $\chi^2=1.62$, $df=1$, $p=0.20$; A644G: $\chi^2=0.001$, $df=1$, $p=0.97$).

No se observó asociación en la comparación entre controles sanos y los pacientes con esquizofrenia (MAOA/uVNTR: $\chi^2=0.77$, $p=0.62$; MAOA/C1460T: $\chi^2=4.75$, $p=0.027$ y MAOB/SNP13: $\chi^2=0.02$, $p=0.87$) (Tabla 4).

Finalmente, se realizó un análisis por género, no observándose diferencias estadísticamente significativas con los polimorfismos de los genes MAOA y MAOB (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de alelos de los polimorfismos de los genes MAOA y MAOB en las muestras analizadas.

Marcador	Esquizofrenia (n=344)		Controles (n=124)	
MAOA/uVNTR	1	3	1	3
Hombres	76 (0.36)	133 (0.64)	19 (0.35)	36 (0.65)
Mujeres	112 (0.41)	158 (0.59)	44 (0.40)	66 (0.60)
Total	188 (0.39)	291 (0.61)	63 (0.38)	102 (0.62)
MAOA/C1460T	C	T	C	T
Hombres	121 (0.58)	88 (0.42)	39 (0.65)	21 (0.35)
Mujeres	143 (0.53)	127 (0.47)	84 (0.66)	44 (0.34)
Total	264 (0.55)	215 (0.45)	123 (0.65)	65 (0.35)
MAOB/A644G	A	G	A	G
Hombres	136 (0.65)	73 (0.35)	31 (0.55)	25 (0.45)
Mujeres	185 (0.69)	85 (0.31)	77 (0.58)	55 (0.42)
Total	321 (0.67)	158 (0.33)	108 (0.57)	80 (0.43)

8.3 Estudio de asociación basado en familias

8.3.1 Análisis de X-APL en las familias estudiadas.

En el estudio se analizaron tres polimorfismos, dos de tipo bi-alélico y uno conformado por 4 diferentes alelos; con respecto a este último, solo dos alelos son expresados en población mexicana (Camarena et al., 2001), reduciéndolo también a un polimorfismo bi-alélico. Se realizó el análisis mediante el método de X-APL en las 60 familias con múltiples individuos afectados. Los resultados no muestran la presencia de asociación en presencia de ligamiento para las tres regiones analizadas en los genes *MAOA* y *MAOB* (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis X-APL de las familias con múltiples afectados con esquizofrenia.

Marcador	Alelo	Frecuencia	Observado	Esperado	Var (O-E)	p
uVNTR	1	0.40	71.0	71.0	12.51	0.99
	3	0.60	96.0	95.9		
C1460T	C	0.57	91.0	95.3	18.92	0.32
	T	0.43	78.0	73.6		
A644G	A	0.65	114.0	112.5	17.13	0.72
	G	0.35	52.0	54.5		

8.3.2 Análisis por género de la muestra de familias con esquizofrenia.

Se llevó a cabo el análisis por género de las 60 familias con base en la metodología descrita por Chung et al (2007). Los resultados no muestran asociación estadísticamente significativa para ninguna de las regiones analizadas con el género (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis X-APL por género de las familias con múltiples afectados con esquizofrenia.

Marcador	Alelo	Frecuencia	Observado	Esperado	Var (O-E)	p
uVNTR	Hombre: 1	0.38	25.0	26.7	8.8	0.57
	3	0.62	44.0	42.3		
	Mujer: 1	0.44	48.0	49.1	6.3	0.66
	3	0.56	64.0	62.9		
C1460T	Hombre: C	0.60	42.0	41.6	9.1	0.88
	T	0.40	27.0	27.4		
	Mujer: C	0.52	57.0	59.4	7.4	0.38
	T	0.48	55.0	52.6		
A644G	Hombre: A	0.63	43.0	45.4	7.9	0.39
	G	0.37	26.0	23.6		
	Mujer: A	0.69	80.0	75.9	6.1	0.10
	G	0.31	31.0	36.0		

8.3.3 Análisis de los subtipos de esquizofrenia en las 60 familias.

a) Análisis de los subtipos de esquizofrenia.

En los sujetos afectados con esquizofrenia provenientes de las 60 familias analizadas se clasificaron por subtipos de esquizofrenia: paranoide, indiferenciada y desorganizada.

Tabla 7. Subtipos de Esquizofrenia en los 60 pares de hermanos.

Pares de hermanos	n (%)
Paranoide-Paranoide	46 (77)
Paranoide-Indiferenciada	9 (15)
Paranoide-Desorganizada	3 (5)
Desorganizado-Indiferenciado	2 (3)

La tabla 7, muestra que el 77% de los pares de hermanos con esquizofrenia fueron concordantes para el subtipo de esquizofrenia paranoide, por lo que por el

tamaño de muestra el análisis solo fue posible realizarlos para este grupo. Los resultados no muestran asociación estadísticamente significativa con ninguno de los polimorfismos de MAOA y MAOB (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis X-APL de las familias con pares de hermanos concordantes para el subtipo de esquizofrenia paranoide.

Marker	Alelo	Frecuencia	Observado	Esperado	Var (O-E)	p
uVNTR	1	0.38	25.0	26.67	8.7	0.57
	3	0.62	44.0	42.32		
C1460T	C	0.60	42.0	41.56	8.9	0.88
	T	0.40	27.0	27.44		
A644G	A	0.63	43.0	45.37	7.4	0.38
	G	0.37	26.0	23.62		

8.3.4 Análisis cuantitativo por FBAT de las características clínicas de las familias con esquizofrenia.

Las características clínicas analizadas fueron la edad de inicio, los síntomas positivos y los síntomas negativos. El análisis de las características clínicas se realizó con base en el método descrito por Horvarth et. al. (2001). El análisis de cada polimorfismo se realizó con base al método de TDT en los fenotipos cuantitativos y utilizando el programa FBAT.

a) Análisis de la edad de inicio.

El análisis cuantitativo por FBAT de la edad de inicio no mostró asociación con ninguno de los polimorfismos de los genes *MAOA* y *MAOB* (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis cuantitativo por FBAT de la edad de inicio de la esquizofrenia.

Marcador	Alelo	Frecuencia	Fam	S-E(S)	Var (S)	Z	p
uVNTR	1	0.37	25	-13.26	319.3	-0.74	0.46
	3	0.63	25	13.26	319.3	0.74	
C1460T	C	0.58	27	21.78	308.1	1.24	0.21
	T	0.42	27	-21.78	308.1	-1.24	
A644G	A	0.68	22	18.05	195.4	1.29	0.19
	G	0.32	22	-18.05	195.4	-1.29	

Fam= Familias informativas

b) Análisis de la gravedad de los síntomas positivos de acuerdo a la escala SAPS.

El análisis cuantitativo de los síntomas positivos no mostró la transmisión de un alelo en particular para ninguno de los polimorfismos con la gravedad de las alucinaciones, delirios, conducta bizarra y trastorno formal del pensamiento, ni para la calificación total de los síntomas positivos (Tabla 10).

c) Análisis de la gravedad de los síntomas negativos de acuerdo a la escala SANS. En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos en el análisis por FBAT de la gravedad de los síntomas negativos (aplanamiento afectivo, alogia, avoliación, anhedonia y atención) así como la calificación total de los síntomas mediadas con la escala SANS para cada una de las tres regiones de los genes *MAOA* y *MAOB*.

Tabla 10. Análisis cuantitativo por FBAT de los síntomas positivos.

Síntomas Positivos		Fam	S-E(S)	Var(S)	Z	p
Alucinaciones	uVNTR	1 22	16.19	59.0	2.1	0.035
		3 22	-16.19	59.0	-2.1	0.035
	C1460T	C 23	-8.37	53.2	-1.1	0.251
		T 23	8.37	53.2	1.1	0.251
	A644G	A 20	-5.86	27.8	-1.1	0.266
		G 20	5.86	27.8	1.1	0.266
Delirios	uVNTR	1 26	9.05	35.9	1.5	0.131
		3 26	-9.05	35.9	-1.5	0.131
	C1460T	C 28	-5.32	46.3	-0.8	0.434
		T 28	5.32	46.3	0.8	0.434
	A644G	A 23	-6.85	22.9	-1.4	0.152
		G 23	6.85	22.9	1.4	0.152
Conducta Bizarra	uVNTR	1 24	7.30	17.2	1.8	0.078
		3 24	-7.30	17.2	-1.8	0.078
	C1460T	C 26	-5.65	17.1	-1.4	0.172
		T 26	5.65	17.1	1.4	0.172
	A644G	A 22	-1.95	13.8	0.52	0.600
		G 22	1.95	13.8	-0.52	0.600
T. Formal Pensam.	uVNTR	1 24	4.08	32.3	0.7	0.473
		3 24	-4.08	32.3	-0.7	0.473
	C1460T	C 25	0.42	35.4	0.1	0.943
		T 25	-0.42	35.4	-0.1	0.943
	A644G	A 22	-1.80	19.7	-0.4	0.685
		G 22	1.80	19.7	0.4	0.685
SAPS Total	uVNTR	1 26	34.84	424.1	1.7	0.090
		3 26	-34.84	424.1	-1.7	0.090
	C1460T	C 28	-17.12	501.8	-0.8	0.444
		T 28	17.12	501.8	0.8	0.444
	A644G	A 23	-12.29	245.6	-0.8	0.432
		G 23	12.29	245.6	0.8	0.432

Corrección de Bonferroni: $p \leq 0.016$

Tabla 11. Análisis cuantitativo por FBAT de los síntomas negativos.

Síntomas Negativos		Fam	S-E(S)	Var(S)	Z	p
Aplanamiento afectivo	uVNTR	1 25	-3.89	23.5	-0.8	0.422
		3 25	3.89	23.5	0.8	0.422
	C1460T	C 27	5.71	27.0	1.1	0.271
		T 27	-5.71	27.0	-1.1	0.271
	A644G	A 22	-3.58	19.3	-0.8	0.415
		G 22	3.58	19.3	0.8	0.415
Alogia	uVNTR	1 25	-3.55	36.1	-0.6	0.553
		3 25	3.56	36.1	0.6	0.553
	C1460T	C 27	3.21	34.0	0.5	0.582
		T 27	-3.21	34.0	-0.5	0.582
	A644G	A 22	-0.90	30.5	-0.2	0.870
		G 22	0.90	30.5	0.2	0.870
Avolición	uVNTR	1 25	-4.43	21.6	-0.9	0.341
		3 25	4.43	21.6	0.9	0.341
	C1460T	C 27	6.82	28.5	1.3	0.201
		T 27	-6.82	28.5	-1.3	0.201
	A644G	A 22	-4.23	22.2	-0.9	0.370
		G 22	4.23	22.2	0.9	0.370
Anhedonia	uVNTR	1 25	-3.74	28.1	-0.7	0.480
		3 25	3.74	28.1	0.7	0.480
	C1460T	C 27	1.19	30.2	0.2	0.828
		T 27	-1.19	30.2	-0.2	0.828
	A644G	A 22	-3.27	19.4	-0.7	0.458
		G 22	3.27	19.4	0.7	0.458
Alteraciones en atención	uVNTR	1 25	-2.97	65.3	-0.4	0.712
		3 25	2.97	65.3	0.4	0.712
	C1460T	C 27	3.13	48.4	0.4	0.652
		T 27	-3.13	48.4	-0.4	0.652
	A644G	A 22	-7.53	89.0	-0.8	0.424
		G 22	7.53	89.0	0.8	0.424
SANS total	uVNTR	1 25	-13.97	497.3	-0.6	0.530
		3 25	13.97	497.3	0.6	0.530
	C1460T	C 27	15.53	622.1	0.6	0.533
		T 27	-15.53	622.1	-0.6	0.533
	A644G	A 22	-13.54	451.5	-0.6	0.524
		G 22	13.54	451.5	0.6	0.524

Corrección de Bonferroni: $p \leq 0.016$

8.3.5 Análisis de la transmisión de haplotipos asociados a las características clínicas.

Se ha sugerido que el análisis de haplotipos puede ayudar a la identificación de los loci involucrados en el desarrollo de una enfermedad (Shaid, 2004), de tal manera, se asume que las mutaciones surgen en el cromosoma fundador, por lo que un haplotipo podría estar fuertemente asociado con la enfermedad y ser transmitido de una generación a otra. Este tipo de estrategia resulta ser más informativo que el uso de un simple marcador y más aún si el haplotipo se encuentra formado por regiones candidatas para el desarrollo del trastorno.

En la tabla 12 se muestran el análisis de desequilibrio de enlace entre los polimorfismos estudiados en donde se observa un moderado desequilibrio de enlace entre los marcadores C1460T y uVNTR, mientras que entre los otros marcadores no se observa desequilibrio de enlace (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis del LD (D') de los polimorfismos uVNTR, C1460T y A644G en las familias estudiadas.

Marcadores	LD (D')
C1460T/uVNTR	-0.162 (0.72)
A644G/uVNTR	0.031 (0.23)
A644G/C1460T	-0.011 (0.08)

MAO-A: uVNTR, C1460T

MAO-B: SNP13

LD (linkage disequilibrium) calculado con el comando "hapfreq" del programa FBAT.

El análisis de la transmisión de haplotipos por FBAT no mostró asociación estadísticamente significativa con los síntomas positivos y negativos. El programa FBAT solo analiza los haplotipos mas frecuentes en la muestra analizada y son los que se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis cuantitativo por FBAT entre haplotipos uVNTR/C1460T del gen MAOA y la gravedad de los síntomas positivo y negativos.

Síntomas psicóticos	Haplotipo	Fam	S-E(S)	Var(S)	Z	p ^a
Alucinaciones	3C	20	-6.67	25.73	-1.31	0.189
	1T	14	4.67	19.23	1.06	0.287
Delirios	3C	17	-4.26	20.44	-0.94	0.346
	1T	13	3.76	17.69	0.89	0.371
Conducta bizarra	3C	10	0.54	6.73	0.21	0.836
Trastorno formal del pensamiento	3C	18	-7.15	11.93	-2.07	0.038
	1T	13	4.15	8.43	1.43	0.153
SAPS total	3C	19	-19.83	260.97	-1.23	0.219
	1T	14	14.33	206.22	0.99	0.318
Aplanamiento afectivo	3C	19	6.92	15.01	1.78	0.074
	1T	13	-6.92	8.45	-2.38	0.017
Alogia	3C	19	4.81	18.53	1.12	0.263
	1T	13	-4.81	12.03	-1.39	0.165
Avoliación	3C	19	7.27	21.85	1.55	0.120
	1T	13	-4.67	15.35	-1.19	0.233
Anhedonia	3C	20	5.23	17.58	1.25	0.212
	1T	14	-5.43	12.08	-1.56	0.118
Alteraciones atención	3C	20	0.93	19.44	0.21	0.833
	1T	14	-2.03	11.72	-0.59	0.553
SANS total	3C	20	24.26	340.67	1.31	0.188
	1T	14	-22.96	230.01	-1.51	0.130

Corrección por Bonferroni a $p \leq 0.016$

8.4 Estudio de casos y controles.

8.4.1 Análisis cuantitativo entre los polimorfismos de MAOA y MAOB y los síntomas psicóticos en pacientes con esquizofrenia.

Se llevó a cabo un análisis cuantitativo entre la presencia de cada polimorfismo y las calificaciones de los diferentes síntomas positivos (alucinaciones, delirios, conducta bizarra y trastorno formal del pensamiento) y negativos (aplanamiento afectivo, alogia, avolición, anhedonia y alteraciones en la atención). Los resultados del análisis de MANOVA de los polimorfismos de MAOA y MAOB no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los síntomas positivos. Sin embargo, el análisis de los síntomas negativos mostró que las mujeres con el genotipo 33 del polimorfismo uVNTR de MAOA presentaban una mayor gravedad del síntomas negativo denominado aplanamiento afectivo, comparado con las pacientes portadoras de los genotipos 11 y 13 ($F=4.24$, $p=0.016$) (Tabla 14). Del mismo modo, la mujeres con genotipo GG del polimorfismo A644G de MAOB presentaron también una mayor gravedad del síntoma negativo de aplanamiento afectivo comparado con las pacientes con genotipo AA y AG ($F=4.85$, $p=0.009$) (Tabla 14).

Tabla 14. Efecto de los genes MAO en los síntomas negativos en las mujeres con esquizofrenia.

Síntomas negativos	Genotipos			F	p
MAOA/uVNTR	11	13	33		
Aplanamiento afectivo	1.75±1.1*	1.96±1.2	2.47±1.1	4.24	0.016
Alogia	1.39±1.5	1.58±1.2	2.06±1.2	3.08	0.049
Avoliación	2.04±1.3	2.16±1.2	2.35±1.3	0.64	0.528
Anhedonia	2.07±1.3	2.07±1.2	2.63±1.3	3.08	0.049
Alteraciones en la atención	1.54±1.3	1.56±1.2	1.96±1.3	1.60	0.206
SANS total	8.79±5.4	9.33±5.2	11.47±5.1	3.26	0.042
MAOB/A644G	AA	AG	GG		
Aplanamiento afectivo	2.13±1.1	1.85±1.1	2.87±1.4	4.85	0.009
Alogia	1.75±1.3	1.55±1.2	2.19±1.2	1.55	0.217
Avolition	2.25±1.2	1.96±1.2	2.81±1.4	2.98	0.054
Anhedonia	2.27±1.3	2.11±1.3	2.88±1.3	2.20	0.115
Alteraciones en la atención	1.60±1.3	1.75±1.4	2.00±1.1	0.68	0.506
SANS total	10.0±5.2	9.23±5.2	12.75±5.5	2.79	0.065

*Datos presentados como Promedio ± DS.
Corrección de Bonferroni: $p \leq 0.016$

Finalmente, se realizó un análisis para evaluar la posible existencia de un efecto de dosis del alelo 3 y alelo G sobre la gravedad del aplanamiento afectivo. Los genotipos del polimorfismo uVNTR se convirtieron en una variable cuantitativa que expresara el número de alelos 3, de tal manera que se calificó con 0=no presencia de alelo 3, 1=presencia de un alelo 3 y 2=presencia de dos alelos 3. Para el polimorfismo A644G, se llevó a cabo el mismo procedimiento, 0= no alelo G, 1= un alelo G y 2= dos alelos G. El análisis por regresión mostró solo asociación

estadísticamente significativa para el polimorfismo uVNTR ($F=8.005$, $R^2=0.056$, $p=0.005$).

8.4.2 *Análisis por haplotipos en las muestras de casos y controles.*

En la muestra de casos y controles se realizó el análisis del desequilibrio de enlace entre los marcadores utilizando el programa THESIAS (*Testing Haplotype Effects in Association Studies* (Tregouet, 2004).

La variante uVNTR del gen *MAOA* se encontró en moderado desequilibrio de enlace con C1460T del gen *MAOB* ($D'=0.61$), mientras que A644G y C1460T y A644G y uVNTR no estuvieron en desequilibrio de enlace, $D'=0.26$ y $D'=0.14$, respectivamente.

Al estimar el efecto por haplotipo de las diferentes combinaciones mediante el uso del programa THESIAS, el análisis mostró 4 diferentes combinaciones, las cuales se presentaron con una frecuencia mayor al 5% en la población mexicana (Tabla 15).

El análisis entre casos y controles mostró una mayor frecuencia del haplotipo 3C, tanto en pacientes con esquizofrenia como en los sujetos control, sin diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Tabla 15).

Tabla 15. Frecuencias de haplotipos del gen de la MAOA en pacientes con esquizofrenia y controles sanos utilizando el programa THESIAS.

Haplotipos		Frecuencias		OR	Valor
uVNTR	C1460T	Controles	Casos	(95% IC)	p
3	C	0.520	0.487	Referencia ^a	
3	T	0.091	0.120	1.45 (0.05-3.89)	0.458
1	C	0.126	0.062	0.46 (0.15-1.42)	0.179
1	T	0.262	0.329	1.46 (0.73-2.89)	0.282

Los resultados están expresados como la relación en OR con referencia al haplotipo mas frecuente con un 95% del intervalo de confianza (IC). ^a Haplotipo más frecuente.

9. DISCUSIÓN

En el estudio de la genética de la esquizofrenia se han reportado diversos estudios que apoyan la presencia de un gen localizado en el cromosoma X asociado al desarrollo de este trastorno (DeLisi et al., 1998).

Los hallazgos que reportan niveles bajos de la actividad de MAO plaquetaria en pacientes con esquizofrenia (DeLisi et al., 1982; Wyatt, 1973) y los estudios que muestran presencia de ligamiento genético en la región Xp11 (Dann et al., 1997; DeLisi et al., 1994), sitio en el cual se encuentran localizados los genes MAOA y MAOB, son evidencia suficiente que apoyan su estudio en la genética de la esquizofrenia.

En la literatura existen diversos estudios que reportan asociación entre los genes MAO y esquizofrenia; sin embargo, pocos han analizado familias tipo tríos y ninguno hasta la fecha ha analizado familias con múltiples afectados, de tal manera el presente estudio es el primero que utiliza los dos métodos de asociación, en familias con múltiples afectados y en casos-contróles.

El estudio de asociación en presencia de ligamiento en las familias no mostró la transmisión de un alelo particular para ninguna de los polimorfismos analizados, lo cual podría ser debido a la gran heterogeneidad clínica de la muestra. Por lo anterior, se propuso analizar las siguientes características clínicas: género, edad de inicio del trastorno, subtipos de esquizofrenia, los síntomas positivos (alucinaciones, delirios, conducta bizarra y trastorno formal del pensamiento) y los síntomas negativos (aplanamiento afectivo, alogia, anhedonia,

avolición y alteraciones en la atención), no encontrando asociación con ninguno de los polimorfismos analizados. El uso de metodologías como el FBAT tiene la limitante de que si no se tiene una muestra suficientemente grande, se pierda poder estadístico debido a que solo son considerados los padres informativos.

El estudio de casos y controles de polimorfismos del gen *MAOA* en población mexicana no mostró asociación con esquizofrenia, de acuerdo a lo reportado por otros grupos de investigación (Alvarez et al., 2010; Fan et al., 2004; Norton et al., 2002; Sygailo et al., 2001). Coron et al. (1996) reportó asociación entre pacientes con esquizofrenia paranoide y el alelo C1460, dato que no pudo ser replicado en nuestra muestra, en la que la mayoría de nuestros pacientes presentaban este subtipo de esquizofrenia. De tal manera, es posible que el resultado reportado por Corón et al. (1996) sea un falso positivo, producto de su tamaño de muestra. Del mismo modo, Sun et al. (2012) analizó 41 SNPs, reportando sólo asociación con haplotipos conformados por los polimorfismos uVNTR, G941T y C1460T, en mujeres con esquizofrenia paranoide. Este es el primer estudio que analiza otros SNPs, además de los que comúnmente son estudiados.

Con respecto al análisis del gen *MAOB*, en nuestra muestra no se encontró asociación con esquizofrenia, en concordancia a lo reportado previamente por algunos grupos (Alvarez et al., 2009; Coron et al., 1996; Zammit et al., 2004; Bergen et al., 2009). Del mismo modo, no encontramos diferencias al analizar el género. Sin embargo, otros estudios reportaron diferencias asociadas a la

portación del alelo G644 en mujeres (Gassó et al., 2008; Wei et al., 2011) y un reporte en hombres con esquizofrenia (Wei y Hemmings, 1998).

En población mexicana se observó desequilibrio de enlace moderado entre las dos regiones del gen *MAOA*; sin embargo, ninguna de los dos polimorfismos mostró enlace genético con el A644G de *MAOB*.

El análisis de la transmisión de haplotipos que resulta de la combinación de los polimorfismos uVNTR y C1460T del gen *MAOA* no mostró diferencias estadísticamente significativas para las familias con esquizofrenia. De manera interesante, se ha reportado que los haplotipos formados por uVNTR y A644G, localizados, el primero en la región promotora del gen de la *MAOA* y el segundo en el intrón 13 del gen *MAOB*, se relacionó con diferencias en la actividad enzimática de la *MAOA* en cerebro humano. Sin embargo, la falta de desequilibrio de enlace entre estos dos polimorfismos en población mexicana no permitió el análisis de este interesante hallazgo. Por lo anterior, nuestros datos están en la misma línea que apoya el hecho de que *MAOA* y *MAOB* están sujetas a una reciente selección positiva (Carrera et al., 2009).

La esquizofrenia es un fenotipo heterogéneo, por lo que se ha sugerido que el análisis de fenotipos alternativos, como los síntomas positivos (alucinaciones, delirios, conducta bizarra y trastorno formal del pensamiento) y negativos (aplanamiento afectivo, alogia, anhedonia, avolición y alteraciones en la atención) podría ayudar a tener grupos mas homogéneos (DeRosse et al., 2008). Se ha sugerido que genes que participan en la etiología de la esquizofrenia podrían

también participar en la forma en que se manifiesta el trastorno, como “genes modificadores” (Fanous y Kendler, 2005). Del mismo modo, también se ha sugerido que existan genes que no participan directamente en su desarrollo, pero podrían tener un efecto sobre la expresión de los síntomas, una vez que la enfermedad ya se encuentra establecida (Fanous y Kendler, 2005). Por lo que el uso de rasgos cuantitativos pudiera incrementar el poder estadístico para detectar asociación con genes candidatos que permitan ayudar a clasificar desde un punto molecular, los diferentes subtipos de la esquizofrenia. Por lo anterior, se llevó a cabo el análisis cuantitativo de los síntomas positivos y negativos en la muestra total de pacientes con esquizofrenia. El análisis de los diferentes síntomas positivos no mostró asociación con los genes *MAOA* y *MAOB*, apoyando a los estudios genéticos que no encuentran asociación, como en el caso del gen *DISC* y la gravedad de los delirios en pacientes con esquizofrenia (DeRosse et al., 2007; Hennah et al., 2003). Sin embargo, el análisis de variantes en los genes *DRD4* y *SLC6A4* mostró asociación con los síntomas positivos (Malhotra et al., 1998; Serretti et al., 2001).

En estudios en familias se ha reportado que los pacientes con esquizofrenia que presentan un predominio de síntomas negativos tienen una mayor carga genética (Arajarvi et al., 2006; Cardno et al., 2002; Wickham et al., 2001). Interesantemente, el análisis en nuestra muestra de los síntomas negativos mostró asociación con los genes *MAOA* y *MAOB*. Con respecto al análisis del gen *MAOB*, se han reportado diversos estudios que sugieren su participación en el desarrollo de la esquizofrenia (Dann et al., 1997; Wei et al., 1999; Carrera et al., 2009).

El análisis en nuestra muestra, mostró que la portación del número de copias del alelo 3 de *MAOA* y el alelo G de *MAOB* se relacionaba con la gravedad del aplanamiento afectivo, por lo que un efecto de dosis podría estar relacionado con variantes de los genes *MAO* en las mujeres con esquizofrenia. Sin embargo, el efecto de dosis solo se comprobó relacionado con el alelo 3 de *MAOA*, por lo que es posible que los hombres, en su calidad de hemicígotos, pudiera actuar como un factor de protección para una menor gravedad del aplanamiento afectivo, por lo que será necesario que este dato sea replicado por otros grupos para poder tener una conclusión definitiva. Recientemente, fue identificado un nuevo polimorfismo de tipo VNTR (denominado VNTR P2), localizado muy cerca del tan estudiado uVNTR descrito por Sabol et al., (1998), el cual mostró niveles de metilación diferenciales en DNA de linfoblastos derivado de mujeres (Phillibert et al., 2011). La región VNTR P2 presenta residuos de CpG en las secuencias A y B, y tomando en cuenta que la metilación del DNA en las islas CpG se relacionan con una reducción de la transcripción, resulta importante saber la forma en que se lleva a cabo la interacción entre los factores de transcripción que se unen en estas secuencias y como la metilación afecta la transcripción del RNAm de *MAOA*. Del mismo modo, resulta importante que se realicen estudios de metilación en regiones del cerebro que expresan *MAOA*, ya que como se sabe, el grado de metilación varía dependiendo del tejido (Phillibert et al., 2011). Lo anterior resulta importante en el estudio de los trastornos mentales, por lo que en un futuro será importante analizar este polimorfismo en relación a la esquizofrenia.

Además, nuestros hallazgos apoyan los reportes por otros grupos de investigación que postulan la dosis de las variantes de los genes de enzimas que participan en el metabolismo de los neurotransmisores se encuentran relacionados con los síntomas negativos en pacientes con esquizofrenia (Fanous et al., 2004). Bergen et al (2009) analizando una región de microsatelites en el gen *MAOB* no encontró asociación con los síntomas negativos. Por el contrario, el análisis de otros genes como el *DRD2*, *DRD4*, *BDNF*, *MTHFR* y *COMT*, mostró asociación con los síntomas negativos (Serreti et al., 2000; Fanous et al., 2004; Pelayo-Terán et al., 2011; Roffman et al., 2008). En resumen, nuestro estudio apoya la hipótesis sobre la existencia de genes relacionados con la presentación sintomatológica del trastorno, una vez que la enfermedad ya se encuentra establecida (Fanous y Kendler, 2005).

Algunos estudios han sugerido un metabolismo diferencial de dopamina por las enzimas *MAOA* y *MAOB* en diversas regiones cerebrales. En particular, se ha reportado un incremento de la tasa metabólica de *MAOA/MAOB* asociado con anomalías estructurales en regiones del cerebro relacionadas con los síntomas negativos en pacientes con esquizofrenia. Estudios clínicos han reportado una actividad enzimática alta en plaquetas que se asocia con los síntomas negativos en pacientes hombres con esquizofrenia.

El polimorfismo A644G ha mostrado asociación con niveles diferenciales de actividad enzimática (Costa-Mallen et al., 2005; Garpenstrand et al., 2000). El análisis por género en nuestra muestra, mostró que las mujeres portadoras del genotipo GG del polimorfismo A644G de *MAOB*, presentaba una mayor gravedad del aplanamiento afectivo. En pacientes con Parkinson también se han reportado

diferencias asociadas al género y al alelo G (Kelada et al., 2002). De tal manera, que es posible que las variantes del gen *MAOB* pudieran estar relacionadas a una mayor gravedad de los síntomas negativos en un subtipo de esquizofrenia relacionada con el género.

Por los hallazgos encontrados podríamos sugerir que los genes de *MAO* están involucrados en vías de neurotransmisores que se asocian a la gravedad de la sintomatología. Resulta interesante mencionar que el aplanamiento afectivo es independiente del tratamiento farmacológico y persiste por muchos años (Herbener y Harrow, 2001; Kelley et al., 1999), por lo que resulta un fenotipo alternativo muy constante que bien puede ser clasificado como subtipo de la esquizofrenia para la búsqueda de genes candidatos. Aunque solo se analizó dos polimorfismos de *MAOA* y otro en la *MAOB*, será interesante en un futuro identificar otros SNPs en los dos genes para poder tener una conclusión definitiva sobre el posible papel de la *MAO*, como genes modificadores de la sintomatología psicótica en pacientes mujeres con esquizofrenia. Además, resulta importante analizar el papel del factor de transcripción *SRY* sobre la regulación transcripcional de *MAOA*, lo que podría sugerir un nuevo mecanismo molecular en el dimorfismo sexual observado en la iniciación/progresión de diversos trastornos psiquiátricos asociados con una disfunción de *MAO*.

Conclusiones:

- 1) Los genes de *MAOA* y *MAOB* no se encuentran relacionados en la etiología de la esquizofrenia.
- 2) Los genes *MAOA* y *MAOB* participan como genes moduladores de los síntomas negativos.
- 3) La gravedad del aplanamiento afectivo se encuentra asociado con polimorfismos de *MAOA* y *MAOB* en mujeres con esquizofrenia.
- 4) Se observa un efecto de dosis relacionado entre la portación del número de alelos 3 del polimorfismo uVNTR de *MAOA* y una mayor gravedad del aplanamiento afectivo.
- 5) No se encontró asociación entre haplotipos de *MAOA* y la esquizofrenia.

La conclusión final es que nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que los síntomas negativos tienen una mayor carga genética, de tal manera que los datos obtenidos en el presente estudio parecen indicar que variantes genéticas de los genes *MAOA* y *MAOB* se encuentra asociado con una mayor gravedad del síntoma negativo de aplanamiento afectivo en pacientes mexicanos con esquizofrenia. De tal manera, los hallazgos en el presente trabajo indican que los genes de *MAO* se encuentran relacionados con la presentación sintomatológica de la esquizofrenia, como “genes moduladores” de la gravedad de los síntomas negativos en pacientes mujeres mexicanas con esquizofrenia.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, et al. (2002). Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci* 22:3708–3719.

Alvarez S, Mas S, Gassó P, Bernardo M, Parellada E, Lafuente A (2010). Lack of association between schizophrenia and polymorphisms in dopamine metabolism and transport genes. *Fundam Clin Pharmacol*, 24:741-7.

American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. Washington DC: American Psychiatric Association.

Amiri A, Noorbala AA, Nejatisafa AA, Ghoreishi A, Derakhshan MK, Khodaie-Ardakani MR, Hajiazim M, Raznahan M, Akhondzadeh S (2008). Efficacy of selegiline add on therapy to risperidone in the treatment of the negative symptoms of schizophrenia: a double-blind randomized placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol*, 23:79-86.

Andreasen N (1983). The Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS). Iowa City, IA., University of Iowa.

Andreasen N (1983). The Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS). Iowa City, IA, University of Iowa.

Andreasen NC, Olsen S. (1982). Negative versus positive schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 4: 464-74.

Andrés AM, Soldevila M, Navarro A, Kidd KK, Oliva B, Bertranpetit J (2004). Positive selection in MAOA gene is human exclusive: determination of the putative amino acid change selected in the human lineage. *Hum Genet* 115(5):377-86.

Angrist BM, Gershon S (1970). The phenomenology of experimentally induced amphetamine psychosis- preliminary observations. *Biol Psychiatry* 2: 95-107.

Arajarvi R, Varilo T, Haukka J, Suvisaari J, Suokas J, Juvonen H, Muhonen M, Suominen K, Hintikka J, Schreck M, Tuulio-Henriksson A, Partonen T, Lonnqvist J (2006). Affective flattening and alogia associate with the familial form of schizophrenia. *Psychiatry Res* 2006, 141:161-72.

Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L, Pettersson U, Jazin E (2002). Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum Genet* 110:1-7.

Bergen SE, Fanous AH, Walsh D, Kendler KS (2009). Polymorphisms in SLC6A4, PAH, GABRB3, and MAOB and modification of psychotic disorder features. *Schizophr Res*, 109:94-7.

Berrettini WH, Vogel WH, Clouse R (1977). Platelet monoamine oxidase in chronic schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 134:805-7.

Black GCM, Chen ZY, Craig IW, Powell JF (1991). Dinucleotide repeat polymorphism at the MAOA locus. *Nucleic Acids Res* 19(3):689.

Breakefield XO, Edelstein SB (1980). Inherited levels of A and B types of monoamine oxidase activity. *Schizophr Bull* 6: 282-288.

Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pikar D (1997). Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2569-2574.

Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA (1993a). Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262:578-580.

Brunner HG, Nelen MR, Van Zandvoort P, Abeling NG, Van Gennip AH, Wolter EC, Kuiper MA, Roper HH, Oost BA van, et al (1993b). X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am J Hum Genet* 52: 1032-1039.

Cannon T, Kaprio J, Lonnqvist, Huttunen M, Koskenvuo M (1998). The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. *Arch Gen Psychiatry*. 55: 67-74.

Cardno AG, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, Ribchester TR, Davies NJ, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM (1999). Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry* 56:162-168.

Cardno AG, Thomas K, McGuffin P (2002). Clinical variables and genetic loading for schizophrenia: analysis of published Danish adoption study data. *Schizophr Bul.*, 28:393-9.

Carlsson A (1988). The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1: 179-186.

Carlsson A, Lindqvist M (1963). Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta*

Pharmacol Toxicol (Copenh). 1963; 20: 140-4.

Carrera N, Sanjuan J, Molto MD, Carracedo A, Costas J: Recent adaptive selection at MAOB and ancestral susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 2009, 150B: 369-374.

Coron B, Campion D, Thibaut F, Dollfus S, Preterre P, Langlois S, Vasse T, Moreau V, Martin C, Charbonnier F, Laurent C, Mallet J, Petit M, Frebourg T (1996). Association study between schizophrenia and monoamine oxidase A and B DNA polymorphisms. *Psychiatry Res* 62: 221-226.

Costa-Mallen P, Afsharinejad Z, Kelada SN, Costa LG, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth WT Jr, Viernes HM, Farin FM, Smith-Weller T, Checkoway H (2004). DNA sequence analysis of monoamine oxidase B gene coding and promoter regions in Parkinson's disease cases and unrelated controls. *Mov Disord* 19:76-83.

Costa-Mallen P, Kelada SN, Costa LG, Checkoway H. Characterization of the in vitro transcriptional activity of polymorphic alleles of the human monoamine oxidase-B gene (2005). *Neurosci Lett*. 383:171-175.

Dann J, DeLisi LE, Devoto M, Nancarrow DJ, Shields G, Smith A, Loftus J, Peterson P, Vita A, Comazzi M, Invernizzi G, Levinson DF, Wildenauer D, Mowry BJ, Collier D, Powell J, Crowe RR, Andreasen NC, Silverman JM, Mohs RC, Murray RM, Walters MK, Lennon DP, Crow TJ, et al. (1997). A linkage study of schizophrenia to markers within Xp11 near the MAOB gene. *Psychiatry Res* 70:131-143.

De Colibus L, Li M, Binda C, Lustig A, Edmondson DE, Mattevi A (2005). Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(36):12684-9.

DeLisi DE, Crow TJ: Evidence for a sex chromosome locus for schizophrenia. *Schizophr Bull* 1989, 15:431-40.

DeLisi LE, Dauphinais LD, Huaser P (1989). Gender differences in the brain: are they relevant to the pathogenesis of schizophrenia? *Comprehensive Psychiatry* 30: 197-208.

DeLisi LE, Devoto M, Lofthouse R, Poulter M, Smith A, Shields G, Bass N, Chen G, Vita A, Morganti C, et al. (1994). Search for linkage to schizophrenia on the X and Y chromosomes. *Am J Med Genet* 54: 113-121.

DeLisi LE, Goldin LR, Maxwell ME, Kazuba DM, Gershon ES (1987). Clinical features of illness in siblings with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 44: 891-896.

DeLisi LE, Goodman S, Neckers LM, Wyatt RJ (1982). An analysis of lymphocyte subpopulations in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 17: 1003-1009.

DeLisi LE, Shaw SH, Crow TJ, Shields G, Smith AB, Larach VW, Wellman N, Loftus J, Nanthakumar B, Razi K, Stewart J, Comazzi M, Vita A, Heffner T, Sherrington R (2002). A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry*. 159(5):803-12.

DeRosse P, Hodgkinson CA, Lencz T, Burdick KE, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK (2007). Disrupted in schizophrenia 1 genotype and positive symptoms in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 61:1208-10.

DeRosse P, Lencz T, Burdick KE, Siris SG, Kane JM, Malhotra AK (2008). The genetics of symptom-based phenotypes: toward a molecular classification of schizophrenia. *Schizophrenia Bull* 34(6): 1047-53.

Devor EJ, Cloninger CR, Kwan SW, Abell CW (1993). A genetic familial study of monoamine oxidase B activity and concentration in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 263-267.

Duncan CT (2004). *Statistical methods in Genetic Epidemiology*. Oxford University Press. New York, New York.

Escamilla M (2002). Rationale and reliability of the Spanish version of the Diagnostic Interview for Genetics Studies (DIGS). The University of Texas, San Antonio.

Fallin MD, Lasseter VK, Liu Y, Avramopoulos D, McGrath J, Wolyniec PS, Nestadt G, Liang KY, Chen PL, Valle D, Pulver AE (2011). Linkage and association on 8p21.2-p21.1 in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011 Mar;156(2):188-97. doi:10.1002/ajmg.b.31154. Epub 2010 Dec 28.

Fan JB, Yang MS, Tang JX, He L, Xing YL, Shi JG, Zhao SM, Zhu SM, Ji LP, Gu NF, Feng GY, St Clair D: Family-based association study of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism and schizophrenia. *Schizophr Res* 2004, 67:107-9.

Fanous AH, Kendler KS: Genetic heterogeneity, modifier genes, and quantitative phenotypes in psychiatric illness: searching for a framework. *Mol Psychiatry* 2005, 10:6-13.

Fanous AH, Neale MC, Straub RE, Webb BT, O'Neill AF, Walsh D, Kendler KS: Clinical features of psychotic disorders and polymorphisms in HT2A, DRD2, DRD4, SLC6A3 (DAT1), and BDNF: a family based association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004, 125B:69-78.

Farmer AE, McGuffin P, Gottesman II (1987). Twin concordance for DSM-III schizophrenia: scrutinizing the validity of the definition. *Arch Gen Psychiatry* 44: 634-641.

Frankle WG, Laruelle M (2002). Neuroreceptor imaging in psychiatric disorders. *Ann Nucl Med* 16: 437–446.

Fresan A, Camarena B, Apiquian R, Aguilar A, Urraca N, Nicolini H: Association study of MAO-A and DRD4 genes in schizophrenic patients with aggressive behavior. *Neuropsychobiology* 2007, 55:171-5.

Fowler CJ, Carlsson A, Winblad B: Monoamine oxidase-A and -B activities in the brain stem of schizophrenics and non-schizophrenic psychotics. *J Neural Transm* 1981, 52: 23-32.

Garpenstrand H, Ekblom J, Forslund K, Rylander G, Orelund L: Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype. *J Neural Transm* 2000, 107:523-30.

Geha RM, Chen K, Wouters J, Ooms F, Shih JC (2002). Analysis of conserved active site residues in monoamine oxidase A and B and their three-dimensional molecular modeling. *J Biol Chem* 277(19):17209-16.

Girmen AS, Baenziger J, Hotamisligil GS, Konradi C, Shalish C, Sullivan JL, Breakefield XO (1992). Relationship between platelet monoamine oxidase B activity and alleles at the MAOB locus. *J Neurochem* 59: 2063-2066.

Gottesman II (1991). Schizophrenia genesis- the origins of madness, 3rd. Ed. New York: Freeman. P.79-81.

Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC (1991). Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3637-3641.

Hinds HL, Hendriks RW, Craig IW, Chen ZY (1992). Characterization of a highly polymorphic region near the first exon of the human MAOA gene containing a GT dinucleotide and a novel VNTR motif. *Genomics* 13:896-897.

Hennah W, Varilo T, Kestila M, Paunio T, Arajärvi R, Haukka J, Parker A, Martin R, Levitzky S, Partonen T, Meyer J, Lönngqvist 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, 12:3151-9.

Herbener ES, Harrow M: Longitudinal assessment of negative symptoms in schizophrenia/schizoaffective patients, other psychotic patients, and depressed patients. *Schizophr Bull* 2001, 27:527-37.

Hotamisligil GS, Breakefield XO (1991). Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet* 49:383-392.

Howes OD, Kapur S: The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009, **35**:549-62.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 78(5):815-26.

Kapur S (2003). Psychosis as a state of aberrant salience: a frame work linking biology, phenomenology and pharmacology in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160: 13-23.

Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S (2000). Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first- episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157: 514–520.

Karlsson P, Farde L, Halldin C, Sedvall G (2002). PET study of D(1) dopamine receptor binding in neuroleptic-naive patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159: 761–767.

Kelada SN, Costa-Mallen P, Costa LG, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth WTJr, Checkoway H: Gender difference in the interaction of smoking and monoamine oxidase B intron 13 genotype in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002, 23:515-9.

Kelley ME, van Kammen DP, Allen DN: Empirical validation of primary negative symptoms: independence from effects of medication and psychosis. *Am J Psychiatry* 1999, 156: 406-11.

Kendler KS. Overview : current perspective on twin studies of schizophrenia (1983). *Am J Psychiatry* 140: 1413-1425.

Kendler KS, MacLean CJ, O'Neill FA, Burke J, Murphy B, Duke F, Shinkwin R, Easter SM, Webb BT, Zhang J, Walsh D, Straub RE (1996). Evidence for a schizophrenia vulnerability locus on chromosome 8p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *Am J Psychiatry* 153:1534-1540.

Kendler KS, Myers JM, O'Neill FA, Martin R, Murphy B, MacLean CJ, Walsh D, Straub RE (2000). Clinical features of schizophrenia and linkage to chromosomes 5q, 6p, 8p, and 10p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *Am J Psychiatry* 157(3): 402-8.

Kety SS, Rosenthal D, Wender PH (1968). The types and prevalence of mental illness in the biological and adoptive families of adopted schizophrenics. *J psychiat Res* 1: 345-362.

Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK (1994). Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry* 51: 442-455.

Kringlen E (1968). *Heredity and environment in the functional psychoses: an epidemiological-clinical twin study*. London: Heinemann.

Konradi C, Ozelius L, Breakefield XO (1992). Highly polymorphic (GT)_n repeat sequence in intron II of the human MAOB gene. *Genomics* 12:176-177.

Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schawankhaus JD (1993). Association of monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 33: 368-372.

Lan NC, Chen CH, Shih JC (1989). Expression of functional human monoamine oxidase A and B cDNAs in mammalian cells. *J Neurochem* 52: 1652-1654.

Lewine TJ, Meltzer HY: Negative symptoms and platelet monoamine oxidase activity in male schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 1984, 12: 99-109.

Lewine R (1985). Schizophrenia: an amotivational syndrome in men. *Canadian J Psychiat* 30: 316-318.

Lewine RRJ (1988). Gender and schizophrenia: In: Tsuang MT, Simpson JC, eds. *Nosology, epidemiology and genetics of schizophrenia*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. Pp: 379-397.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, et al. (2003). Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 73: 34-48.

Li D, He L: Meta-study on association between the monoamine oxidase A gene (MAOA) and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008, 147B:174-8.

Lieberman JA, Kane JM, Alvir J (1987). Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;91(4):415-33.

Lin SH, Liu CM, Liu YL, Shen-Jang Fann C, Hsiao PC, Wu JY, Hung SI, Chen CH, Wu HM, Jou YS, Liu SK, Hwang TJ, Hsieh MH, Chang CC, Yang WC, Lin JJ, Chou

FH, Faraone SV, Tsuang MT, Hwu HG, Chen WJ (2009). Clustering by neurocognition for fine mapping of the schizophrenia susceptibility loci on chromosome 6p. *Genes Brain Behav* 8(8):785-94. Epub 2009 Jul 21.

Macciardi F, Provenza M, Bellodi L, Smeraldi E (1987). Genetic notes of schizophrenic disorders. In: Cazullo CL, Invernizzi G, Sacchetti E, Vita A, eds. *Ethiopathogenetic hypotheses of schizophrenia*. Lancaster: MTP Press, pp: 21-32.

Malhotra AK, Goldman D, Mazzanti C, Clifton A, Breier A, Pickar D: A functional serotonin transporter (5-HTT) polymorphism is associated with psychosis in neuroleptic-free schizophrenics. *Mol Psychiatry* 1998, 3:328-32.

Martin ER, Monks SA, Warren LL, Kaplan NL (2000). A test for linkage and association in general pedigrees: The Pedigree Disequilibrium Test. *Am J Hum Genet* 67: 146-154.

Matsumoto C, Shinkai T, Hori H, Ohmori O, Nakamura J (2004). Polymorphisms of dopamine degradation enzyme (COMT and MAO) genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Psychiat Res* 127: 1-7.

Matthysse S, Holzman PS, Lange K (1986). The genetic transmission of schizophrenia: application of Mendelian latent structure analysis to eye tracking dysfunctions in schizophrenia and affective disorder. *J Psychiatr Res* 20: 57-67.

Matthysse S, Holzman PS, Gusella JF, Levy DL, Harte CB, Jørgensen A, Møller L, Parnas J (2004). Linkage of eye movement dysfunction to chromosome 6p in schizophrenia: additional evidence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004 Jul 1;128B(1):30-6.

Maziade M, Raymond V, Cliche D, Fournier JP, Caron C, Garneau Y, Nicole L, Marcotte P, Couture C, Simard C, et al. (1995). Linkage results on 11Q21-22 in Eastern Quebec pedigrees densely affected by schizophrenia. *Am J Med Genet*. 60: 522-528.

Maziade M, Roy MA, Rouillard E, Bissonnette L, Fournier JP, Roy A, Garneau Y, Montgrain N, Potvin A, Cliche D, Dion C, Wallot H, Fournier A, Nicole L, Lavallée JC, Mérette C (2001). A search for specific and common susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a linkage study in 13 target chromosomes. *Mol Psychiatry* 6(6): 684-693.

McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J (2008). Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev*. 2008;30:67-76.

McGue M, Gottesman II, Rao DC (1983). The transmission of schizophrenia under a multifactorial threshold model. *Am J Hum Genet* 35: 1161-1178.

McGuffin P, Asherson P, Owen M, Farmer A (1994). The strenght of the genetic effect: is there room for enviromental influence in the etiology of schizophrenia? British J Psychiat 16: 593-599.

Meltzer HY, Stahl SM (1976). The dopamine hypothesis of schizophrenia:a review. Schizophr Bull 2: 19-76.

Moldin SO, Gottesman II (1997). Genes, experience, and chance in schizophrenia: positioning for the 21st century. Schizophrenia Bull 23: 547-561.

Ng MYM, Levinson DF, Suarez BK, DeLisi DE, Arinami T, Riley B, Paunio T, Pulver AE, Irmansyah, Holmans PA, Escamilla M, Wildenauer DB, Williams NM, Laurent C, Mowry BJ, Brzustowicz LM, Maziade M, Sklar P, Garver DL, Abecasis GR, Lerer B, Fallin MD, Gurling HM, Gejman PV, Lindholm E, Moises HW, Byerley W, Wijsman EM, Forabosco P, Tsuang MT, Hwu HG, Okazaki Y, Kendler KS, Wormley B, Fanous A, Walsh D, O'Neill FA, Peltonen L, Nestadt G, Lasseter VK, Liang KY, Papadimitriou GM, Dikeos DG, Schwab SG, Owen MJ, O'Donovan MC, Norton N, Hare E, Raventos H, Nicolini H, Albus M, Maier W, Nimgaonkar VL, Terenius L, Mallet J, Jay M, Godard S, Nertney D, Alexander M, Crowe RR, Silverman JM, Bassett AS, Roy MA, Mérette C, Pato CN, Pato MT, Roos JL, Kohn Y, Amann-Zalcenstein D, Kalsi G, McQuillin A, Curtis D, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Sanders AR, Duan J, Jazin E, Myles-Worsley M, Karayiorgou M, Lewis CM: Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. Mol Psychiatry 2009, 14:774-85.

Nicolini H (1999). Métodos de investigación en genética psiquiátrica. En: *Bases genéticas de la mente*. Ed. Publicaciones del Instituto Mexicano de Psiquiatría. México, D.F. Pags: 27-46.

Norton N, Kirov G, Zammit S, Jones G, Jones S, Owen R, Krawczak M, Williams NM, O'Donovan MC, Owen MJ: Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. Am J Med Genet 2002, 114:491-6.

Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, et al. (1997). Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. Nature 385: 634–636.

Onstad S, Skre I, Torgersen S, Kringlen E (1991). Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia. Acta Psychiatr Scand 83: 395-401.

Ou XM, Chen K, Shih JC (2004). Dual functions of transcription factors, transforming growth factor-beta- inducible early gene (TIEG)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidase (MAO) B gene. J Biol Chem 279(20): 21021–21028.

Ozelius L, Hsu YPP, Bruns G, Powell JF, Chen S, Weyler W, Utterback M, Zucher D, Trofatter JA, Conneally M, Gusella JF, Breakefield XO (1988). Human

monoamine oxidase gene (MAO A): chromosome position (Xp21-p11) and DNA polymorphism. *Genomics* 3:53-58.

Ozelius L, Gusella JF, Breakefield XO. (1989). MspI RFLP for human MAOA gene. *Nucleic Acids Res* 17(24): 10516.

Park N, Juo SH, Cheng R, Liu J, Loth JE, Lilliston B, Nee J, Grunn A, Kanyas K, Lerer B, Endicott J, Gilliam TC, Baron M (2004). Linkage analysis of psychosis in bipolar pedigrees suggests novel putative loci for bipolar disorder and shared susceptibility with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9(12):1091-9.

Paunio T, Ekelund J, Varilo T, Parker A, Hovatta I, Turunen JA, Rinard K, Foti A, Terwilliger JD, Juvonen H, Suvisaari J, Arajärvi R, Suokas J, Partonen T, Lönngqvist J, Meyer J, Peltonen L (2001). Genome-wide scan in a nationwide study sample of schizophrenia families in Finland reveals susceptibility loci on chromosomes 2q and 5q. *Hum Mol Genet* 10 (26): 3037-48.

Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias T, Vázquez-Bourgon J, Mata I, Carrasco-Marín E, Vázquez-Barquero JL, Crespo-Bacorro B: Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and negative symptoms after acute antipsychotic treatment in first-episode non-affective psychosis. *Psychiat Res* 2011, 185:286-9.

Penrose LS (1991). Survey of cases of familial mental illness. L. S. Penrose, July 1945. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 240: 315-324.

Philibert RA, Wernett P, Plume J, Packer H, Brody GH, Beach SR (2011). Gene environment interactions with a novel variable Monoamine Oxidase A transcriptional enhancer are associated with antisocial personality disorder. *Biol Psychol* 87(3): 366-71.

Prasad S, Semwal P, Deshpande S, Bhatia T, Nimgaonkar VL, Thelma BK (2002). Molecular genetics of schizophrenia: past, present and future. *J Biosci* 27(1 Suppl 1): 35-52.

Qiu HT, Meng HQ, Song C, Xiu MH, Chen DC, Zhu FY, Wu GY, Kosten TA, TR Kosten, Zhang XY: Association between monoamine oxidase (MAO)-A gene variants and schizophrenia in a Chinese population. *Brain Res* 2009, 1287:67-73.

Reed SC, Hartley C, Anderson VE, Phillips VP, Johnson NA (1973). *The psychoses family studies*. Philadelphia: Saunders.

Risch N (1990). Linkage strategies for genetically complex traits: I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* 46: 222-228.

Roffman JL, Weiss AP, Purcell S, Caffalette CA, Freudenreich O, Henderson DC, Bottiglieri T, Wong DH, Halsted CH, Goff DC: Contribution of

methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms to negative symptoms in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2008, 63:42-8.

Sabol SZ, Hu Stella, Hamer D (1998). A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 103: 273-279.

Salazar R, Escamilla MA, Mendoza R, Esparza E, Montero P, Ontiveros A, Nicolini H, Medina R, Saucedo E, Herrera C, Lizano A, Contreras S, Dassori A (2004) Use of the diagnostic interview for the genetic studies (DIGS) in an international genetics study of Latino subjects from the US, Mexico and Costa Rica: training and reliability issues. *Am J Med Genet* 130B: 131.

Schaid, D.J. (2004). Evaluating associations of haplotypes with traits. *Genetic Epidemiology* 27, 348–364.

Schulze TG, McMahon FJ (2002). Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. *Am J Med Genet* 114:1-11.

Seeman M (1982). Gender differences in schizophrenia. *Canadian J Psychiat* 27: 107-112.

Seeman P (1992). Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* 7: 261-284.

Seeman P, Schwarz J, Chen JF, et al (2006). Psychosis pathways converge via D2 high dopamine receptors. *Synapse* 60: 319–346.

Serretti A, Lattuada E, Lorenzi C, Lilli R, Smeraldi E: Dopamine receptor D2 Ser/Cys 311 variant is associated with delusion and disorganization symptomatology in major psychoses. *Mol Psychiatry* 2000, 5:270-274.

Serretti A, Lilli R, Lorenzi C, Lattuada E, Smeraldi E: DRD4 exon 3 variants associated with delusional symptomatology in major psychoses: a study on 2,011 affected subjects. *Am J Med Genet* 2001, 105:283-90.

Sherrington R, Brynjolfsson J, Petursson H, Potter M, Dudleston K, Barraclough B, Wasmuth J, Dobbs M, Gurling H (1988). Localization of a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 5. *Nature* 336: 164-167.

Shields J, Gottesman II. Obstetric complications and twin studies of schizophrenia: clarifications and affirmations. *Schizophr Bull* 1977;3:351–4

Shih JC, Chen K, Ridd MJ (1999). Monoamine oxidase: From genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 22: 197-217.

Shih JC, Wu JB, Chen K (2011). Transcriptional regulation and functions of MAO genes. *J Neural Trans* 118(7): 979-986.

Shields J, Gottesman II, Slater E (1967). Kallmann's 1946 schizophrenic twin study in the light of new information. *Acta Psychiatr Scand* 43: 385-396.

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506-516.

Stefan M (2002). An atlas for schizophrenia. The Parthenon Publishing Group. New York, New York,

Straub RE, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2002). Genome-wide scans of three independent sets of 90 Irish multiplex schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes. *Mol Psychiatry* 7: 542-559.

Suarez BK, Duan J, Sanders AR, Hinrichs AL, Jin CH, Hou C, Buccola NG, Hale N, Weill-Engerer S, Nertney DA, Olincy A, Green S, Schaffer AW, Smith CJ, Hannah DE, Rice JP, Cox NJ, Martinez M, Mowry BJ, Amin F, Silverman JM, Black DW, Byerley WF, Crowe RR, Freedman R, Cloninger CR, Levinson DF, Gejman PV (2006). Genomewide linkage scan of 409 European-ancestry and African American families with schizophrenia: suggestive evidence of linkage at 8p23.3-p21.2 and 11p13.1-q14.1 in the combined sample. *Am J Hum Genet* 78(2): 315-33.

Syagailo YV, Stober G, Grassle M, Reimer E, Knapp M, Jungkunz G, Okladnova O, Meyer J, Lesch KP: Association analysis of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism in psychiatric disorders. *Am J Med Genet* 2001, 105: 168-71.

Thorpe LW, Westlund KN, Kochersperger LM, Abell CW, Denney RM (1987). Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *J Histochem Cytochem* 35: 23-32.

Tivol EA, Shalish C, Schuback DE, Hsu YP, Breakefield XO (1996). Mutational analysis of the human MAOA gene. *Am J Med Genet* 67(1):92-97.

Tsuang MT, Faraone SV (1995). The case for heterogeneity in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Res* 17: 161-175.

Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, Gallo C, Poletti G, Mazzotti G, Hill K, Hurtado AM, Camarena B, Nicolini H, Klitz W, Barrantes R, Molina JA, Freimer

NB, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Dipierri JE, Alfaro EL, Bailliet G, Bianchi NO, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Ruiz-Linares A: Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 2008, 4 doi:10.1371/journal.pgen.1000037.

Wei J, Hemmings GP (1999). A study of linkage disequilibrium between polymorphic loci for monamine oxidases A and B in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 9: 177-181.

Wickham H, Walsh C, Asherson P, Taylor C, Sigmundson T, Gill M, Owen MJ, McGuffin P, Murray R, Sham P: Familiality of symptom dimensions in schizophrenia. *Schizophr Res* 2001, **47**: 223-32.

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87(1): 1-28.

Wu JB, Chen K, Li Y, Lau YF, Shih JC (2009). Regulation of monoamine oxidase A by the SRY gene on the Y chromosome. *FASEB J* 23(11): 4029-4038.

Wyatt RJ, Murphy DL, Belmaker R, Cohen S, Donnelly CH, Pollin (1973). Reduced monoamine oxidase activity in platelets: a possible genetic marker for vulnerability to schizophrenia. *Science* 179: 916-918.

Zammit S, Jones G, Jones S, Norton N, Sanders R, Milham C, McCarthy G, Jones L, Cardno AG, Gray M, Murphy KC, O'Donovan MC, Owen MJ (2004). Polymorphisms in the MAOA, MAOB and COMT genes and aggressive behavior in schizophrenia. *Am J Med Genet* 128B: 19-20.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 7 de mayo de 2013, en la Ciudad de México D.F. para optar al grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Beatriz Elena Camarena Medellin.

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez

Dra. Mavil López Casamichana

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dra. Ana Fresán Orellana

Dra. Rebeca Robles García
