

4 00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ESTUDIO DE VARIACION GENETICA DE LA MONOAMINO OXIDASA TIPO A (MAO-A) EN UN GRUPO DE PACIENTES CON TRASTORNO OBSESIVO COMPULSIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

QFB BEATRIZ ELENA CAMARENA MEDELLIN

DIRECTOR DE TESIS: DR. HUMBERTO NICOLINI SANCHEZ

MEXICO, D. F.,



ABRIL DEL 2002

COORDINACIÓN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de noviembre de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Camarena Medellín Beatriz Elena, con número de cuenta 99809865, y número de expediente 3991103, con la tesis titulada: "Estudio de variación genética del gen de la monoamino oxidasa tipo A (MAO-A) en el trastorno obsesivo compulsivo.", bajo la dirección de la Dr. Humberto Nicolini Sánchez.

Presidente:	Dr. Carlos Cruz Fuentes
Vocal:	Dra. Regina Montero Montoya
Secretario:	Dr. Humberto Nicolini Sánchez
Suplente:	Dr. Vicente Madrid Marina
Suplente:	Dr. Rafael Salin Pascual

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de abril de 2002

  
Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética Psiquiátrica del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, bajo la dirección del Dr. Humberto Nicolini Sánchez y la asesoría del comité tutorial conformado por el Dr. Carlos Cruz Fuentes y el Dr. Vicente Madrid Marina.**

**Esta tesis fue realizada con el apoyo financiero proporcionado por el CONACyT, proyecto No. 25665-M.**

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Nicolini el apoyo, las oportunidades y la confianza que me ha brindado para mi desarrollo profesional.

De la misma manera, agradezco el apoyo en la revisión y sugerencias a esta tesis por parte del Dr. Carlos Cruz y la Dra. Regina Montero M.

A la Lic. en Nutrición Ma. Asunción Medellín por su apoyo técnico en la parte de secuenciación.

Dedico esta tesis con mucho cariño a mis Padres y hermanos, por su apoyo incondicional.

## INDICE

	Página	
I	Introducción.	3
II	Antecedentes.	
	1. La enzima monoamino oxidasa (MAO).	6
	2. Localización de la MAO.	8
	3. Genes de la MAO.	9
	4. Organización de la región promotora de los genes de la MAO.	11
	5. Variantes moleculares descritas en el gen de la MAO-A.	12
	6. El papel de la enzima MAO en los trastornos psiquiátricos.	17
	7. Estudios moleculares del gen de la MAO-A en los trastornos psiquiátricos.	23
	8. El trastorno obsesivo compulsivo.	28
	9. Estudios moleculares en el TOC.	39
III	Diseño experimental.	
	1. Planteamiento del problema.	43
	2. Objetivo general.	44
	3. Objetivos específicos.	44
	4. Metodología:	
	a) Descripción de la muestra.	46
	b) Extracción del DNA.	47
	c) Análisis de los polimorfismos en el gen de la MAO-A.	47
	d) Análisis de la mutación de Brunner.	50
	e) Análisis por HRR (Riesgo Relativo por Haplotipo).	52
	f) Análisis de la estimación del desequilibrio de enlace ( $\Delta$ ).	54
IV	Resultados.	55
	1. Análisis del polimorfismo <i>EcoRV</i> .	57
	2. Análisis del polimorfismo <i>Fnu4HI</i> .	60
	3. Análisis del polimorfismo <i>uVNTR</i> .	62
	4. Análisis de la transmisión por haplotipos.	63
	5. Determinación del desequilibrio de enlace entre las regiones analizadas.	65
	6. Análisis de la mutación de Brunner.	66
V	Discusión.	70
VI	Conclusiones.	79
VII	Bibliografía.	80
VIII	Apéndice.	97

## INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Características de la monoamino oxidasa.	6
Tabla 2	Características de la MAO-A y MAO-B.	7
Tabla 3	Frecuencias de alelos reportadas en diferentes poblaciones.	16
Tabla 4	Características clínicas y demográficas de los pacientes TOC.	56
Tabla 5	Alelos transmitidos y no transmitidos del polimorfismo <i>EcoRV</i> en probandos hombres y mujeres mediante la estrategia de HRR.	58
Tabla 6	Transmisión de alelos entre géneros del polimorfismo <i>EcoRV</i> .	59
Tabla 7	Transmisión de alelos del polimorfismo <i>EcoRV</i> en probandos con y sin depresión.	60
Tabla 8	Alelos transmitidos y no transmitidos del polimorfismo <i>Fnu4HI</i> en probandos hombres y mujeres mediante la estrategia de HRR.	60
Tabla 9	Transmisión de alelos entre género del polimorfismo <i>Fnu4HI</i> .	60
Tabla 10	Transmisión alélica del polimorfismo <i>Fnu4HI</i> en pacientes severos vs no severos.	61
Tabla 11	Alelos transmitidos y no transmitidos del polimorfismo <i>uVNTR</i> en probandos hombres y mujeres mediante la estrategia de HRR.	62
Tabla 12	Transmisión de alelos entre géneros para el polimorfismo <i>uVNTR</i> .	62
Tabla 13	Transmisión de alelos para el polimorfismo <i>uVNTR</i> en Pacientes TOC con depresión.	63
Tabla 14	Análisis de la transmisión por haplotipo.	64

Tabla 15	Frecuencias de los haplotipos en los pacientes con TOC.	64
Tabla 16	Frecuencias de los haplotipos <i>EcoRV</i> uVNTR en los pacientes TOC con y sin depresión.	65
Tabla 17	Estimación del desequilibrio de enlace ( $\Delta$ ).	66
Tabla 18	Secuencia de bases de las dos regiones del exón 8 del gen de la MAO-A.	68
Tabla 19	Resumen de los resultados.	70



## INDICE DE FIGURAS

		Página.
Figura 1	Esquema de neurona dopaminérgica y serotoninérgica.	9
Figura 2	Cromosoma X.	10
Figura 3	Mapa de restricción de la región promotora del gen de la MAO-A.	11
Figura 4	Polimorfismo uVNTR del gen de la MAO-A.	
Figura 5	Exón 8 del gen de la MAO-A.	52
Figura 6	Análisis del método de Riesgo Relativo por Haplotipo (HRR).	53
Figura 7	Análisis del polimorfismo <i>EcoRV</i> .	58
Figura 8	Análisis del polimorfismo <i>Fnu4HI</i> .	61
Figura 9	Análisis del polimorfismo uVNTR.	63
Figura 10	Análisis por SSCP de la mutación de Brunner.	67
Figura 11	Identificación de la mutación de Brunner mediante secuenciación automática del exón 8.	69

## RESUMEN

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es un trastorno de ansiedad que se caracteriza por la presencia de ideas, imágenes, impulsos o pensamientos no deseados que se experimentan como intrusivos, son reconocidos como absurdos y sin sentido y aparecen de una manera repetitiva (obsesiones), las cuales frecuentemente se acompañan de conductas que se ejecutan también de manera repetitiva, ritualista y estereotipada, que son percibidas como innecesarias y generalmente se realizan en respuesta a una obsesión (compulsiones).

El TOC ha sido establecido por la OMS como la cuarta enfermedad mental más común en los países desarrollados y subdesarrollados. En el campo de la psiquiatría biológica existe un gran interés en encontrar marcadores biológicos que puedan identificar individuos susceptibles a desarrollar algún trastorno psiquiátrico.

Estudios de familias, de gemelos y de adopción apoyan la presencia de factores genéticos en el desarrollo del TOC.

Diversos estudios han reportado asociación positiva con genes de enzimas y receptores de dos sistemas de neurotransmisores (serotoninérgico y dopaminérgico) involucrados en el desarrollo del TOC. Estudios moleculares han mostrado diferencias en los niveles de la actividad enzimática de la monoamino oxidasa tipo A (MAO-A) en el TOC. De esta forma, se analizaron tres regiones polimórficas y una mutación puntual, localizadas en el gen de la MAO-A en familias tipo tríos (probando, padre y madre) utilizando el método de asociación de riesgo relativo por haplotipo (HRR).

El análisis del polimorfismo *EcoRV* mostró una mayor transmisión del alelo 1, asociado con niveles bajos de actividad enzimática, en mujeres TOC comparado con los hombres. El análisis del subgrupo de probandos caracterizados por presentar comorbilidad con depresión, mostraron también una transmisión preferencial del alelo 1 del polimorfismo *EcoRV*. De manera interesante, el análisis del polimorfismo localizado en la región promotora (uVNTR) mostró que la variante 3, caracterizada por expresar una mayor actividad transcripcional del gen, se transmitió con una mayor frecuencia en los pacientes TOC que presentaban comorbilidad con depresión. Finalmente el análisis de los haplotipos demuestra una mayor transmisión del haplotipo 1-3, conformado por los polimorfismos *EcoRV* y uVNTR, en el subtipo del trastorno caracterizado por presentar depresión comórbida.

Los resultados de asociación estadísticamente significativa en estas dos regiones parecen indicar que participan como factores determinantes en el desarrollo de un subtipo particular del trastorno.

Finalmente, el análisis de la mutación de Brunner no mostró su presencia en la muestra estudiada, demostrando este resultado y dos estudios realizados por grupos independientes, que es una mutación que se presenta de manera muy rara, ya que hasta la fecha únicamente ha sido encontrado en la familia holandesa reportada por el grupo de Brunner.

Estudios de asociación y experimentos de transfección han mostrado que estos cambios en la secuencia del gen afectan la capacidad metabólica de la MAO-A, por lo que los hallazgos encontrados pudieran indicar un efecto benéfico de los inhibidores de la MAO-A en las mujeres con TOC y en el subtipo clínico caracterizado por presentar comorbilidad con depresión.

En conclusión, los hallazgos reportados proporcionan evidencia molecular para identificar un subtipo particular del trastorno y apoya la hipótesis de que existe una expresión diferente de la enfermedad influenciada por el género.

## I INTRODUCCION.

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 datos generados por la utilización de los estudios de familias, de gemelos y de adopción. Sin embargo hasta la fecha no han sido capaces de 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.

Así de este modo, la meta de la genética molecular moderna es identificar cada uno de los loci genéticos que participan en el desarrollo de un determinado trastorno.

Tan complicado como la interacción gen-gen en las enfermedades mentales, resulta la interacción entre genes y factores no genéticos para convertir esa vulnerabilidad en enfermedad. Entre los 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 las que se enfrenta el estudio de los trastornos mentales, es el problema en 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 confiable. Recientemente se ha propuesto que además de agrupar a los pacientes por trastorno, sean divididos también por

rasgos conductuales o características clínicas similares, como un paso de la genética psiquiátrica en la definición de fenotipos más homogéneos (Leboyer et al., 1998).

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

Este tipo de objetivos generales se puede concretar con el estudio de genes que codifican enzimas que participan en el metabolismo de neurotransmisores y que podrían ser marcadores implicados en el desarrollo de los trastornos psiquiátricos. La monoamino oxidasa tipo A (MAO-A) fue de las primeras enzimas descubiertas con la característica de procesar farmacológicamente aminas activas (Hare, 1928). De manera casi inmediata, se observó una gran variabilidad en la actividad de la enzima en diferentes tejidos. En mamíferos, esta heterogeneidad es debida a la existencia de dos isoformas, las cuales pueden ser distinguidas por su diferente afinidad a sustratos y especificidad a inhibidores. La habilidad para inhibir selectivamente las formas A y B con una variedad de agentes, ha facilitado elucidar el papel bioquímico de cada una de ellas, permitiendo que dichos agentes puedan ser empleados como medicamentos en el tratamiento de la depresión y la hipertensión (Lieberman et al., 1993). Estas dos enzimas denominadas tipo A y tipo B, tienen una amplia variedad de funciones implicadas en la desaminación de aminas provenientes de la dieta y neurotransmisores. Además, las monoamino oxidasas tienen un importante papel neurofisiológico, ya que sirven como reguladores de los niveles de neurotransmisores

liberados por las neuronas y de este modo en la actividad de las vías sinápticas. Entre sujetos de la población general, han sido reportadas variaciones de hasta 50 veces en los niveles de la actividad de las dos isoformas y existe evidencia de que, al menos parcialmente, se encuentran bajo control genético (Craig, 1994).

Dado el importante papel de estas enzimas en la modulación de los niveles de aminas, los genes de la MAO han sido considerados como importantes candidatos moleculares para ser estudiados en conductas anormales que han sido heredadas, como es el caso de los trastornos psiquiátricos.

La investigación de asociaciones entre enfermedades mentales y defectos en los genes de la MAO fue disparada a partir del hallazgo reportado en una gran familia holandesa entre el síndrome de Brunner y una mutación puntual en el gen de la MAO-A. De esta forma, el presente trabajo constituye parte de ese gran interés por establecer si el gen de la MAO-A resulta ser uno de los genes candidatos posiblemente involucrados en el desarrollo de una enfermedad mental conocida como el trastorno obsesivo compulsivo.

## II ANTECEDENTES

### 1. La enzima monoamino oxidasa (MAO).

La monoamino oxidasa (EC 1.4.3.4) (tabla 1) es la enzima encargada de degradar una gran variedad de aminas biogénicas, incluyendo a los neurotransmisores: norepinefrina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5-HT).

Hasta la fecha, no se conoce de manera exacta la estructura de la enzima, aunque se cree que la MAO está compuesta por dos subunidades, cada una de las cuales enlaza al flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor (Chuang et al., 1974). El peso molecular de cada subunidad se estima entre 55-65 kilodaltones (kDa) (Cawthon et al., 1981).

Tabla 1. Características de la monoamino oxidasa.

EC 1.	Oxidoreductasa
EC 1.4	Actúa sobre el grupo donador CH-NH <sub>2</sub>
EC 1.4.3.	Con oxígeno como aceptor
EC 1.4.3.4.	Amino oxidasa (contiene 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, adrenalín oxidasa.
Cofactor:	FAD (flavín adenín dinucleótido).
Característica:	Actúa sobre aminas primarias y usualmente también sobre aminas secundarias y terciarias.

Hace tres décadas, Johnston (1968) determinó que existían dos isoformas, a partir de la observación de que una forma, denominada A, pero no la otra, llamada B, era

sensible al inhibidor irreversible clorgilina. Más tarde, mediante estudios bioquímicos y farmacológicos fue demostrado que además las dos formas de la enzima podían ser distinguidas por su peso molecular, afinidad a diversos sustratos, su distribución y por sus propiedades inmunológicas (Glover, Sandler, 1986) (Tabla 2).

Resulta importante mencionar que, aunque cada isoforma muestra especificidad por determinados sustratos, es posible que presenten una función cruzada, dependiendo de la concentración, afinidad y la tasa de recambio del sustrato; así como también de la concentración de la enzima (Tipton et al, 1987).

Por ejemplo, 10  $\mu$ M de feniletilamina es oxidada por MAO-B, pero 1 mM de feniletilamina es un sustrato común para ambas formas de la enzima en roedores, humano y bovino (Suzuki et al, 1981).

**Tabla 2. Características de la MAO-A y MAO-B.**

	MAO-A	MAO-B
<u>Preferencia por sustratos:</u>	Serotonina Norepinefrina	Feniletilamina Benzilamina
<u>Inhibidores selectivos:</u>	Clorgilina	Deprenil
<u>Distribución en tejido humano:</u>		
placenta	si	no
linfocitos y plaquetas	no	si
hígado	si	si
cerebro	si	si
<u>Distribución neural:</u>		
neuronas catecolaminérgicas	si	no
neuronas serotoninérgicas	no	si
astrocitos	no	si



## 2. Localización de la MAO.

Se encuentra localizada en la membrana exterior mitocondrial y esta distribuida en la mayoría de los tejidos del cuerpo (Tabla 2). La utilización de técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas ha permitido su localización en una gran variedad de especies (Willoughby et al. 1988, Saura et al., 1992). En humanos, la MAO-A periférica se expresa principalmente en placenta mientras que la MAO-B, en plaquetas y linfocitos.

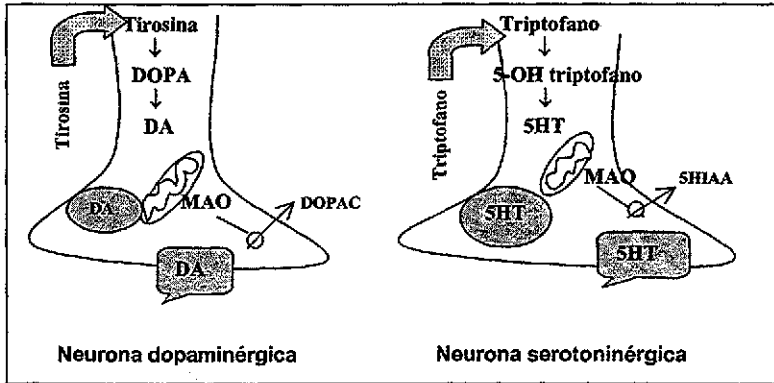
En el cerebro humano la forma predominante es la MAO-B, la cual se expresa en astrocitos, glía radial y neuronas serotoninérgicas, mientras que la MAO-A se expresa predominantemente en las neuronas catecolaminérgicas (Garrick et al., 1982) (Figura 1).

La principal función de las MAO en cerebro es la de regular los niveles de neurotransmisores liberados por las neuronas mediante su degradación metabólica. 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 aminos extrañas que pudieran actuar como falsos neurotransmisores (Saura et al., 1996).

Con respecto al desarrollo ontogénico, en humanos y roedores se ha observado que la actividad de la MAO-A en la mayoría de los tejidos se presenta antes que la de la MAO-B. Al nacimiento, la MAO-A alcanza casi la misma actividad que en la edad

adulta, mientras que la de la MAO-B se incrementa con la edad, debido a la proliferación de las células gliales a lo largo de la vida (Saura et al., 1994).

Figura 1. Esquema de neurona dopaminérgica y serotoninérgica.



DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético  
5HIAA= ácido hidróxi-indol acético

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3. Genes de la MAO.

Bach y cols. (1988) clonaron a partir de tejido hepático humano los dos cDNAs que contienen la secuencia codificante completa de las MAO-A y B. Un año más tarde, fue reportada la localización cromosomal de MAO-A y MAO-B en sitios adyacentes y en orientación cola a cola, sobre el cromosoma X en humanos en la región Xp11.23-11.4 (Lan et al., 1989).

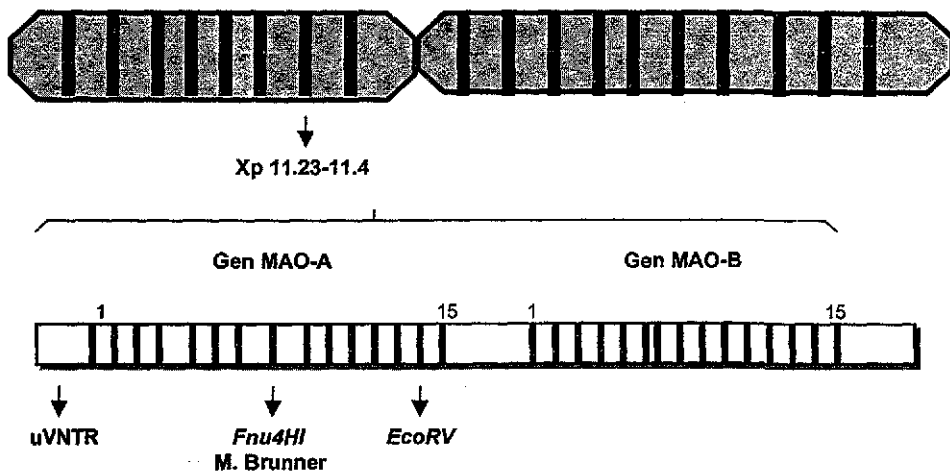
El análisis de ambas secuencias de aminoácidos mostró la existencia de diferencias, demostrando que los dos tipos de enzimas son codificados por diferentes genes.

Análisis posteriores demostraron que los dos genes tienen una homología del 70% y están constituidos por 15 exones (Figura 2), presentando una organización idéntica entre exón-intrón, lo cual ha llevado a sugerir que las dos isoenzimas provienen de la duplicación de un gen común ancestral (Grimsby et al., 1991).

Por otro lado, se ha observado una alta homología en la secuencia de aminoácidos entre diversas especies de mamíferos. Esta conservación de la estructura para cada isoenzima parece reflejar la presión evolutiva por mantener la función fisiológica específica de cada MAO. (Shih et al., 1999).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Cromosoma X



#### 4. Organización de la región promotora de los genes de la MAO.

Zhu y cols. (1992) identificaron las secuencias de DNA responsables de la activación de la transcripción de los genes de las MAO-A y B. Cuando estos constructos fueron transfectados a líneas celulares, la actividad máxima del promotor para la isoforma A fue encontrada en el fragmento 0.14 kb PvuII/DraII (Zhu et al., 1992) (Figura 3). El fragmento es rico en GC, contiene sitios potenciales de unión Sp1 y comparten en su secuencia aproximadamente un 60% de identidad con la MAO-B. Sin embargo, la organización de los elementos de transcripción es distintivamente diferente entre los dos promotores (Zhu et al., 1992). El fragmento de 0.14 kb de MAO-A carece de la caja TATA, tiene tres elementos Sp1 (Denney et al, 1994, Zhu et al, 1992) y exhibe el promotor una actividad bidireccional (Zhu et al, 1994). Se piensa que las diferencias en la región promotora de los dos genes se encuentran involucradas en la expresión celular y tejido específico característico para cada isoenzima. Estudios posteriores reportaron la presencia de una secuencia de repetición en la región promotora del gen de la MAO-A que posiblemente se encuentre involucrada en su actividad transcripcional (Zhu, Shih 1997).

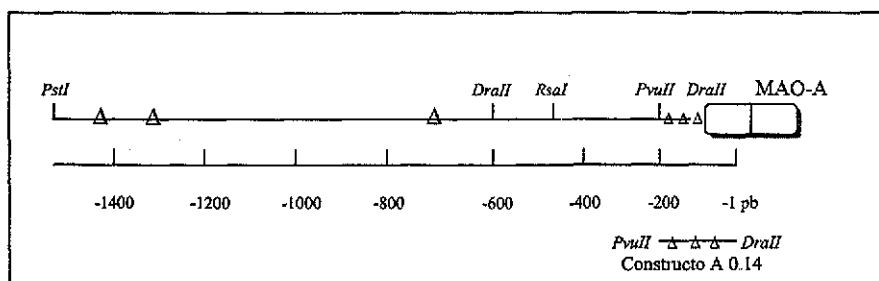


Figura 3. Mapa de restricción de la región promotora del gen de la MAO-A. La caja de la derecha representa la secuencia codificante del gen. Δ representa los sitios Sp1.

## 5. Variantes moleculares descritas en el gen de la MAO-A.

A partir de que fue reportada la secuencia codificante completa del gen de la MAO-A del humano, fueron identificadas diferencias que originalmente se pensó podían reflejar variabilidad en los sitios de iniciación de la transcripción, polimorfismos alélicos o la existencia de múltiples genes para la MAO-A.

Mediante la utilización de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se realizó un tamizaje en el DNA genómico de cinco individuos no relacionados, con 35 diferentes enzimas de restricción; sólo con una, la *EcoRV*, se detectó variación polimórfica (Ozelius et al., 1988). La región del polimorfismo se encuentra localizada en la posición 1460 y se caracteriza por el cambio de una citosina por timina, la cual genera el sitio de restricción (figura 2). Un análisis en un grupo de individuos caucásicos (19 mujeres y 13 hombres), reveló una frecuencia de 65% para el alelo denominado A1 y 35% para el A2 (Ozelius et al., 1988). Un año más tarde se describió otra región polimórfica mediante el uso de DNA digerido con *MspI*, reportando una frecuencia del 67% para el alelo 1 y del 33% para el alelo 2 (Ozelius et al., 1989). Esta mutación se encuentra en una región codificadora y se piensa que esta involucrada en funciones reguladoras del gen.

En 1991, Hotamisligil y Breakefield llevaron a cabo un estudio de asociación entre variantes alélicas en el gen de la MAO-A y medición de los niveles de la actividad enzimática en fibroblastos de la piel. Analizaron las dos regiones polimórficas previamente descritas (Ozelius et al., 1988 y 1989) y reportaron la presencia de un nuevo polimorfismo mediante la utilización de DNA digerido con la enzima de

restricción *Fnu4HI*. Esta última se encuentra localizada en el exón 8, en la posición 941 y se caracteriza por la sustitución de una timina por una guanina, creando el sitio de corte. Este último polimorfismo y el denominado *EcoRV*, ocurren en la tercera base del codón, no afectando la secuencia del aminoácido (mutaciones silenciosas). Además ha sido reportado que ambas regiones se encuentran en completo desequilibrio de enlace.

Los tres polimorfismos definen cuatro posibles haplotipos, pero sólo tres fueron observados en la muestra estudiada por Hotamisligil y Breakefield (1991). El análisis reveló 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).

Estudios posteriores reportaron la presencia de otros polimorfismos, uno de dinucleótidos, designado MAOCA-1 (Black et al., 1991) y otro, de los denominados VNTR o número variable de repeticiones arregladas en tándem en el segundo intrón del gen de la MAO-A (Hinds et al., 1992).

Brunner y colaboradores (1993b) reportaron una familia holandesa en que varios integrantes del sexo masculino presentaban retraso mental, conducta agresiva y niveles elevados de las monoaminas. El resultado de los estudios bioquímicos no reveló la presencia de actividad enzimática de MAO-A 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 de la MAO-A, se llevó a cabo la secuenciación del gen. Se detectaron cuatro sustituciones, 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. Por el contrario, la mutación fue excluida en 12 hombres no afectados de esta familia (Brunner et al., 1993a).

Finalmente, con el análisis de 98 individuos no relacionados, se identificó un polimorfismo VNTR en la región promotora (Sabol et al., 1998). Se observó la presencia de 4 variantes: el alelo 1, el cual contiene 3 repeticiones de una secuencia de 30 pb; el alelo 2, con 3.5 repeticiones; el alelo 3 con 4 repeticiones, y el alelo 4, con 5 (Figura 4). A este polimorfismo se le denominó MAOA-uVNTR (*upstream variable number of tandem repeats*). 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 los cuatro constructos 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.

Sin embargo, no se sabe si en la expresión del gen, el polimorfismo uVNTR es el sitio de unión para un factor de transcripción o su presencia provoca alteraciones en la estructura de la cromatina. Además, será necesario comprobar si los efectos

observados en las células transfectadas son un reflejo de lo que sucede a nivel del cromosoma en la célula *in vivo*.

Todas estas variantes moleculares descritas en el gen de la MAO-A, han mostrado tener para los polimorfismos *EcoRV* y *Fnu4HI*, frecuencias alélicas similares entre diversas poblaciones, a excepción de los japoneses (Tabla 3). Para la región del promotor podemos observar, que se han descrito 4 alelos, sin embargo, en algunas poblaciones sólo se ha reportado la presencia de dos de los alelos, como es el caso de los mexicanos y japoneses (Tabla 3).

Figura 4. Polimorfismo uVNTR del gen de la MAO-A.

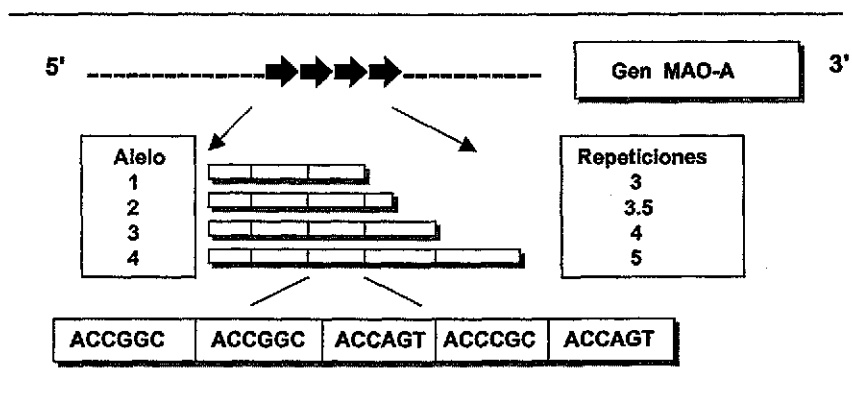




Tabla 3. Frecuencias de alelos reportadas en diferentes poblaciones.

Población	n	Alelos	Frecuencias n (%)			Referencia
			Mujeres	Hombres	Total	
<b><i>EcoRV</i></b>						
Mexicana	124	1	84 (66)	39 (65)	123 (65)	Camarena et al., 2001.
		2	44 (34)	21 (35)	65 (35)	
Caucásicos (Francia)	87	1	-	-	(70)	Coron et al., 1996.
		2	-	-	(30)	
Caucásicos (Europa)	89	1	55 (67)	28 (60)	83 (64)	Parsian et al., 1999.
		2	27 (33)	9 (40)	46 (36)	
<b><i>Fnu4HI</i></b>						
Mexicana	41	1	22 (73)	19 (73)	41 (73)	Camarena et al, 2002.
		2	8 (27)	7 (27)	15 (27)	
Caucásicos (Europa)	89	1	57 (68)	33 (72)	90 (70)	Parsian et al , 1999.
		2	27 (32)	13 (28)	40 (30)	
Caucásicos (Británicos)	84	1	52 (70)	22 (73)	74 (71)	Craddock et al , 1995.
		2	22 (30)	8 (27)	30 (29)	
Caucásicos (Europa)	55	1	49 (64)	11 (65)	60 (65)	Lim et al., (1995).
		2	27 (36)	6 (35)	33 (35)	
Japoneses	100	1	58 (56)	28 (58)	86 (56)	Muramatsu et al , 1997.
		2	46 (44)	20 (42)	66 (43)	
<b><i>uVNTR</i></b>						
Mexicana	110	1	44 (40)	19 (35)	63 (38)	Camarena et al., 2002.
		3	66 (60)	36 (65)	102 (62)	
Blancos no hispánicos	1629*	1	-	-	539 (33)	Sabol et al., 1998.
		2	-	-	8 (0.5)	
		3	-	-	1056 (65)	
		4	-	-	26 (1.5)	
Hispánicos <sup>1</sup>	92*	1	-	-	27 (29)	Sabol et al., 1998.
		3	-	-	65 (71)	
Afro-Americanos (negros).	88*	1	-	-	52 (59)	Sabol et al., 1998.
		2	-	-	2 (2)	
		3	-	-	32 (37)	
		4	-	-	2 (2)	
Japoneses	254	1	152 (59)	78 (62)	230 (60)	Kunugi et al., 1999.
		3	106 (41)	47 (38)	153 (40)	

n es el número de individuos incluidos en el estudio.

\* Se refiere al número de alelos estudiados.

<sup>1</sup> Se incluyeron dentro de este grupo, sujetos de Latinoamérica y de España.

## **6. El papel de la enzima MAO en los trastornos psiquiátricos.**

A partir de los estudios que mostraron asociación entre variantes moleculares y niveles de la actividad enzimática (Hotamisligil, Breakefield, 1991) y la detección de la mutación puntual (Brunner et al., 1993), diversos grupos han estudiado estas regiones como posibles marcadores moleculares involucrados en el desarrollo de diversas enfermedades.

En el campo de la Psiquiatría existe un gran interés en buscar marcadores biológicos que puedan identificar a los individuos que sean susceptibles de desarrollar algún trastorno mental. Entre las diferentes posibilidades destacan las evidencias de que las alteraciones en el metabolismo de las aminas podrían estar involucradas de manera importante en diversos trastornos psiquiátricos. El descubrimiento en humanos, de que las plaquetas presentaban actividad de monoamino oxidasa, abrió la posibilidad de probar esta hipótesis. A principios de la década de los 70's, se suscitó gran interés al reportarse una actividad menor de la MAO en plaquetas de esquizofrénicos crónicos en comparación con sujetos control (Murphy y Wyatt, 1972). Un año después se sugirió que la actividad de MAO plaquetaria podría ser un marcador genético en la patogénesis de diversos trastornos psiquiátricos (Wyatt et al., 1973).

Por otro lado, se ha postulado que algunos rasgos de conducta en humanos se encuentran significativamente asociados con variaciones en la actividad de la MAO (Buchsbaum et al., 1976; Murphy, Kalin 1980; Shih et al., 1999). Estudios realizados en sujetos de la población general han reportado diferencias en el perfil psiquiátrico y rasgos de personalidad dependiendo si tienen niveles altos o bajos de la actividad de la MAO. Por ejemplo, se encontró que individuos que no presentaban ningún trastorno

psiquiátrico y que presentaban niveles bajos de la actividad de la MAO, estaban asociados significativamente con puntajes altos en las escalas de personalidad que miden la extraversión y búsqueda de sensaciones (Murphy et al., 1977; Schooler et al., 1978; Oreiland et al., 1998; von Knorring et al., 1984; Lidberg et al., 1985; Belfrage et al., 1992), así como también con conductas agresivas (Brunner et al., 1993). Estos datos han sugerido que quizá este marcador biológico, más que estar ligado a un trastorno, parece estar fuertemente asociado a rasgos de la personalidad (Buchsbaum et al., 1976; von Knorring AL et al., 1991; Belfrage et al., 1992).

Se ha demostrado que la actividad de la MAO en plaquetas se encuentra genéticamente determinada, es heredable y estable a lo largo de la vida (Belfrage et al., 1992). El grupo de Breakefield (1980) realizó un estudio en tres pares de gemelos monocigóticos. Los niveles de la actividad para cada par de hermanos mostraron una alta concordancia. Por otro lado, se ha reportado que familiares de primer grado de pacientes esquizofrénicos, con enfermedad bipolar y alcohólicos, muestran una menor actividad de la MAO en plaquetas, comparado con sujetos de la población general (Leckman JF et al., 1977, Devor EJ et al., 1993; Oxenstierna G et al., 1986; Alexopoulos GS et al., 1983). Con base en los hallazgos anteriores se ha propuesto que cambios en la actividad enzimática debida a las variaciones en el gen de la MAO, podrían ser un factor clave en el desarrollo de diversos trastornos psiquiátricos (Hotamisligil, Breakefield, 1991).

Sin embargo, la medición bioquímica de la actividad de la MAO en tejido periférico no ha podido ser utilizada como un marcador biológico confiable debido a que presenta algunos problemas. Existen múltiples factores que producen variaciones en los niveles

de la actividad plaquetaria, entre los que se encuentran el uso de medicamentos, el estado hormonal, la edad, el género y la dieta (Gade et al., 1998). Por otro lado, se ha observado que los valores obtenidos en su medición, pueden variar dependiendo del tipo de metodología utilizada. Como consecuencia resulta importante implementar metodologías que permitan realizar el análisis con una mayor sensibilidad y reproducibilidad.

La clonación y secuenciación del gen de la MAO-A y la identificación de diversos polimorfismos, resultan importantes herramientas que pueden ser utilizadas con la confianza de que proporcionarán resultados reproducibles, en comparación con el uso de la medición de la actividad enzimática. Esto será posible, sólo si se localizan polimorfismos que tengan un correlato funcional en la determinación de la actividad enzimática. De esta manera, la portación de determinada variante molecular nos podría indicar en cada sujeto analizado, si presentará una mayor o menor actividad de la enzima.

El uso de este tipo de metodologías nos permitirá tener resultados rápidos y con una mayor sensibilidad para el estudio de trastornos en los que se sospecha que este tipo de alteración pudiera estar participando en el desarrollo de algunas enfermedades mentales.

#### *El uso de inhibidores de la MAO en los trastornos psiquiátricos.*

Se encuentra ampliamente documentada la eficacia terapéutica que ejercen los medicamentos que actúan mediante la inhibición de la MAO en trastornos tales como la depresión, el trastorno de pánico con agorafobia, la fobia social, la bulimia, el

trastorno de estrés postraumático y el trastorno límite de la personalidad. Además, se ha reportado que pacientes refractarios al tratamiento con medicamentos habituales, responden adecuadamente a los inhibidores de la MAO en el trastorno obsesivo compulsivo, tricotilomanía, dismorfofobia (Liebowitz et al., 1990; Erfurth A y Schmauss, 1993). En particular, la Moclobemida (inhibidor específico reversible de la MAO-A) presenta pocos efectos colaterales y puede ser utilizado en tratamientos combinados con inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina en pacientes refractarios (Joffe y Bahish, 1994).

El grupo de Jenike (1997) reportó que en pacientes TOC, los inhibidores de la MAO muestran una mayor eficacia en aquellos que presentaban obsesiones de simetría y tipo somática. Sin embargo, su uso ha sido limitado debido a los efectos colaterales que se presentan al interactuar con otros medicamentos y ciertos alimentos (Joffe R y Bakish D, 1994).

#### *MAO-A y B en alcoholismo y tabaquismo.*

Diversos estudios han sugerido una relación entre fumar tabaco y la disminución de la actividad de la MAO. Por ejemplo, los fumadores consuetudinarios muestran niveles reducidos de MAO-A y MAO-B (Fowler et al, 1996a y b). Por otro lado, estudios *in vitro* han reportado que las actividades de las dos isoformas se encuentran decrementadas en animales expuestos al humo de cigarro (Carr, Rowell, 1990; Yu, Boulton, 1987; Berlin et al, 1995).

El mecanismo involucrado en la inhibición de MAO por el humo de cigarro se desconoce, sin embargo, se ha propuesto que dos de sus componentes, el

formaldehído y el cianuro, forman aductos con el grupo amino de la proteína MAO, provocando un decremento en su actividad inducida por cambios conformacionales (Boulton et al, 1988). Por otro lado, la nicotina, el principal compuesto activo en el tabaco, ha mostrado efecto sobre ambas enzimas en cerebro humano y en plaquetas (Carr, Bashman, 1991; Oreland et al, 1981).

A partir de datos que muestran niveles bajos de la actividad enzimática en individuos alcohólicos, la MAO también ha sido involucrada en el alcoholismo (Devor et al, 1993, Faraj et al, 1994). Se ha sugerido que mutaciones en el gen de la MAO-A se encuentran involucradas en la susceptibilidad a desarrollar alcoholismo, debido a la asociación reportada entre alelos de la MAO-A y alcoholismo en caucásicos (Parsian et al, 1995, Vanyukov et al 1995) y chinos (Hsu et al 1996).

#### *MAO-A y B en trastornos relacionados con el estrés.*

El uso de fármacos inhibidores de la MAO ha demostrado grandes beneficios terapéuticos en pacientes con el trastorno de estrés post-traumático y con ataques de pánico (Liebowitz et al, 1990), lo cual sugiere que estos compuestos tienen un efecto directo sobre el estrés y el miedo. Doyle et al. (1996) demostraron una correlación entre las actividades de las MAO-A y B y el estrés. Ratones deficientes en estas enzimas muestran una alta reactividad al estrés, debido a que la norepinefrina y la dopamina median la respuesta al estrés y su acción se encuentra potencializada. Estos hallazgos son consistentes con niveles elevados en cerebro de norepinefrina y dopamina en ratones knock-out (KO) de MAO-A (Cases et al., 1995) y de feniletilamina en ratones KO para MAO-B (Grimsby et al., 1997).

### *Relación de la MAO-A con conducta agresiva.*

Diversas líneas de evidencia sugieren que el sistema serotoninérgico parece estar involucrado en la manifestación de conductas agresivas (Korte et al, 1996). Por ejemplo, existen reportes que muestran que ratones carentes del receptor 5-HT<sub>1B</sub> desarrollan una conducta agresivo-ofensiva. Como ya fue mencionado, una de las principales enzimas que participan en la degradación de serotonina son las MAO. Con respecto a esto, se ha generado una línea de ratones KO en la que se han interrumpido los exones 2 y 3 del gen que codifica para la MAO-A (Cases et al, 1995); las crías muestran niveles elevados de 5-HT en cerebro y un síndrome conductual caracterizado por presentar una mayor agresividad en los machos adultos (Cases et al, 1995). Se ha sugerido que la agresión asociada con la deficiencia en MAO-A quizás está relacionada con cambios estructurales en la corteza somatosensorial (Cases et al, 1996), en respuesta a niveles corticales elevados de 5-HT a MAO-A en los ratones KO. La conducta agresiva en estos ratones parece estar relacionada con el reporte de la familia holandesa en que los hombres mostraban una conducta agresiva asociada con una deficiencia de MAO-A debida a una mutación puntual en el exón 8 del gen de la MAO-A (Brunner et al 1993a).

## **7. Estudios moleculares del gen de la MAO-A en trastornos psiquiátricos.**

### *El trastorno bipolar y la MAO-A.*

A partir de la descripción del fenotipo conductual en los pacientes portadores de la mutación de Brunner, se observó que era similar a los síntomas exhibidos por los pacientes bipolares durante la fase maníaca. Debido a lo anterior, Lim et al (1995) llevaron a cabo un estudio de asociación de casos y controles. Los resultados mostraron una asociación significativa para el polimorfismo *Fnu4H1*, en el cual uno de los alelos asociados a una baja actividad enzimática mostró una alta frecuencia (85%) en las mujeres con el trastorno en comparación con las mujeres del grupo control (64%). Diversos grupos han tratado de replicar este hallazgo obteniéndose resultados contradictorios. Recientemente, Preisig y colaboradores (2000) realizaron un meta-análisis con los resultados de 5 estudios realizados en individuos caucásicos (Lim et al., 1995, Rubinsztein et al., 1996; Craddock et al., 1995; Parsian y Todd, 1997), encontrando una asociación significativa entre el polimorfismo MAOCA-1 y mujeres con el trastorno bipolar. Estos hallazgos son indicativos de que alteraciones en la secuencia del gen de la MAO-A parecen estar involucradas en el desarrollo del trastorno bipolar en mujeres, sin embargo es necesario su replicación utilizando estrategias de análisis que disminuyan posibles problemas de estratificación poblacional.

### *Esquizofrenia y MAO-A.*

Como se mencionó anteriormente, existen datos que muestran niveles bajos de la actividad de la MAO plaquetaria 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 moleculares en los genes de la MAO-A y MAO-B.

Coron et al. (1996), analizando el polimorfismo *EcoRV*, encontraron una tendencia significativa de asociación entre el alelo 1 con una baja actividad enzimática, y esquizofrénicos de tipo paranoide.

Por otro lado, el análisis de dos regiones de dinucleótidos, MAOCA-1 y MAO-B/(TG)<sub>n</sub> mostró un desequilibrio de enlace entre uno de los haplotipos y pacientes esquizofrénicos, sugiriendo que los sujetos acarreadores presentan una mayor vulnerabilidad a desarrollar el trastorno (Wei y Hemmings, 1999).

#### *Alcoholismo y MAO-A.*

Existen datos acerca de que los niveles bajos de actividad de la MAO plaquetaria podrían estar asociados con un incremento en el riesgo a desarrollar alcoholismo, en particular el denominado tipo II, caracterizado por ser la forma más severa del trastorno, de edad de inicio temprano, más frecuente en hombres y asociado a personalidad antisocial (Cloninger, 1987b).

Estudios moleculares, como el análisis del polimorfismo de dinucleótidos MAOCA-1 mostraron una asociación significativa entre los alelos de longitud mayor y pacientes alcohólicos hombres (Vanyukov et al., 1995b). Además, un estudio realizado en Chinos mostró también una asociación positiva entre el grupo étnico Han y el alelo 2 del polimorfismo *EcoRV* (Hsu et al., 1996). Datos obtenidos del análisis del polimorfismo

funcional del promotor, uVNTR, mostraron que al subagrupar a los pacientes alcohólicos, con y sin trastorno de personalidad antisocial, aquellos que sí presentaban, tenían una mayor frecuencia del alelo 3 (Samochowiec et al., 1999). El anterior hallazgo y el dato de presencia de la mutación en pacientes con rasgos agresivos (Brunner et al., 1993a) condujo al análisis secuencial del exón 8 en 50 sujetos con alcoholismo tipo II. Los resultados mostraron diferencias significativas para los alelos 2 de los polimorfismos *EcoRV* y *Fnu4HI* (Parsian, 1999) en este tipo de pacientes. Estos resultados parecen sugerir que el gen de la MAO-A se encuentra más asociado al trastorno de personalidad antisocial que al alcoholismo, datos que tendrán que ser probados utilizando estrategias con mayor sensibilidad.

#### *Depresión y MAO-A.*

La eficacia farmacológica de agentes inhibidores de la MAO-A, como la moclobemida, en el tratamiento de la depresión, aunada a los diversos estudios que reportan niveles bajos de la actividad enzimática en sujetos con depresión, proporcionan una fuerte evidencia que apoya el estudio de esta enzima como un posible marcador genético involucrado en la etiología del trastorno.

Hasta el momento se han estudiado diversas regiones polimórficas en el gen de la MAO-A en pacientes con depresión. El primer estudio analizó los polimorfismos MAOCA-1, el VNTR y el *Fnu4HI* (Muramatsu et al., 1997) y dos grupos (Kunugi et al., 1999; Schulze et al., 1999) analizaron el polimorfismo de la región promotora. Los resultados obtenidos en cada uno de los estudios indicaron que el gen de la MAO-A

no se encuentra asociado con depresión. Sin embargo, se ha reportado asociación positiva entre la MAO-A y algunos trastornos que presentan comorbilidad con depresión, en particular, con el trastorno obsesivo compulsivo (Camarena et al., 1998; Karayiorgou et al., 1999).

### *MAO-A y agresividad.*

Diversos estudios han reportado niveles bajos de la actividad de MAO-B plaquetaria en sujetos agresivos y violentos (Belfrage et al., 1992). El dato anterior y el importante hallazgo de la presencia de una mutación puntual en el gen de la MAO-A en hombres con conducta agresiva (Brunner et al., 1993a) han propuesto la hipótesis de que una disfunción enzimática pudiera estar asociada a este tipo de conductas. Vanyukov y colaboradores (1995a) propusieron que variaciones en la estructura del gen, particularmente en el tamaño, contribuyen a las diferencias en la actividad de la enzima, pudiendo así ser uno de los factores determinantes de la varianza genética de la agresividad en la población. El análisis de la región de dinucleótidos MAOCA-1, no mostró una asociación entre este polimorfismo y variaciones en la agresividad. Recientemente fue reportada una asociación positiva entre los individuos portadores de los alelos de baja actividad transcripcional (1 y 4) y puntajes bajos de agresividad e impulsividad, comparado con los individuos con alelos 2 y 3 (Manuck et al., 2000). Aunque este resultado va en sentido contrario a los datos reportados, resulta importante que se lleven a cabo más estudios moleculares en muestras de pacientes que presente este tipo de conducta.

### *MAO-A y personalidad.*

Existe evidencia que indica que la MAO-A juega un papel importante en la conducta humana. En particular, los hallazgos reportados en relación con la agresividad (Brunner et al., 1993<sup>a</sup>; Cases et al., 1995) han sugerido que secuencias reguladoras o estructurales del gen de la MAO-A podrían estar asociadas con una variabilidad conductual y fisiológica en humanos.

Recientemente, se planteó la posibilidad de que el polimorfismo funcional uVNTR del promotor pudiera estar asociado a rasgos de personalidad que predisponen a la ansiedad (neuroticismo, inhibición conductual, afecto negativo) ó a la conducta antisocial (psicoticismo) (Jorm et al., 2000). El análisis de los resultados mostró asociación estadísticamente significativa entre el genotipo homocigoto del alelo corto (SS, short-short) con una transcripción baja del gen y puntajes altos de ansiedad en el grupo de las mujeres. En un estudio anterior fue reportado por este mismo grupo una asociación negativa con el rasgo de neuroticismo (Jorm et al., 1997).

### *Trastorno obsesivo compulsivo.*

La MAO es una de las principales enzimas encargadas de la degradación de dos de los neurotransmisores (dopamina y serotonina) que se piensa se encuentran involucrados en el desarrollo de este trastorno. Debido a lo anterior, se inició el estudio del polimorfismo *EcoRV* del gen de la MAO-A en un estudio de casos y controles. Se encontró una frecuencia elevada del alelo 1, relacionado con una actividad enzimática baja en mujeres con el trastorno, comparado con sujetos sanos y con un grupo de

individuos que presentaban depresión (Camarena et al., 1998). Recientemente, mediante el análisis de familias tipo trío (papá, mamá y sujeto afectado) utilizando una metodología denominada HRR (Riesgo Relativo por Haplotipo), la cual evita problemas de estratificación poblacional, fue analizado el polimorfismo *Fnu4H1* en pacientes TOC y sus familiares. Los resultados mostraron una transmisión preferencial del alelo 2, relacionado con una actividad enzimática alta, en el 68% de los probandos hombres, que además presentaban comorbilidad con depresión mayor (Karayiorgou et al, 1999). El análisis de la transmisión materna mostró que 14 de las 15 madres informativas, transfirieron el alelo 2. Estos dos estudios (Camarena et al., 1998; Karayiorgou et al., 1999) son consistentes con reportes previos sobre los efectos benéficos de los inhibidores de la MAO-A en algunos subtipos del trastorno, entre las que se ha propuesto el género. Sin embargo, es necesario que estos resultados sean replicados, así como también el análisis de polimorfismos funcionales que puedan comprobar estos hallazgos.

## **8. Trastorno obsesivo compulsivo.**

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es el cuarto trastorno psiquiátrico más común y es una condición clínica heterogénea y crónica. Se encuentra clasificado por el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales en su cuarta edición (DSM-IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)(ver apéndice) como un trastorno de ansiedad que se caracteriza por la presencia de ideas, imágenes,

impulsos o pensamientos no deseados que se experimentan como intrusivos, absurdos y sin sentido, no pueden ser evitados por un acto de voluntad y aparecen de una manera repetitiva (obsesiones). Estas ideas frecuentemente se acompañan de conductas que se ejecutan también de manera repetitiva, ritualista y estereotipada, que son percibidas como innecesarias y generalmente se realizan en respuesta a una obsesión (compulsiones) (Black J, 1992).

Entre el tipo de obsesiones más comunes se encuentran: obsesiones de contaminación, obsesiones agresivas (imágenes sobre hacer daño a otros o a sí mismos), preocupación por la moral y la religión, dudas constantes sobre todo y acumulación de objetos. En cuanto al tipo de compulsiones, las más comunes son: de higiene y limpieza (lavado continuo de manos), de simetría, repetir una conducta para protegerse contra daños imaginarios, verificación (revisar que el gas esté apagado), ordenar constantemente las cosas y rezar reiteradamente.

Datos epidemiológicos muestran que este padecimiento es frecuente, con una prevalencia a lo largo de la vida entre el 1 y 3% y se presenta en proporción similar en hombres y mujeres (Nestadt et al., 2000). Se han observado diferencias demográficas y sintomatológicas por género, por ejemplo, la edad de inicio es más temprana en hombres, mientras que en general las mujeres muestran obsesiones agresivas y de contaminación y rituales de limpieza; en tanto que los hombres tienden a reportar una alta frecuencia de obsesiones de exactitud, sexuales y de simetría (Baer 1993; Bogetto et al., 1999). También ha sido reportado un efecto diferencial por género en cuanto a los trastornos comórbidos en el TOC. Las mujeres muestran una historia positiva para

trastornos de la alimentación y para depresión mayor; en tanto que los hombres presentan fobia social, alcoholismo (Bogetto, 1999) y trastornos que presentan tics, como el síndrome Gilles de la Tourette y los tics crónico motores, catalogándolos como uno de los principales subtipos del trastorno (Pauls, Leckman, 1986). Esta frecuente asociación con diversos trastornos sugiere que posiblemente se trate de un síndrome con múltiples etiologías, en lugar de una entidad homogénea (Sasson, Zohar 1996). Los familiares de primer grado de pacientes con TOC, muestran una alta prevalencia, a lo largo de su vida, de presentar el TOC y algún trastorno con tics (10.3 y 4.6%), comparado con la población en general (1.9 y 1%) (Pauls et al, 1995).

Han sido reportadas diferencias en el tipo de compulsiones que presentan los pacientes TOC con tics y aquellos que no los presentan. El grupo con tics mostró una mayor frecuencia de compulsiones tales como tocar, rozar, parpadear y golpear, y en menor grado, limpiar. El contar se encontró sólo cuando no se presentaba la compulsión de contaminación (Holzer et al, 1994).

Otro subtipo que se ha propuesto es el relacionado con la edad de inicio. En general, los hombres presentan una edad de inicio temprana y una forma más severa del trastorno, comparado con las mujeres (Pauls et al, 1995). Esto ha llevado a proponer que posiblemente refleje un daño biológico en el cual los hombres son más vulnerables que las mujeres.

## **Genética del trastorno obsesivo compulsivo.**

### *Estudios de familias.*

Los estudios de familias y de gemelos han sugerido que el trastorno obsesivo compulsivo tiene una base genética.

Los estudios de familias estiman la prevalencia de un trastorno entre los familiares de sujetos afectados con el trastorno que se encuentra bajo investigación. 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). En el estudio del TOC, se han llevado a cabo dos metodologías para estimar la prevalencia del trastorno en familiares: el método de historia familiar y el de estudio familiar. El primero se caracteriza por obtener datos de los integrantes de la familia a través del probando mediante entrevistas indirectas, diferenciándolo así del método de estudio familiar en el que se utilizan entrevistas directas con cada uno de los integrantes de la familia.

En el estudio del TOC, dos hallazgos han surgido a partir del uso de estos dos subtipos de metodologías: el primero es la presencia de una alta prevalencia del trastorno en los familiares de primer grado de los probandos comparado con la tasa estimada para la población general, y el segundo, es la alta comorbilidad que presenta el TOC con enfermedades que presentan tics, como los tics crónico motores y con el síndrome de la Tourette (Nicolini et al., 1999).

Pauls et al. (1995) llevaron a cabo un estudio familiar controlado en un grupo de 466 familiares de primer grado de 100 pacientes con el TOC. La prevalencia del trastorno fue significativamente más grande en los familiares de probandos (10.9%) comparado



con el grupo control (1.9%). Además, la frecuencia de tics fue también significativamente más alta en los familiares de los pacientes con TOC (4.6%) que en los sujetos en comparación (1.0%). Estos resultados llevaron a concluir la presencia de una gran heterogeneidad clínica, sugiriendo los siguientes subtipos: una forma del trastorno de tipo familiar y además relacionada con enfermedades que presentan tics, otra con características familiares, pero no relacionada con la presencia de tics y finalmente, aquella que no presenta una historia familiar de TOC o tics.

#### *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, por lo que el método consistirá en 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).

Los estudios de gemelos realizados en relación con el TOC, muestran una mayor concordancia entre los gemelos monocigotos en comparación con los dicigotos, apoyando la hipótesis de que es un padecimiento hereditario. El primer estudio realizado con los dos tipos de gemelos mostró una concordancia del 87% para los monocigotos y del 47% para los dicigotos (Carey y Gottesman, 1981).

Rasmussen y Tsuang (1986) llevaron a cabo una revisión de los estudios realizados hasta la fecha, reportando una concordancia del 65% en gemelos monocigotos. Finalmente, Clifford et al. (1984) estimaron un 47% de heredabilidad en 419 pares de gemelos no seleccionados.

Todos estos resultados indican la presencia de factores genéticos en el desarrollo de este trastorno, sin embargo aunque las tasas de concordancia han sido menores al 100%, es claro que otro tipo de factores, como los ambientales, también influyen de manera importante en la expresión del TOC (Pauls D et al., 1995).

#### *Estudios de segregación.*

Una vez que es establecida 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. Este está caracterizado 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 patrones de herencia resultan de la transmisión de alelos de una a otra generación.

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. Hasta la fecha existen sólo tres estudios de segregación para el TOC. Nicolini et al. (1991) desarrollaron un análisis de segregación en 24 familias y los resultados no permitieron rechazar estadísticamente un modelo autosómico dominante o uno recesivo. Aunque el modo de transmisión no fue detectable de manera precisa, los resultados sugieren que el patrón de herencia puede ser explicado por un modelo Mendeliano. Este patrón es consistente con la hipótesis de la existencia de un gen con efecto principal en la manifestación del trastorno.

De manera interesante, el análisis en dos estudios independientes, de 92 (Cavalini et al., 1995) y 100 familias (Alsobrook et al., 1999), apoyan nuevamente de manera consistente la existencia de genes con un efecto principal en la manifestación del TOC. Recientemente, este mismo modo de herencia es reportado al analizar 80 familias con el TOC (Nestadt et al., 2000).

Aunque los estudios realizados hasta el momento apoyan que el trastorno es causado por un gen con efecto principal, es posible que por sí solo no expliquen de manera precisa el tipo de agregación familiar; en consecuencia, se ha sugerido la posibilidad de que factores poligénicos también contribuyan en la etiología del TOC. Además, resulta importante mencionar la posibilidad de que se trate de un trastorno heterogéneo con diferentes orígenes para cada uno de los diferentes subtipos.

### *Estudios neurobiológicos.*

A pesar de que existe una gran cantidad de estudios en esta área, aún son desconocidas las bases biológicas del TOC. Diversas evidencias indican que se encuentran implicadas alteraciones en algunos neurotransmisores, cuya causa o efecto podría estar involucrado en el desarrollo del padecimiento. Dos de los sistemas que se piensa están involucrados son los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico.

#### a) La hipótesis serotoninérgica.

Se ha sugerido la existencia de una disfunción serotoninérgica cerebral como uno de los posibles mecanismos patofisiológicos del trastorno, a partir de estudios farmacológicos que muestran la eficacia antiobsesiva de una gama de compuestos que actúan inhibiendo la recaptura de serotonina (clomipramina, fluvoxamina) (Zohar et al., 1992). El efecto terapéutico de estos medicamentos ocurre por el bloqueo de la recaptura de serotonina, lo cual resulta en un incremento de los niveles de serotonina en la sinapsis, produciendo un aumento de los efectos de la serotonina sobre los receptores postsinápticos (5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub>) (Delgado y Moreno, 1998).

Aunque el sistema serotoninérgico sirve como un instrumento de intervención farmacoterapéutica, no necesariamente apoya la idea de que dicho sistema se encuentra involucrado de manera causal en la génesis del TOC.

Otras evidencias que apoyan esta hipótesis surgen a partir de los estudios que utilizan marcadores periféricos como indicadores de la actividad serotoninérgica central. Los análisis de la tasa de recaptura y unión a <sup>3</sup>H-imipramina y <sup>3</sup>H-paroxetina

llevada a cabo en plaquetas, han proporcionado datos que muestran una correlación entre la reducción de la actividad serotoninérgica y la respuesta clínica (Flament et al, 1987).

Otro marcador ampliamente utilizado es el análisis del metabolito de la serotonina, el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), medido en fluido cerebroespinal de pacientes con TOC. Los estudios farmacológicos muestran asociación estadísticamente significativa entre pacientes con TOC que tienen una eficaz respuesta terapéutica y un decremento en los niveles del 5-HIAA (Thoren et al, 1980).

Finalmente, la meta-clorofenilpiperazina (*m*-CPP) es un agente con múltiples acciones sobre el sistema serotoninérgico. Estudios realizados por Zohar e Insel (1987) y más tarde por Hollander y cols. (1992) muestran que la *m*-CPP exacerba los síntomas obsesivo-compulsivos en algunos pacientes con TOC, cuyo efecto puede ser revertido con agentes anti-obsesivos como la clomipramina. Sin embargo, Goodman et al. (1995) no lograron replicar este hallazgo al utilizar una solución oral y una intravenosa.

Todo lo anterior sugiere que el sistema serotoninérgico parece jugar un papel importante en la patofisiología del TOC, sin embargo, cerca del 40 al 50% de los pacientes TOC que reciben este tipo de terapia farmacológica no muestran una respuesta favorable, aun cuando hayan sido tratados concomitantemente con drogas que potencian la transmisión serotoninérgica. Esto sugiere que otros sistemas de neurotransmisores se encuentran también involucrados de forma importante (Goodman et al, 1990).

## b) Hipótesis dopaminérgica.

La evidencia más directa sobre el papel del sistema dopaminérgico en el TOC surge a partir de los beneficios terapéuticos obtenidos con la coadministración de antagonistas dopaminérgicos (neurolépticos: haloperidol, pimozide) al tratamiento habitual (McDougle et al., 1990).

Otras evidencias que apoyan un posible papel de la dopamina en el desarrollo del TOC provienen de estudios que muestran la emergencia de síntomas obsesivo-compulsivos como resultado de daños ocasionados a los ganglios basales. Estas regiones son ricas en dopamina y son uno de los sitios anatómicos que se sugiere podrían estar involucrados en la manifestación del TOC.

Otra evidencia que apoya esta hipótesis surge a partir del análisis de marcadores periféricos con el propósito de evaluar la función dopaminérgica presináptica. Entre la más estudiada en el TOC se encuentra la enzima sulfotransferasa plaquetaria, caracterizada por ser una vía alterna involucrada en el catabolismo de las catecolaminas. Con base en lo anterior, es concebible que cambios en la actividad enzimática de las sulfotransferasas afecten el balance entre diferentes neurotransmisores.

Marazziti y cols. (1992) encontraron que los pacientes con TOC muestran un incremento en los niveles de la actividad de la sulfotransferasa comparado con controles. Este hallazgo proporciona evidencia que apunta hacia la presencia de una actividad dopaminérgica incrementada en el desarrollo del trastorno.

Los anteriores hallazgos han propuesto que quizá un desbalance en la función

combinada de los sistemas 5HT/DA, sería la responsable del desarrollo de los síntomas obsesivo-compulsivos.

En particular, se ha sugerido que el decremento en los niveles de serotonina provoca que las neuronas dopaminérgicas vean incrementada su función como resultado de las conexiones funcionales entre ambos tipos de neuronas en los ganglios basales. De esta forma, los pacientes con TOC y que presentan una historia positiva con enfermedades que presentan tics, quizá representan un subtipo particular del trastorno en el que se encuentra involucrado un desbalance de los dos sistemas de neurotransmisores (Stahl, 1988).

Las enzimas son una parte fundamental en la función metabólica de los neurotransmisores, por lo que resultan importantes blancos farmacológicos. Con respecto al TOC, se ha reportado una gran eficacia terapéutica de los inhibidores de la MAO en pacientes con TOC que han sido refractarios al tratamiento habitual con inhibidores de la recaptura de serotonina (Liebowitz et al., 1990). Se ha propuesto que quizá la respuesta positiva a los inhibidores de la MAO es efectiva y similar a la obtenida con las drogas habituales, sólo cuando el TOC presenta comorbilidad con algún trastorno de ansiedad o fobia social y también en algunos trastornos considerados como pertenecientes al mismo espectro de TOC, como la tricotilomanía y la dismorfofobia (Liebowitz et al., 1990).

Hasta la fecha, aún no es claro si el desarrollo del TOC es debido principalmente a una disfunción en el sistema serotoninérgico, en el dopaminérgico o si radica en un problema en el balance entre los dos sistemas (Micallef y Blin, 2001).

## 10. Estudios moleculares en el TOC.

Con base en las evidencias que apoyan la presencia de factores genéticos en el desarrollo del TOC, el siguiente paso en la comprensión de la etiología del trastorno es la localización y caracterización de los genes que se encuentran involucrados en su manifestación. Basados en los antecedentes antes mencionados que apoyan la participación de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, diversos grupos han tratado de analizar genes candidatos específicos y su posible papel en la manifestación del trastorno. Nicolini et al. (1996) reportaron una asociación entre el genotipo A2A2 del gen del receptor D2 a dopamina (DRD2) en un grupo de pacientes TOC que presentaban tics comórbidos comparado con aquellos que no presentaban tics y con un grupo de sujetos sanos. El análisis por secuenciación de tres exones de este mismo gen no mostró diferencias estructurales al analizar un grupo de 45 pacientes con TOC (Brett et al., 1995). Otro de los receptores dopaminérgicos que han sido estudiados en el TOC, es el subtipo 4 (DRD4), de gran importancia en psiquiatría por ser uno de los sitios de acción de los antipsicóticos denominados atípicos. En particular, se ha analizado un polimorfismo identificado en el tercer exón del gen. Este fragmento de DNA se predice que codifica para la tercer asa citoplasmática de la proteína, región que está asociada a la interacción con proteínas Gs. Se ha reportado que existen diferencias funcionales asociadas al tamaño del alelo. Esta región es del tipo de número variable de repeticiones en tándem (VNTR), caracterizada por ser una secuencia de 48 pb que se repite de 2 hasta 10 veces. El análisis de esta variante en pacientes TOC, mostró una frecuencia elevada del alelo de siete repeticiones en



aquéllos que presentaban comorbilidad con tics (Cruz et al., 1997). Posteriormente, un grupo canadiense tratando de replicar el anterior hallazgo, reportó una tendencia aunque no significativa, hacia la misma dirección (Billet et al., 1998).

La respuesta farmacológica benéfica de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina que actúan sobre el transportador de serotonina (5-HTT), sustenta que el gen que codifica la proteína transportadora es uno de los posibles candidatos relevantes para el TOC. Se ha descrito un polimorfismo funcional en la región promotora del gen, caracterizado por ser un sistema bialélico que consiste en una inserción (alelo largo, l) o una deleción (alelo corto, s) de 44 pb (Heils et al., 1996). Reportes posteriores de este grupo muestran que la forma l comparada con la s tiene una mayor actividad transcripcional del gen, así como también un incremento en la recaptura basal *in vitro*. El estudio de este marcador en el TOC ha reportado una mayor frecuencia del genotipo homocigoto del alelo l en probandos TOC (Billet et al., 1997; Bengel et al., 1999), así como también una mayor transmisión de esta misma variante en 24 de 35 tríos analizados mediante un modelo de asociación basado en familias, denominado TDT (*Transmission disequilibrium test*). Dicho modelo compara los alelos transmitidos con los no transmitidos de una variante de un gen que se sospecha se encuentra asociada a determinada enfermedad (Mc Dougle et al., 1998).

Sin embargo, el análisis del receptor de dopamina D3 (DRD3) y el receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, no han demostrado asociación estadísticamente significativa (Nicolini et al., 1996).

El estudio de las enzimas que participan en el metabolismo de los dos sistemas de neurotransmisores posiblemente involucrados en el trastorno son también importantes

marcadores a estudiar. La catecol-orto-metiltransferasa (COMT) que participa en el catabolismo de dopamina ha sido también analizada en el TOC. Se reportó un polimorfismo funcional asociado con variaciones en la actividad enzimática, debida a la substitución de una guanina por adenina, que resulta en el cambio de una valina (alelo Val<sup>158</sup> o H- alta actividad) a metionina (Met<sup>158</sup> o L-baja actividad)(Lotta et al., 1995). El análisis de casos y controles mostró una mayor frecuencia del alelo L en los probandos masculinos, sugiriendo un dimorfismo sexual de COMT en el TOC. Recientemente, mediante los métodos de asociación basados en familias (TDT y HRR) fueron replicados estos hallazgos, ya que se encontró una mayor transmisión del alelo de baja actividad en pacientes TOC del sexo masculino.

Con respecto a la MAO y como un primer abordaje al estudio de este marcador molecular en el TOC, nuestro grupo analizó el polimorfismo *EcoRV* del gen de la MAO-A. El análisis en casos y controles mostró una mayor frecuencia del alelo asociado a una baja actividad enzimática en los probandos mujeres que presentaban comorbilidad con depresión (Camarena et al, 1998). Un año más tarde, en el análisis del polimorfismo *Fnu4HI* de este mismo gen, se encontró una asociación significativa entre el alelo asociado con una alta actividad enzimática y pacientes TOC hombres (Karayiourgou et al., 1999).

Por otra parte, estudios farmacológicos utilizando agonistas específicos al receptor 5-HT<sub>1DB</sub> han sugerido la posibilidad de que este receptor se encuentre involucrado en la patofisiología del TOC. En particular, se ha reportado que el Sumatriptan, el cual es un ligando específico de este receptor, modifica los síntomas obsesivo-compulsivos (Stern et al., 1998). Recientemente fue analizado el polimorfismo

G861C, localizado en el gen del receptor a serotonina 5-HT<sub>1Dβ</sub>. Los resultados muestran una transmisión preferencial del alelo G a los sujetos con TOC (Mundo et al., 2000).

En conclusión, hasta la fecha existen datos moleculares interesantes sobre el posible involucramiento de algunos genes en el desarrollo del TOC, sin embargo es necesario que estos datos puedan ser replicados por otros grupos, así como también el análisis de otros genes, con el objeto de poder llegar a encontrar los factores de riesgo, tanto genéticos como biológicos, importantes en su expresión, para poder así conocer acerca de la etiología y patogénesis de este trastorno.

### III DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 1. Planteamiento del problema.

Existe evidencia que apunta hacia la posibilidad de que una disfunción en la actividad de la MAO pudiera estar involucrada en el desarrollo de diversos trastornos psiquiátricos. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios en los que se hayan analizado alguno de los polimorfismos ya reportados en pacientes con alguna enfermedad mental. Nuestro grupo ha realizado un análisis extenso de posibles genes candidatos involucrados en la etiología del TOC, entre los que se encuentran los receptores dopaminérgicos D2, D3 y D4 y el receptor serotoninérgico 5HT<sub>2A</sub> (Cruz et al., 1997; Nicolini et al., 1996).

A partir de este estudio logramos identificar claramente que tanto el alelo A2 del sistema DRD2/TaqIA como el VNTR del alelo mayor de 7 repeticiones del gen del receptor DRD4, distinguen a un subgrupo de pacientes TOC que presentan comorbilidad con tics, lo que sugiere que quizá estos alelos funcionen como genes modificadores interactuando ya sea epistáticamente entre ellos o con otro locus, provocando así una mayor susceptibilidad al desarrollo del trastorno. Entre los genes interesantes para estudiar están los genes de la MAO. Su participación en la degradación oxidativa de las monoaminas presentes en las neuronas presinápticas, regulando por lo tanto su concentración citoplasmática, 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 en el TOC una base genética. Por otro

lado se ha demostrado que la actividad de MAO en plaquetas está genéticamente determinada y es altamente heredable (Breakefield y Eldstein, 1980). 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).

Con base en lo anterior, nosotros proponemos como hipótesis, que variaciones estructurales en el gen de la MAO-A se encuentran involucradas en el desarrollo del TOC.

## **2. Objetivo general.**

Determinar si existe asociación alélica entre variantes moleculares del gen de la MAO-A en un grupo de pacientes con TOC por medio del método de riesgo relativo por haplotipo, y si se encuentra relacionado con alguna variable clínica, como edad de inicio, género, severidad, comorbilidad con tics y depresión y presencia de obsesiones agresivas y de simetría.

### 3. Objetivos específicos.

1- Analizar variantes moleculares en el gen de la MAO-A en un grupo de pacientes con trastorno obsesivo compulsivo, con el propósito de buscar si alguna forma del alelo se encuentra asociada con el trastorno o con alguna variable clínica, como edad de inicio, género, severidad, comorbilidad con tics y depresión y presencia de obsesiones agresivas y obsesiones de simetría.

Polimorfismos analizados: *EcoRV*, *Fnu4HI* y uVNTR en un grupo de pacientes con TOC y sus familiares.

2- Análisis de los resultados mediante la estrategia denominada de riesgo relativo por haplotipo (HRR), con el objeto de contrarrestar los posibles efectos de heterogeneidad genética y error de muestreo.

3- Análisis de la transmisión de los haplotipos *EcoRV/Fnu4HI/uVNTR* y su posible asociación con TOC o con algún subtipo particular.

4- Análisis del desequilibrio de enlace ( $\Delta$ ) entre las tres regiones estudiadas.

5- Análisis de la mutación de Brunner y su posible correlación con obsesiones agresivas.

#### **4. Metodología.**

##### **a) Descripción de la muestra.**

Se incluyeron pacientes que acuden a la consulta externa del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Los requisitos para su inclusión fueron:

i) Cumplir los criterios diagnósticos del DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fourth edition, American Psychiatric Association, 1994) para TOC (ver apéndice). La evaluación clínica fue hecha a través de la entrevista estructurada DIS (Diagnostic Interview Schedule, versión en español) (Caraveo et al., 1991). A todos los pacientes se les aplicaron las escalas Yale-Brown para evaluar el grado de severidad del trastorno obsesivo-compulsivo (Y-BOCS, versión al español) (Nicolini et al., 1996) y Hamilton para depresión (Nicolini et al., 2000). Se obtuvieron las historias familiares de cada uno de los pacientes. La ausencia o presencia de tics se evaluó clínicamente utilizando los criterios del DSM-IV para el trastorno de tics motores o vocales.

ii) Que los probandos fueran de padres y abuelos mexicanos y que firmaran la carta de consentimiento para participar en el proyecto.

iii) Que se pudiera obtener familias tipo tríos, esto es, probando, padre y madre o diadas (probando hombre y madre), con el propósito de poder analizar los resultados mediante la estrategia de HRR, en la cual se utiliza los alelos no transmitidos por los padres a los probandos como grupo control (Falk CT et al 1987).

Se tomaron dos muestras de sangre periférica de 10 ml, en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante, de cada uno de los probandos y sus familiares. Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

**b) 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). Finalmente el DNA es disuelto en buffer TE y almacenado a 4°C.

**c) Análisis de los polimorfismos en el gen de la MAO-A.**

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

**Polimorfismo MAO-A/EcoRV** (Hotamisligil, Breakefield, 1991).

Primers: orientación sense: 5'- TTA AAT GGT CTC GGG AAG G

orientación antisense: 5' - GCC CAA TGA CAC AGC CTT T

a) Reacción de PCR: KCl 50 mM, Tris (pH 8.3) 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, gelatina 100 µg/ml, dNTP 1 mM de cada uno, 200 nM de cada primer 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.

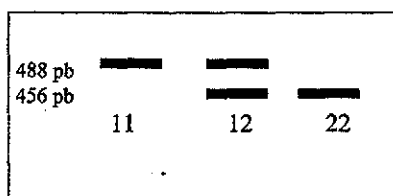
b) Chequeo de la amplificación: 3 µl del producto de amplificación se mezclan con 2 µl de colorante de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X. Finalmente el gel es teñido en bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml por 15 minutos. El tamaño del fragmento amplificado es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



c) Digestión de la muestra: 10  $\mu$ l de DNA amplificado es digerido con 10 U de la enzima de restricción *EcoRV* con su buffer de reacción adecuado, a una temperatura de 37°C toda la noche.

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

El patrón de bandas esperado es el siguiente:



Alelo 1: ausencia del sitio de restricción  
 Alelo 2: presencia del sitio de restricción.  
 Secuencia de reconocimiento: GAT<sup>v</sup>ATC

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Polimorfismo MAO-A/Fnu4HI (Hotamisligil y Breakefield 1991).

Primers: orientación sense: 5'- GAC CTT GAC TGC CAA GAT

orientación antisense: 5' - CTT CTT CTT CCA GAA GGC C

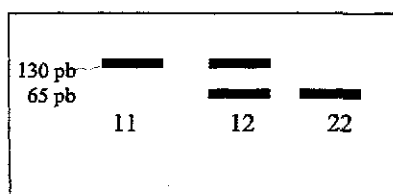
a) Reacción de PCR: KCl 50 mM, Tris (pH 8.3) 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, gelatina 100 ug/ml, dNTP 1 mM de cada uno, 200 nM de cada primer y 1 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) y 50 ng de DNA genómico, en un volumen final de 25  $\mu$ l. Se programaron 35 ciclos de amplificación (94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) con un tiempo de extensión final de 10 min a 72°C.

b) Chequeo de la amplificación: se siguieron las mismas condiciones descritas para el polimorfismo *EcoRV*. El tamaño del fragmento amplificado es de 130 pb.

c) Digestión de la muestra: 10  $\mu$ l de DNA amplificado fué digerido con 10 U de la enzima de restricción Fnu4HI con su buffer de reacción adecuado a una temperatura de 37°C durante toda la noche.

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

El patrón de bandas esperado fue el siguiente:



Alelo 1: ausencia del sitio de restricción

Alelo 2: presencia del sitio de restricción.

Secuencia de reconocimiento: GC<sup>v</sup>NGC

### **Polimorfismo MAO-A/uVNTR** (Sabol et al., 1998).

Primers: orientación sense: 5'- ACA GCC TGA CCG TGG AGA AG

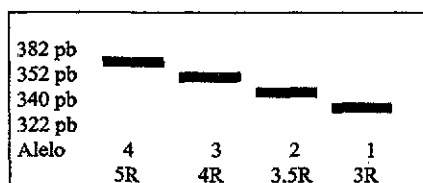
orientación antisense: 5'- GAA CGG ACG CTC CAT TCG GA

a) Reacción de PCR: KCl 50 mM, Tris (pH 8.3) 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, gelatina 100  $\mu$ g/ml, dNTP 1 mM de cada uno, 200 nM de cada primer y 0.5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) y 100 ng de DNA genómico, en un volumen final de 25  $\mu$ l. 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) Chequeo de la amplificación: se siguieron las mismas condiciones descritas para el polimorfismo EcoRV (paso b). El tamaño del fragmento amplificado es de 352 pb.

c) Genotipificación: 10  $\mu$ l del producto amplificado es mezclado con 8  $\mu$ l de colorante de electroforesis y cargado 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

#### d) Análisis de la mutación de Brunner.

Dado que la mutación descrita por Brunner et al (1993<sup>a</sup>) se encuentra a solo cuatro pares de bases del sistema polimórfico *Fnu4HI* (Fig. 5), se utilizó el mismo protocolo de amplificación por PCR descrito anteriormente. Una vez checado el producto de amplificación se procedió a la detección mediante el método de SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism).

El método de SSCP (Rolfs et al., 1992) se basa en el principio de que hebras sencillas de DNA con diferente secuencia muestran una movilidad distinta durante el proceso de electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. La estrategia de este método es la de amplificar el segmento de interés de un gen mediante PCR y entonces comparar la movilidad del DNA desnaturizado contra un segmento de referencia de secuencia conocida. Este método es muy utilizado para la detección de mutaciones puntuales en el que el cambio de una sola base se ve reflejado en la alteración en la movilidad del fragmento a lo largo del gel. Bajo condiciones no desnaturizantes, las

hebras sencillas de DNA exhiben una estructura doblada, la cual es determinada esencialmente por las interacciones intramoleculares y por lo tanto, de la secuencia. La presencia de una mutación en la secuencia de DNA provoca cambios en la conformación espacial de la estructura y de esta forma en su movilidad, la cual podrá ser detectada durante el proceso de electroforesis en geles de poliacrilamida. Estos cambios son visualizados a través de diversas técnicas, entre las más utilizadas tenemos la incorporación de  $P^{32}$ -dCTP en el fragmento de PCR y su posterior autoradiografía, o mediante tinción con bromuro de etidio o con plata, visualizados con luz ultravioleta, o con primers fluorescentes. Sarkar y colaboradores (1992) demostraron que bajo condiciones perfectamente estandarizadas y dependiendo del tamaño del fragmento de PCR, el método de SSCP detecta un 85% (en fragmentos de 183 pb) y 59% (en fragmentos de 307 pb) de mutaciones respectivamente. Sin embargo existen inconvenientes en la reproducibilidad del método, en particular durante el procedimiento de electroforesis. Entre los factores que afectan se encuentra el calentamiento del gel durante la electroforesis, lo cual puede ser contrarrestado mediante el uso de glicerol al 5-10%.

#### El método de SSCP para la detección de la mutación de Brunner.

- 1- Amplificación por PCR de la región de interés mediante el protocolo del polimorfismo *Fnu4HI*.
- 2- Se tomó 5  $\mu$ l del producto amplificado, por duplicado y agregar 3  $\mu$ l de colorante SSCP. Se calentó un tubo de cada par a 97°C por 5 minutos. Las muestras eran colocadas en hielo y cargadas inmediatamente en el gel.

3- La muestra se corrió en geles de acrilamida no desnaturizante al 8% con glicerol al 7%. Las condiciones de electroforesis fueron a temperatura ambiente, a 30 watts constantes en buffer TBE 1X frío.

La preparación de las soluciones estan descritas en el apéndice.

**Figura 5. Exón 8 del gen de la MAO-A.**

TGCAAATACG TAATTAATGC GATCCCTCCG <u>ACCTTGACTG CCAAGATTCA</u>			
CTTCAGACCA GAGCTTCCAG CAGAGAGAAA CCAGTTAATT		1	2
		936	941
CAATGGGAGC TGTCATTAAG TGCATGATGT ATTACAAGGA		<u>GGCCTTCTGG</u>	
<u>AAGAAGAAGG</u>			
1 Mutación de Brunner:	C→T	CAG → TAG	
		Gln	Stop
2 Polimorfismo <i>Fnu4H1</i> :	G→T	CGG → CGT	
		Arg	Arg
<u>Primers sense/antisense</u>			

#### e) **Análisis por HRR (Riesgo relativo por haplotipo).**

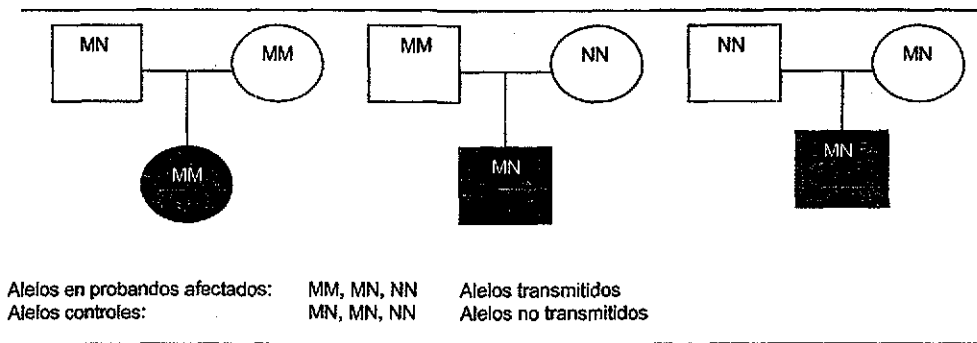
Se analizaron los resultados mediante la utilización de un modelo de asociación basado en familias, conocido como Riesgo Relativo por Haplotipo (*Haplotype Relative Risk*, HRR) (Falk, Rubinstein, 1987).

Este tipo de estrategia tiene la ventaja de evitar problemas de estratificación poblacional comúnmente presentados en los estudios de casos y controles. La idea es utilizar los alelos no transmitidos de los padres de un probando afectado como

controles internos. De esta manera, los mismos individuos y los padres de los sujetos afectados proporcionan la muestra control, evitando así llevar a cabo el apareamiento étnico ("matching").

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Análisis del método de Riesgo Relativo por Haplotype (HRR).



El método de HRR (Falk y Rubinstein, 1987; Terwilliger y Ott, 1992) define como M al alelo de alto riesgo y como N a la otra variante molecular. El análisis estadístico consiste en la comparación de la frecuencia del alelo M entre los casos y los controles. En cuanto a los controles, estos no son individuos, sino que son definidos como los dos alelos que los padres no transmitieron al hijo afectado.

Para el caso de regiones localizadas en el cromosoma X, como lo es para el gen de la MAO-A, se toma únicamente en cuenta la transmisión materna con el propósito de homogeneizar el análisis en ambos géneros (Ho, Bailey-Wilson, 2000).

Para cualquiera de los dos casos, se lleva a cabo el análisis de cada una de las familias y son capturadas en la siguiente tabla:

	Transmitido	No transmitido
Alelo M	W	Y
Alelo N	X	Z

El análisis estadístico es llevado a cabo mediante tablas de contingencia de 2x2 y cálculo de chi cuadrada.

#### f) Análisis de la estimación del desequilibrio de enlace ( $\Delta$ ).

Debido a que los polimorfismos analizados en el gen de la MAO-A se encuentran cercanos, se ha sugerido que tienden a ser transmitidos de una generación a otra como un haplotipo o *en bloc* (Hawi et al., 1999). Mediante la utilización de métodos estadísticos, se puede detectar el desequilibrio de enlace, principalmente para sistemas genéticos constituidos por dos sistemas de marcadores bi-alélicos. El grado de desequilibrio de enlace entre dos alelos es expresado como delta ( $\Delta$ ) y es calculada con la siguiente fórmula (Mattiuz et al., 1970):

$$\Delta = \sqrt{d/N} - \sqrt{(b+d)/N} \sqrt{c+d/N}$$

En donde:

$\Delta$ = desequilibrio de enlace entre dos regiones.

a= presencia de la variante 1 de la región A y de la variante 1 de la región B

b= presencia de la variante 1 de la región A y la variante 2 de la región B

c= presenta la variante 2 de la región A y la variante 1 de la región B

d= presenta la variante 2 de la región A y la variante 2 de la región B

N= a+b+c+d

El valor de  $\Delta$  se encontrará en el rango de -1 a +1. La significancia estadística de esta asociación alélica es estimada por la prueba de Fisher, mediante la construcción de tablas de contingencia de 2x2 de las cuatro variables (a,b,c y d) (Hawi et al., 1999).

## IV Resultados.

El estudio fue llevado a cabo con un total de 51 familias capturadas de la consulta externa del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, en un período que comprendió de Septiembre de 1998 a Septiembre de 2001.

De las 51 familias, 42 estuvieron constituidas por tríos (probando, padre y madre) y 9 fueron díadas formadas por hijo y madre. Para el análisis por HRR de regiones localizadas en el cromosoma X, la inclusión de este tipo de díadas resultan ser completamente informativas debido a que se analiza la transmisión materna, por lo que el padre no proporciona información en este tipo de metodología. Otro requisito indispensable, por su localización cromosomal, es la de llevar a cabo el análisis separando la muestra por género.

### *Características de los pacientes estudiados.*

En la tabla 4 se muestran las características clínicas y demográficas de los pacientes con TOC. El análisis incluye sólo 42 de los 51 pacientes debido a que no se logró obtener la información de 9 de los sujetos.

En el TOC se han reportado diferencias clínicas por género en la manifestación del trastorno, por lo que cada una de las variables fueron analizadas por género.

Como se puede observar en la tabla 3, no se observaron diferencias en la edad de los pacientes ni en la edad de inicio del trastorno al comparar por género.



Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los pacientes TOC.

	Hombres (n=25)	Mujeres (n=17)*	p
<b>Variables demográficas:</b>			
Edad (promedio $\pm$ DE años)	27.4 $\pm$ 7.6	27.5 $\pm$ 7.4	
<b>Variables clínicas:</b>			
Edad de inicio (promedio $\pm$ DE)	19.1 $\pm$ 5.6	19.9 $\pm$ 8.5	
Comorbilidad con depresión <sup>1</sup> , n(%)	7 (26)	4 (25)	0.28*
Presencia de tics, n (%)	11 (42)	4 (25)	0.14*
Severidad <sup>2</sup> , n (%)	17 (68)	13 (76)	0.23*
Edad de inicio temprana <sup>3</sup> , n(%)	11 (41)	6 (43)	0.26*

La tabla incluye la información clínica completa de 42 pacientes. Los 9 restantes no completaron la información por lo que fueron excluidos del análisis.

<sup>1</sup> Se definió de acuerdo a la escala de Depresión de Hamilton con puntajes  $\geq 18$

<sup>2</sup> Definida de acuerdo a la escala de Yale-Brown con puntajes  $\geq 20$

<sup>3</sup> Se clasificó como edad de inicio temprana si se presentó  $\leq 16$  años

\* Prueba de Fisher.

Se han descritos diferencias por género en cuanto a la edad de inicio del trastorno, en el que los hombres muestran un inicio más temprano comparado con las mujeres (Bogetto et al., 1999). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

El diagnóstico de depresión fue establecido a través de la entrevista clínica y corroborado mediante la aplicación de la escala de Hamilton validada al español (Nicolini et al., 1992). Este instrumento evalúa la severidad de los síntomas depresivos. Consta de 21 reactivos con una calificación máxima de 64 puntos. La evaluación del clínico y puntajes en la escala de Hamilton  $\geq 18$  definieron el diagnóstico de depresión (Schatzberg, 2000). Se ha descrito que las mujeres con TOC muestran una alta comorbilidad con depresión, sin embargo, en el presente estudio no se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de depresión (Tabla 4).

Para la medición del grado de severidad de los síntomas obsesivos y compulsivos, se utilizó la escala de Yale-Brown validada al español (Nicolini et

al., 1996). Se encuentra constituida por diez apartados, los primeros cinco califican obsesiones y los restantes (6-10) compulsiones. Cada apartado se califica de 0-4 puntos, con una calificación máxima de 40 puntos. Se define como presencia de síntomas severos (severidad) si presenta puntajes  $\geq 20$ .

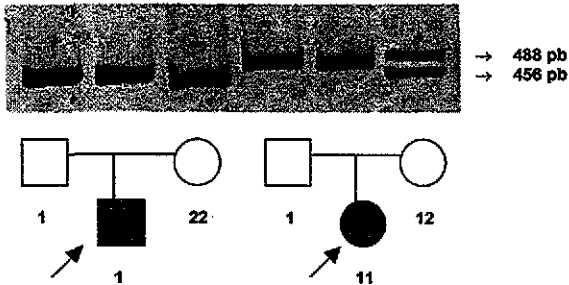
No se encontraron diferencias por género, en cuanto a la severidad (Tabla 3). También fue analizada la presencia de tics, no mostrando diferencia por género. Sin embargo, se puede observar una prevalencia mayor en los hombres, lo cual por el tamaño de la muestra no mostró ser estadísticamente significativo.

Finalmente, se dividió a la muestra dependiendo de la edad de inicio del trastorno, definiéndose como temprana si se presentaba a una edad  $\leq 16$  años (Karayiorgou et al., 1999). El análisis estadístico no mostró diferencias por género.

### **1. Análisis del polimorfismo EcoRV.**

Las 51 familias fueron tipificadas y analizadas mediante la estrategia de HRR (Terwilliger and Ott, 1992). Este modelo está basado en la suposición de que la probabilidad de transmisión de cada alelo parental sea del 50%, independientemente de la frecuencia de los alelos parentales, con base en la hipótesis nula de que no existe desequilibrio de enlace (*linkage disequilibrium*). Si la transmisión de un alelo se desvía de este porcentaje (por la prueba de  $\chi^2$ ), nos encontramos con la presencia de asociación (Rubinstein et al., 1981). Los datos fueron analizados mediante la estadística de HRR para evaluar posibles desviaciones.

**Figura 7. Análisis del polimorfismo EcoRV .**



Gel de agarosa al 3% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio, que muestra las bandas características del polimorfismo EcoRV en dos de las familias estudiadas y la forma de transmisión en los dos géneros.

En la tabla 5 se muestran las frecuencias de alelos transmitidos y no transmitidos por género, para el polimorfismo *EcoRV*. El análisis mediante HRR muestra una tendencia significativa en el grupo de las mujeres ( $\chi^2=3.8$ ,  $p=0.047$ ). Se observa una mayor transmisión del alelo 1 en las mujeres con el trastorno. En cuanto al grupo de los hombres la transmisión de ambos alelos es similar ( $\chi^2=1.56$ ,  $p=0.21$ ).

**Tabla 5. Alelos transmitidos y no transmitidos del polimorfismo *EcoRV* en probandos hombres y mujeres, mediante la estrategia de HRR.**

	Mujeres		Hombres	
	T	NT	T	NT
Alelo 1	14	7	13	18
Alelo 2	5	12	19	14
	$\chi^2=3.83$ , $df=1$ , $p=0.047$		$\chi^2=1.56$ , $df=1$ , $p=0.208$	

El alelo 1 se encuentra asociado con niveles bajos de la actividad y el alelo 2 con niveles altos de la actividad enzimática de la MAO-A.

T significa los alelos transmitidos y NT, los alelos no transmitidos.

El análisis de la transmisión de alelos entre géneros mostró diferencia significativa ( $\chi^2=5.23$ ,  $df=1$ ,  $p=0.022$ ). Una mayor transmisión del alelo 1 en el grupo de las mujeres comparado con los hombres, 74 contra 41%, respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 6. Transmisión de alelos entre géneros del polimorfismo *EcoRV*.**

	Mujeres	Hombres
Transmisión de 1	14	13
Transmisión de 2	5	19

$\chi^2=5.23$ ,  $df=1$ ,  $p=0.022$

El alelo 1 se encuentra asociado con niveles bajos de la actividad y el alelo 2 con niveles altos de la actividad de MAO-A.

#### *Análisis de variables clínicas.*

Se llevó a cabo el análisis de la transmisión alélica por HRR de cada una de las siguientes variables clínicas: edad de inicio (temprana y tardía), severidad, comorbilidad con depresión, presencia de tics y presencia de obsesiones agresivas y de simetría.

La comparación entre los alelos transmitidos y los no transmitidos no mostró diferencias significativas para cada una de las variables analizadas, excepto en el grupo de pacientes TOC que presentan comorbilidad con depresión, en el cual se observa una transmisión preferencial del alelo 1 (9 de 11) comparado con el grupo que no presenta depresión (Tabla 7).

**Tabla 7. Transmisión de alelos del polimorfismo *EcoRV* en probandos con y sin depresión.**

	Depresión	No depresión
Transmisión de 1	9	14
Transmisión de 2	2	17

Prueba de Fisher:  $p=0.0326$

Alelo 1= actividad enzimática baja; Alelo 2= actividad enzimática alta.

## 2. Análisis del polimorfismo *Fnu4HI*.

Los resultados obtenidos en esta región no muestran la transmisión de un alelo particular en hombres ni en mujeres con el trastorno ( $\chi^2=0.11$ ,  $df=1$ ,  $p=0.74$ ) (Tabla 8); así como tampoco en el análisis de la transmisión entre géneros ( $\chi^2=0.03$ ,  $df=1$ ,  $p=0.86$ ) (Tabla 9).

**Tabla 8. Alelos transmitidos y no transmitidos del polimorfismo *Fnu4HI* en probandos hombres y mujeres mediante la estrategia de HRR.**

	Mujeres		Hombres	
	T	NT	T	NT
Alelo 1	11	12	18	19
Alelo 2	8	7	14	13

$\chi^2=0.11$ ,  $df=1$ ,  $p=0.11$        $\chi^2=0.06$ ,  $df=1$ ,  $p=0.8$

El alelo 1 se encuentra asociado con niveles bajos de la actividad y el alelo 2 con niveles altos de la actividad enzimática de la MAO-A.

T significa los alelos transmitidos y NT, los alelos no transmitidos.

**Tabla 9. Transmisión de alelos entre género del polimorfismo *Fnu4HI*.**

	Mujeres	Hombres
Transmisión de 1	11	18
Transmisión de 2	8	14

$\chi^2=0.03$ ,  $df=1$ ,  $p=0.86$

Alelo 1= baja actividad; Alelo 2= alta actividad.

### Análisis de variables clínicas.

El análisis por HRR no mostró la presencia de asociación positiva para cada una de las variables clínicas, a excepción de la severidad. Se observó una mayor transmisión del alelo 1 en los pacientes no severos ( $YB \leq 20$ ) (Tabla 10).

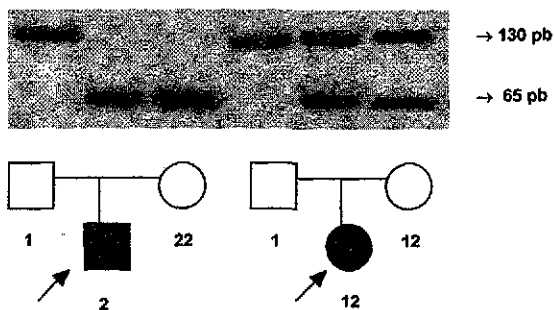
**Tabla 10. Transmisión alélica del polimorfismo *Fnu4HI* en pacientes severos vs no severos.**

	Severos	No severos
Transmisión de 1	13	10
Transmisión de 2	14	2

Prueba de Fisher:  $p=0.035$

Alelo 1= baja actividad enzimática.  
Alelo 2= alta actividad enzimática.

**Figura 8. Análisis del polimorfismo *Fnu4HI*.**



Gel de agarosa al 2%/TAE 1X que muestra el fragmento de DNAg amplificado y digerido del polimorfismo *Fnu4HI* en dos familias estudiadas.

### 3. Análisis del polimorfismo uVNTR.

El análisis de la región del promotor mostró la presencia de solo dos variantes alélicas (alelos 1 y 3), en población mexicana, a excepción, de un sujeto (la madre de un probando) que portaba un alelo 4. Debido a que dicho alelo, presenta la misma actividad transcripcional que el alelo 1, se incluyó dentro de este grupo.

No se observaron diferencias significativas en la transmisión de un alelo de manera preferencial en hombres ni en mujeres (Tabla 11). Asimismo, tampoco se encontró diferencias en la transmisión alélica al comparar los grupos de los hombres y las mujeres (Tabla 12). En la figura 9 se muestra el polimorfismo en dos familias.

**Tabla 11. Alelos transmitidos y no transmitidos del polimorfismo uVNTR en probandos hombres y mujeres mediante la estrategia de HRR.**

	Mujeres			Hombres	
	T	NT		T	NT
Alelo 1	8	9	Alelo 1	14	13
Alelo 3	11	10	Alelo 3	18	19

$\chi^2=0.11$ ,  $df=1$ ,  $p=0.74$        $\chi^2=0.06$ ,  $df=1$ ,  $p=0.8$

El alelo 1 se encuentra asociado con niveles bajos de la actividad transcripcional y el alelo 3 con niveles altos de la actividad transcripcional del gen de la MAO-A.  
T significa los alelos transmitidos y NT, los alelos no transmitidos.

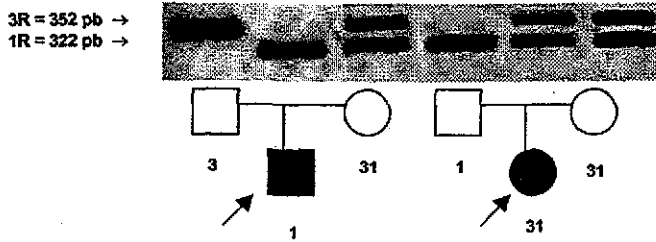
**Tabla 12. Transmisión de alelos entre géneros para el polimorfismo uVNTR.**

	Mujeres	Hombres
Transmisión de 1	8	14
Transmisión de 3	11	18

$\chi^2=0.03$ ,  $df=1$ ,  $p=0.86$

Alelo 1= baja actividad transcripcional  
Alelo 3= alta actividad transcripcional.

**Figura 9. Análisis del polimorfismo uVNTR del gen de la MAO-A.**



Gel de agarosa metaphor al 2.5% en TBE 1x, que muestra los productos de amplificación del polimorfismo uVNTR en dos familias, con un afectado hombre y con una mujer, para mostrar la forma de transmisión de los alelos.

#### *Análisis de variables clínicas.*

El análisis por HRR sólo mostró diferencias en la transmisión en los pacientes que presentan comorbilidad con depresión. Se encontró una mayor transmisión del alelo 3 (10 de 11) (Tabla13).

**Tabla 13. Transmisión de alelos del polimorfismo uVNTR en pacientes con depresión.**

	Depresión	Sin depresión
Transmisión de 1	1	16
Transmisión de 3	10	15

Prueba de Fisher:  $p=0.013$

#### **4. Análisis de la transmisión por haplotipos.**

En cada una de las familias estudiadas se analizó la transmisión de las tres regiones mediante la determinación de haplotipos, definidos como



*EcoRV/Fnu4HI/uVNTR*. El análisis fue llevado a cabo mediante la determinación del alelo transmitido y no transmitido para cada una de las regiones analizadas (Tabla 14). No se observa la transmisión de un haplotipo particular asociado con la presencia del trastorno en ninguno de los dos géneros (Prueba t de student,  $p=0.99$ ). Posteriormente se analizó la transmisión entre géneros no encontrando diferencias estadísticamente significativas (Prueba t de student,  $p=0.155$ ).

**Tabla 14. Análisis de la transmisión por haplotipo.**

Haplotipo	Hombres		Mujeres	
	T	NT	T	NT
1-1-1	0	2	1	0
1-1-3	10	11	10	7
1-1-4	0	1	0	0
1-2-1	0	2	2	0
1-2-3	3	2	1	0
2-1-1	4	1	0	3
2-1-3	4	4	0	2
2-2-1	10	7	5	6
2-2-3	1	2	0	1

La frecuencia de los haplotipos en la muestra estudiada se muestra en la tabla 15. Se observa una mayor frecuencia del haplotipo 1-1-3 (39%) en los probandos, sin embargo, sería interesante compararlo con una población control, con el objeto de ver si dicho haplotipo se encuentra asociado al trastorno o se trata del polimorfismo más frecuente en la población mexicana.

**Tabla 15. Frecuencias de los haplotipos en los pacientes con TOC.**

Haplotipo*	n	Frecuencia (%)
1-1-1	1	2
1-1-3	20	39
1-2-1	2	4
1-2-3	4	8
2-1-1	4	8
2-1-3	4	8
2-2-1	15	29
2-2-3	1	2

\* *EcoRV/Fnu4HI/uVNTR*

El análisis de los polimorfismos *EcoRV* y *uVNTR* mostraron asociación estadísticamente significativa con el subtipo del trastorno caracterizado por presentar depresión; por lo que se llevó a cabo, el análisis por haplotipos de estas dos regiones. La tabla 16 presenta las frecuencias observadas en los grupos TOC con y sin depresión. Como se muestra, el haplotipo 1-3 se transmite de manera más frecuente en el grupo de pacientes TOC que presentan comorbilidad con depresión (82%). Por el contrario, se presenta una mayor frecuencia del haplotipo 2-1 para el caso de los sujetos TOC que no presentan depresión (52%).

**Tabla 16. Frecuencias de los haplotipos *EcoRV/uVNTR* en los pacientes TOC con y sin depresión.**

Haplotipo	TOC	
	Con depresión	Sin depresión
1-1	0	0
1-3	9 (82)*	13 (42)
2-1	1 (9)	16 (52)
2-3	1 (9)	2 (6)

\* n (%)

$\chi^2=6.17$ ,  $df=2$ ,  $p=0.0447$

### **5. Determinación del desequilibrio de enlace entre las regiones analizadas.**

Se llevó a cabo la determinación de desequilibrio de enlace. Un reporte previo reportó que los polimorfismos *EcoRV* y *Fnu4HI* se encontraban en completo desequilibrio (Hotamisligil, Breakefield, 1991). El análisis de la muestra analizada en el presente estudio muestra que las tres regiones se encuentran en desequilibrio de enlace (Tabla 17).

**Tabla 17. Estimación del desequilibrio de enlace ( $\Delta$ ).**

Polimorfismo	$\Delta$	p*
<i>EcoRV/Fnu4HI</i>	0.145	0.004
<i>EcoRV/uVNTR</i>	-0.203	0.0000
<i>Fnu4HI/uVNTR</i>	-0.181	0.0000

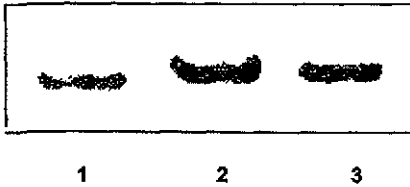
\* Prueba de Fisher.

## **6. Análisis de la mutación de Brunner.**

El análisis por SSCP de las muestras de DNA analizadas de los pacientes con TOC mostró un patrón de corrimiento distinto en 5 de los 51 probandos (tres hombres y dos mujeres), sugiriendo la presencia de la mutación. En la figura 10 se muestra una fotografía del análisis por SSCP: el carril 2 corresponde a un paciente hombre que presenta la mutación y que fue utilizado como control positivo (donado por el Dr. H. Brunner); el carril 3 es la muestra de un paciente con TOC, en el que se observa el mismo patrón de migración. En el carril 1 está la muestra de otro paciente y se observa que la banda se encuentra localizada de diferente manera, sugiriendo en este fragmento una secuencia diferente a la de los otros carriles.

Sin embargo, este tipo de metodología puede producir falsos positivos (Sarkar et al., 1992) y además, en protocolos ya estandarizados, el resultado se debe comprobar mediante la secuenciación del fragmento en el cual se sospecha la presencia de algún cambio de base.

Figura 10. Análisis por SSCP de la mutación de Brunner.



El carril 1 corresponde a un paciente que presenta un patrón de migración que indica la no presencia de mutación; el carril 2 es el control positivo de un paciente que presenta la mutación de Brunner y el carril 3 es un paciente con TOC que presenta el mismo patrón que el control positivo, indicando la presencia de la mutación.

De acuerdo con lo anterior se procedió a realizar una segunda prueba utilizando un método recientemente reportado por Mejía et al. (2001). El análisis consiste en amplificación por PCR de la región que contiene la mutación y la utilización de la enzima de restricción *Bfal* que detecta la mutación mediante la identificación del sitio de restricción (5' . . . C♦TAG . . . 3'), generando dos bandas. El análisis de las cinco muestras positivas para la mutación por SSCP y del control positivo no generó ningún corte en el fragmento digerido. Como control interno de la eficiencia de la enzima se colocó DNAg, generando el patrón esperado. Por el resultado obtenido con el control positivo podemos decir que la metodología descrita por Mejía et al. (2001) no es una metodología específica para la detección de la mutación.

Finalmente se procedió a comprobar la presencia de la mutación mediante secuenciación automática en un equipo marca Perkin Elmer, modelo 310, versión 3.0. ABI-CE1, con el kit ABI-PRISM.

Se llevó a cabo la amplificación del fragmento bajo las mismas condiciones previamente descritas. Posteriormente se realizó la purificación del fragmento amplificado, se llevó a cabo la reacción de secuenciación y después su purificación para finalmente ser corrido en el secuenciador automático (protocolo descrito en anexo).

Los resultados muestran la presencia de la mutación en la muestra del control positivo, sin embargo, los 5 sujetos que mostraron un patrón alterado de la migración por SSCP demostraron no presentar la mutación de Brunner (Figura 11). La tabla 18 muestra la secuencia de bases de la región de la mutación y del polimorfismo *Fnu4HI*, del sujeto con la mutación (control positivo) y de los cinco pacientes con TOC.

Este resultado demuestra la baja especificidad de los dos métodos empleados previamente.

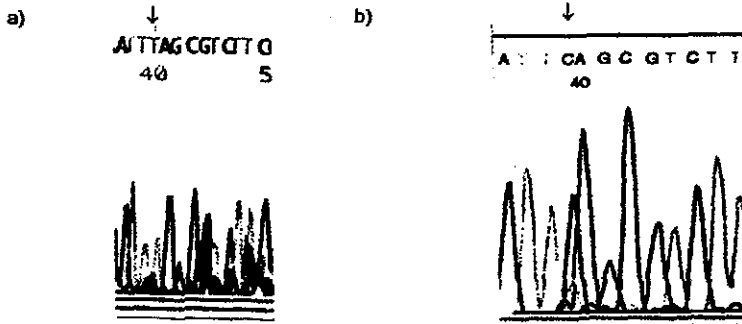
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 18. Secuencia de bases de las dos regiones del exon 8 del gen de la MAO-A.

Muestra	Secuencia de bases					
Control positivo	T	A	G	C	G	T
1	C	A	G	C	G	T
2	C	A	G	C	G	T
3	C	A	G	C	G	G
4	C	A	G	C	G	G
5	C	A	G	C	G	T

- Mutación de Brunner.  
 Polimorfismo *Fnu4HI*.

Figura 11. Identificación de la mutación de Brunner mediante secuenciación automática del exón 8.



- a) Corresponde a la secuencia del control positivo de un sujeto acarreador de la mutación. La flecha indica el cambio de una C por T en la posición 938 y b) es la secuencia de un paciente que no contiene la mutación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## V Discusión.

Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo apoyan la posible existencia de diferencias por género, en el desarrollo del trastorno obsesivo compulsivo.

La tabla 19 muestra un resumen de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

**Tabla 19. Resumen de los resultados.**

Polimorfismo	TOC		Subtipo clínico
	Mujeres	Hombres	
<i>EcoRV</i>	T de alelo 1	ns	TOC con depresión: T del alelo 1
<i>Fnu4HI</i>	ns	ns	TOC con síntomas no severos: T del 1
UVNTR	ns	ns	TOC con depresión: T del alelo 3
Haplotipo 1-3*	-	-	TOC con depresión: frecuencia 82%

Se muestra los resultados obtenidos para cada polimorfismo en el análisis por género y para cada uno de los subtipos clínicos.

T = transmisión.

\* Haplotipo *EcoRV*/*uVNTR*

Como podemos observar, los resultados confirman los hallazgos previos de una asociación positiva entre el polimorfismo *EcoRV* del gen de la MAO-A y mujeres con TOC, ya que se observó una transmisión preferencial del alelo 1, asociado con una baja actividad enzimática, en las mujeres comparado con el grupo de los hombres. Todo ello pudiera indicar o interpretarse como la posibilidad de que esta región pudiera estar relacionada con el desarrollo de diferentes subtipos del TOC definidos por el género. Asimismo, el análisis de las variables clínicas demostró nuevamente una mayor transmisión del alelo 1 en pacientes TOC que presentan comorbilidad con depresión; sin embargo, el análisis por género para esta variable clínica, no fue realizado debido al

número tan pequeño de mujeres que participaron en el estudio (Camarena et al, 1998).

El hallazgo anterior resulta aún más interesante por los resultados obtenidos con el polimorfismo funcional de la región promotora del gen. Los resultados mostraron una mayor transmisión del alelo 3 (variante de cuatro repeticiones) en pacientes TOC que presentan depresión comórbida.

El análisis del haplotipo formado por los polimorfismos *EcoRV* y *uVNTR* demostró que los pacientes con el TOC que presentan comorbilidad con depresión presentan una mayor frecuencia del haplotipo 1-3 (82%). Este dato, aunado a la presencia de desequilibrio de enlace en estas dos regiones podría indicar la existencia de un haplotipo de riesgo asociado al desarrollo de este subtipo particular del trastorno.

Hasta la fecha sólo existe un trabajo que sugiere una posible asociación entre las variantes del *EcoRV* y la actividad enzimática (Hotamisligil, Breakefield, 1991). Si tomamos en cuenta que es una mutación silenciosa que no provoca cambio en la secuencia codificante de la proteína, es posible que otra región en desequilibrio de enlace con ésta pudiera estar involucrada en la actividad de la MAO-A. Por los datos obtenidos en este estudio, podríamos sugerir que dicha región sea el polimorfismo *uVNTR*, cuyas características funcionales parecen estar involucradas en la capacidad enzimática de la MAO-A. Con base en lo anterior, es posible sugerir que estas dos regiones y otras aún no descritas actúen en combinación directa o indirecta sobre los mecanismos que determinan los niveles de actividad final de la MAO-A.



Recientemente, utilizando experimentos de transfección de constructos en líneas celulares de neuroblastoma y de coriocarcinoma que contenían los diferentes alelos del polimorfismo uVNTR, se demostró una mayor actividad transcripcional en los cultivos que tenían los alelos de 3.5 y 4 repeticiones comparado con los de 3 y 5 copias (Sabol et al., 1998). El resultado anterior es confirmado por el estudio realizado por Denney et al. (1999) en el que observa una baja actividad enzimática en cultivos celulares de fibroblastos de piel de individuos del género masculino portadores del alelo de 3 repeticiones (alelo 1) comparado con aquellos acarreadores del alelo con cuatro repeticiones (alelo 3). Sin embargo, será importante establecer si estos efectos pueden ser extrapolados a cultivos de mujeres.

La asociación encontrada entre pacientes TOC con depresión comórbida y el alelo de alta actividad transcripcional, del polimorfismo uVNTR del gen de la MAO-A, podrían sugerir que los sujetos portadores de estas variantes presentan una mayor cantidad de enzima disponible. Este dato, va en el mismo sentido que los estudios farmacológicos realizados en pacientes con TOC que muestran una eficaz respuesta terapéutica, al utilizar inhibidores de la MAO o fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina, cuyo propósito primordial es aumentar los niveles de serotonina en el espacio sináptico. Es posible que la asociación encontrada en este estudio pudiera indicar un efecto benéfico de los inhibidores de la MAO-A en este subtipo particular del trastorno. Recientemente, fue reportada una mejor respuesta terapéutica a moclobemida, un inhibidor selectivo de MAO-A, en mujeres con síntomas principalmente de ansiedad, comparado con hombres (Politi et al., 1999).

Aunque estos hallazgos resultan ser muy interesantes, será necesario comprobar si dicha asociación es característica del TOC que presenta comorbilidad con depresión, o si se encuentra asociado sólo a la depresión, lo cual sería posible comprobar mediante el estudio de un grupo de sujetos cuyo único diagnóstico sea el de depresión.

Finalmente, en el exon 8 se han reportado diferencias en su secuencia, la primera localizada en la base 941, mejor conocida como el polimorfismo *Fnu4H1* y la segunda, que introduce un codón de terminación en la base 936, conocida como la "mutación de Brunner". Con respecto a la primera, el análisis en el presente estudio no mostró la transmisión de un alelo particular en el análisis por género.

En cuanto a los diferentes subtipos clínicos, se observó una mayor transmisión del alelo 1 en pacientes que presentan síntomas no severos del trastorno, por lo que será importante comprobar estos resultados en una muestra mayor. Los hombres con TOC no mostraron la transmisión preferencial del alelo 2 reportado por Karayiorgou et al. (1999), ni en la muestra total, ni en el subgrupo que presenta comorbilidad con depresión.

A principio de los 90's se describió la llamada "mutación de Brunner" en sujetos que presentaban retraso mental leve y que presentaban conductas agresivas, exhibicionismo, voyerismo y piromanía, denominándolo así, como el síndrome de Brunner. Debido a que un síntoma característico en el TOC es la presencia de obsesiones agresivas, y que el 74% de los pacientes incluidos en el estudio las presentaban, se intentó identificar su presencia, mediante la técnica de SSCP.

Tomando en cuenta que sólo en la familia holandesa ha sido encontrada la mutación (Brunner et al., 1993), sorprendió que un alto número de muestras (10%) mostrara un patrón de migración que sugería su presencia. Sin embargo, la baja frecuencia de esta mutación y la alta posibilidad de encontrarlos frente a falsos positivos, requirió que se tratara de corroborar mediante un método recientemente publicado (Mejía et al., 2001). La metodología empleada por este grupo demostró no ser específica, ya que el patrón de bandas esperado para la presencia de la mutación no pudo ser detectado, aun en el control positivo. Finalmente, se empleó el método más directo de análisis mediante secuenciación automática, el cual mostró la ausencia de la mutación en los cinco pacientes en los que se observó por la técnica de SSCP, alteraciones en el patrón de migración. Como sabemos, la mutación se encuentra localizada en la base 936 y muy cerca de ahí, en la base 941 se localiza el polimorfismo *Fnu4HI*, por lo que podríamos pensar que la diferencia en el patrón de migración posiblemente fue ocasionada por la alteración en la conformación de la estructura de DNA que resulta de los cambios de bases en las dos regiones contiguas (Tabla 16).

Así es claro que, el estudio de la mutación en un número grande de muestras requiere de implementar otros tipos de metodologías de tamizaje con un mayor grado de especificidad y que permita una correcta y rápida detección.

Hasta la fecha, sólo ha sido reportada la presencia de la mutación en la familia holandesa reportada por Brunner et al. (1993). Dos grupos han intentado su búsqueda, el primero en 50 alcohólicos y 50 controles sanos (Parsian, 1999) y el segundo, en 100 individuos con conducta agresiva (Mejía et al., 2001) sin detectar un solo portador. Estos datos confirman que dicha mutación es muy

rara, por lo que será necesario llevar a cabo un análisis en una muestra de mayor tamaño, así como también demostrar su posible asociación con conductas agresivas, lo que hasta la fecha, solo ha sido comprobado en ratones knock-out para el gen de la MAO-A.

Los hallazgos obtenidos en este estudio y trabajos publicados del análisis de regiones polimórficas de los genes de la MAO-A y de la COMT (catecol-orto-metil transferasa), apoyan la hipótesis de que existen diferentes expresiones del TOC influenciada por el género (Camarena et al., 1998; Karayiorgou et al., 1999). Estos datos moleculares apoyan a diversos hallazgos que durante varios años han sido reportados y que muestran también diferencias entre los pacientes con TOC hombres y mujeres (Bogetto et al., 1999). En particular, se han reportado diferencias por género, en cuanto a la comorbilidad con algunos trastornos, como por ejemplo la presencia de depresión en mujeres, comparado con los hombres (Camarena et al., 2001). En la muestra analizada en este estudio se observó una alta prevalencia de depresión (26%), la cual es superior a la reportada por Vega et al. (1998) en población abierta (7.8%). Sin embargo, la comparación por género no muestra en las mujeres una mayor prevalencia de depresión, lo cual probablemente sea debido a que el tamaño de la muestra de las mujeres fue pequeño.

Otra diferencia por sexo que ha sido reportada, es con respecto a la presencia de tics y a la edad de inicio temprano (Bogetto et al., 1999). Aunque los datos no alcanzaron significancia estadística, es claro que los pacientes hombres presentan una mayor prevalencia de tics. Este dato, concuerda con los hallazgos reportados por diversos grupos, comprobando la existencia de diferencias por género en esta variable clínica (Noshirvani et al., 1991; Bogetto

et al, 1999; Camarena et al., 2001). Sin embargo, para el caso de la edad de inicio, no se observaron diferencias por género posiblemente debidas al tamaño de la muestra.

Todas estas diferencias clínicas que han sido reportadas, han sugerido la posible existencia de diferentes formas de expresión del trastorno en hombres y mujeres. En este mismo sentido, diversos investigadores y médicos creen que cada órgano del cuerpo, no solo los relacionados con la reproducción, tienen la capacidad de responder de manera diferente dependiendo del sexo. Esta propuesta surge a partir de la observación ya mencionada en el párrafo anterior, sobre las diferencias por género en la incidencia y severidad de diversos trastornos y lo cual pudiera estar relacionado con las diferentes respuestas celulares. Se ha propuesto que esta diversidad surge debido a diferencias entre las células femeninas y masculinas a nivel del contenido genético y de su expresión. Se calcula que en los cromosomas sexuales se encuentra aproximadamente el 5% del total del genoma humano, de esta manera, los genes que se encuentran localizados en el cromosoma Y y que no tiene su contraparte en el cromosoma X o en los autosomas, tendrán una expresión limitada sólo en los hombres. Para el caso de genes localizados en el cromosoma X, se ha observado que algunos son expresados en mayor grado en mujeres que en hombres, a pesar de que el proceso de inactivación iguala la dosis efectiva en las células femeninas y masculinas. Sin embargo, no todos los genes en el cromosoma inactivado escapan de este mecanismo (Carrell et al., 1999). De acuerdo con Carrel et al. (1999), estos escapes no son raros, se calcula que son alrededor del 19% de los genes del cromosoma X.

Otro importante hallazgo por parte de este grupo es que la inactivación, no es al azar. Se ha observado que el 21% de los genes que escapan se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma X humano comparado con tan solo un 3% del brazo largo. El origen de estos patrones de expresión y organización se piensa que podrían estar vinculados con la evolución de los cromosomas sexuales. Por otro lado, es posible que estos patrones puedan tener importantes implicaciones en el desarrollo de diversas enfermedades ligadas al cromosoma X en el humano (Disteche, 1999).

Todas estas propuestas resultan de gran importancia en el estudio del gen de la MAO-A debido a las siguientes razones. La primera es que por su localización en el brazo corto del cromosoma X, existe una alta probabilidad de que sea uno de los genes que escapan a la inactivación. De hecho, Hotamisligil y Breakefield (1991) propusieron que las diferencias por género en cuanto a los niveles altos de la actividad de la MAO-A observadas en las mujeres, comparado con la de los hombres podrían ser debidas a que el cromosoma X no se encuentra totalmente inactivado.

Carrel et al. (1999) han analizado 224 genes ligados al cromosoma X, sin embargo, el gen de la MAO-A fue uno de los que no fueron incluidos en sus primeros estudios, por lo que no se puede tener por lo pronto un dato que nos podría ayudar a explicar las diferencias moleculares por género reportadas para este gen. Sin embargo, el hecho de que las mujeres presenten una mayor actividad enzimática de la MAO-A podría estar comprobando de manera indirecta, la hipótesis acerca de que algunos genes localizados sobre el cromosoma X inactivo no se encuentran apagados, llevando a la producción de niveles altos de productos de estos genes en las células de las mujeres.

Con respecto a lo anterior, resulta interesante que a pesar de que las mujeres, presentan en general, niveles altos de la actividad de MAO-A, las mujeres con TOC presentan una mayor transmisión del alelo de baja actividad enzimática. Aunque no existen datos bioquímicos que demuestren la presencia de niveles bajos de la MAO-A en el TOC si podemos especular, que podría tratarse de una característica bioquímica en este trastorno y en particular en las mujeres. De cualquier manera, los datos moleculares obtenidos en el presente estudio parecen indicar que la actividad de la MAO-A podría encontrarse reducida en este subtipo del trastorno, y es posible pensar que estos pacientes se vean favorecidos con una mejor respuesta farmacológica a los inhibidores de la MAO o a los inhibidores de la recaptura de serotonina.

Si todos estos datos resultan tener alguna implicación terapéutica, sería posible pensar que en un futuro se pueda llegar a decidir el tipo medicamento más adecuada dependiendo de las variantes moleculares que porte cada paciente.

En resumen, los hallazgos reportados proporcionan evidencia molecular para identificar un posible subtipo clínico del trastorno obsesivo compulsivo caracterizado por presentar depresión comórbida y sustenta la hipótesis de que existe una expresión diferente de la enfermedad influenciada por el género.

## VI Conclusiones.

1. El polimorfismo *EcoRV* del gen de la MAO-A parece indicar la presencia de dimorfismo sexual en el trastorno obsesivo compulsivo.
2. Las mujeres con TOC tienen una transmisión mas frecuente del alelo 1 del polimorfismo *EcoRV*, asociado con una baja actividad enzimática.
3. En el subgrupo de pacientes que presentan comorbilidad con depresión, se observa tambien, una mayor transmisión del alelo 1 del polimorfismo *EcoRV*.
4. El polimorfismo *uVNTR* mostró asociación entre la variante 3 y el subgrupo de TOC que presenta comorbilidad con depresión.
5. El 82% de los pacientes TOC con depresión comórbida, presentan el haplotipo 1-3, conformado por los polimorfismos *EcoRV* y *uVNTR*.
6. El alelo 1 del polimorfismo *Fnu4HI* presenta una mayor transmisión en los pacientes TOC que no presentan síntomas severos.
7. El análisis de la mutación de Brunner mediante el método de SSCP demostró ser un método de baja sensibilidad para la detección de cambios de una sola base.
8. La mutación de Brunner, analizada hasta la fecha en tres diferentes poblaciones, demuestra ser una mutación con muy baja frecuencia.
9. El gen de la MAO-A distingue de manera molecular a un subtipo clínico del trastorno caracterizado por presentar depresión.
10. Los polimorfismos analizados no muestran la transmisión de una variante particular en los subtipos caracterizados por presencia de tics, obsesiones de simetría y edad de inicio.



**BIBLIOGRAFIA.**

Alexopoulos GS, Lieberman KW, Frances RJ (1983). Platelet MAO activity in alcoholic patients and their first-degree relatives. *Am J Psychiatry* 140(11):1501-1504.

Alsobrook II JP, Leckman JF, Goodman WK, Rasmussen SA, Pauls DL (1999). Segregation analysis of obsessive compulsive disorder using symptom-based factor scores. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 88: 669-675).

Alsobrook JP II, Pauls DL (1998). The genetics of obsessive-compulsive disorder. In: Jenike MA, Baer L, Minichiello WE, eds. *Obsessive Compulsive Disorders: Theory and management: A guide for clinicians, patients and families*. 3<sup>rd</sup> ed. Littleton, MA: Year Book Medical Publishers, Inc.

American Psychiatry Association, Committee on Nomenclature and Statistics. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fourth edition. American Psychiatry Association, Washington D.C. 1994: 428-434.

Bach AW, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembeneck ME, Kwan S-W, Seeberg PH, Shih JC (1998). cDNA cloning of human monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4934-4938.

Baer L (1993). Factor analysis of symptom subtypes of obsessive compulsive disorder and their relation to personality and tics. *J Clin Psychiatry* 55: 18-23.

Baxter L, Phelps M, Mazzotti J (1987). Local cerebral glucose metabolic rates of obsessive compulsive disorder compared to unipolar depression and normal controls. *Arch Gen Psychiatry* 44: 211-218.

Belfrage H, Lidberg L, Örelund L (1992). Platelet monoamine oxidase activity in mentally disordered violent offenders. *Acta Psychiatr Scand* 85(3): 218-221.

Bengel D, Greenberg BD, Cora-Locatelli G, Altemus M, Heils A, Li Q, Murphy DL (1999). Association of the serotonin transporter promoter regulatory region polymorphism and obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry* 4(5):463-466.

Berlin I, Saïd S, Spreux-Varoquaux O, Olivares R, Launay JM, et al. (1995). Monoamine oxidase A and B activities in heavy smokers. *Biol Psychiatr* 38(11): 756-761.

Billett EA, Richter MA, Sam F, Swinson RP, Dai XY, King N, Kennedy J (1998). Investigation of dopamine system genes in obsessive compulsive disorder. *Psychiatr Genet* 8: 163-169.

Billett EA, Richter MA, King N, Heils A, Lesch KP, Kennedy JL (1997). Obsessive compulsive disorder, response to serotonin reuptake inhibitors and the serotonin transporter gene. *Mol Psychiatry* 2, 403-406.

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

Black J (1992). Obsessive-compulsive disorder: a clinical update. *Mayo Clin Proc* 67: 266-275.

Bogetto F, Venturello S, Albert U, Maina G, Ravizza L. (1999). Gender-related clinical differences in obsessive-compulsive disorder. *Eur Psychiatry* 14: 434-441.

Boulton AA, Yu PH, Tipton KF (1988). Biogenic amine adducts, monoamine oxidase inhibitors, and smoking. *Lancet* 1(8577):114-115 (Letter)

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

Brett PM, Curtis D, Robertson MM, Gurling HM (1995). The genetic susceptibility to Gilles de la Tourette syndrome in a large multiple affected British kindred: linkage analysis excludes a role for the genes coding for dopamine D1, D2, D3, D4, D5 receptors, dopamine beta hydroxylase, tyrosinase, and tyrosine hydroxylase. *Biol Psychiatry* 37(8):533-540.

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.

Buchsbaum MS, Coursey RD, Murphy DL (1976). The biochemical high-risk paradigm: behavioral and familial correlates of low platelet monoamine oxidase activity. *Science* 194(4262):339-341.

Camarena B, Cruz C, de la Fuente JR, Nicolini H (1998). A higher frequency of a low activity-related allele of the MAO-A gene in females with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Genet* 8: 255-257.

Caraveo J, González C, Ramos L. Concurrent validity of the DIS experience with psychiatric patients in México city. *Hispanic Journal Behavioral Sciences* 1991; 13:63-67.

Carey G, Gottesman II (1981). Twin and family studies of anxiety, phobic, and obsessive disorders. In: Klein DF, Rabkin JG, eds. *Anxiety: New researchers and changing concepts*. New York, NY: Raven Press, Pags. 117-136.

Carr LA, Basham JK (1991). Effects of tobacco smoke constituents on MPTP-induced toxicity and monoamine oxidase activity in the mouse brain. *Life Sci* 48(12):1173-1177.

Carr LA, Rowell PP (1990). Attenuation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity by tobacco smoke. *Neuropharmacology* 29(3):311-314.

Carrel L, Cottle AA, Goglin KC, Willard HF (1999). A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14440-14444.

Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, et al. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAO-A. *Science* 268(5218):1763-1766.

Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C et al. (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16:297-307.

Cavalini MC, Macciardi F, pasquale L, Bellodi L, Smeraldi E (1995). Complex segregation analysis of obsessive-compulsive and spectrum related disorders. *Psychiat Genet* 5 (Suppl 1): s31

Chen K, Wu HF, Grimsby J, Shih JC (1994). Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol Pharmacol* 46(6):1226-1233

Chen K, Wu HF, Shih JC (1996). Influence of C terminus on monoamine oxidase A and B catalytic activity. *J Neurochem* 66(2):797-803.

Chen ZY, Hofamisliligil GS, Huang JK, Wen L, Exxeddine D, Aydin-Muderrisoglu A, Powell JF, Huang RH, Breakefield XO, Craig I, Hsu YP. (1991). Structure of the human gene for monoamine oxidase type A. *Nucleic Acids Res* 19(16):4537-4541.

Clifford CA, Murray RM, Fulker DW (1984). Genetic and environmental influences on obsessional traits and symptoms. *Psychol Med* 14: 791-800.

Cloninger CR. (1987a). A systemic method for clinical description and classification of personality variants. *Arch Gen Psychiatry* 44:573-578.

Cloninger CR (1987b). Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236: 410-416-

Craig I (1994). Misbehaving monoamine oxidase gene. A nonsense mutation in the X-linked monoamine oxidase A gene has been associated with sex-linked aggressive behaviour. *Curr Biology* 4(2): 175-177.

Craddock N, Daniels J, Roberts E, Rees M, Mc Guffin P, Owen M (1995). No evidence for allelic association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms. *Am J Med Genet* 60: 322-324.

Cruz C, Camarena B, King N, Páez F, Sidenberg D, de la Fuente JR, Nicolini H (1997). Increased prevalence of the seven-repeat variant of the dopamine D4 receptor gene in obsessive-compulsive disorder with tics. *Neurosci Lett* 231:1-4.

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.

Delgado PL, Moreno F (1998). Different roles for serotonin in anti-obsessional drug action and the pathophysiology of obsessive-compulsive disorder. *Br J Psychiatry* 173 (supp. 35): 21-25.

Denney RM, Koch H, Craig IW (1999). Association between monoamine oxidase A activity in human male skin fibroblasts and genotype of the MAOA promoter-associated variable number tandem repeat. *Hum Genet* 105(6):542-551.

Denney RM, Sharma A, Dave SK, Waguespack A (1994). A new look at the promoter of the human monoamine oxidase A gene: mapping transcription initiation sites and capacity to drive luciferase expression. *J Neurochem* 63: 843-856.

Devor EJ, Cloninger CR, Hoffman PL, Tabakoff B. (1993). Association of monoamine oxidase (MAO) activity with alcoholism and alcoholic subtypes. *Am J Med Genet* 48(4):209-213.

Disteche CM (1999). Escapees on the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14180-14182.

Doyle A, Hucklebridge F, Evans P, Clow A (1996). Salivary monoamine oxidase A and B inhibitory activities correlate with stress. *Life Sci* 59(16):1357-1362.

Erfurth A, Schmauss M (1993). Monoamine oxidase inhibitors in the treatment of obsessive disorders. Two case reports and review of the literature. *Nervenarzt* 64(1):70-2.

Falk CT, Rubinstein P (1987). Haplotype relative risk: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet* 51:227-233.

Faraj BA, Davis DC, Camp VM, Mooney AJ, Holloway T, Barika G (1994). Platelet monoamine oxidase activity in alcoholics, alcoholics with drug dependence, and cocaine addicts. *Alcohol Clin Exp Res* 18(5): 1114-1120.

Flament MF, Rapoport JL, Murphy DL et al. (1987) Biochemical changes during clomipramine treatment of childhood obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 44: 219-225.

Fowler CJ, Mantle TJ, Tipton KF (1982). The nature of the inhibition of rat liver monoamine oxidases types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline. *Biochem Pharmacol* 31: 3555-61.

Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, MacGregor R, Alexoff D, Shea C, Schlyer D, Wolf AP, Warner D, Zezulkova I, Cilento R (1996<sup>a</sup>) Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature* 379(6567):733-736.

Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, Shea C, Alexoff D, MacGregor RR, Schlyer DJ, Zezulkova I, Wolf AP (1996<sup>b</sup>). Brain monoamine oxidase A inhibition in cigarette smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):14065-9.

Furlong R, Rubinsztein J, Walsh C, Paykel E, Rubinsztein D (1999). Analysis of the monoamine oxidase A (MAO-A) gene in bipolar affective disorder by association studies, meta-analyses, and sequencing of the promoter. *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genet)* 88:398-406.

Gade R, Muhleman D, Blake H, MacMurray J, Johnson P, Verde R, Saucier G, Comings DE (1998). Correlation of length of VNTR alleles at the X-linked MAOA gene and phenotypic effect in Tourette syndrome and drug abuse. *Mol Psychiatry* 3: 50-60.

Garrick NA, Murphy DL (1982). Monoamine oxidase type A: differences in selectivity towards norepinephrine compared to serotonin. *Biochem Pharmacol* 31:4061-4066.

Gerlach M, Riederer P, Youdim MBH (1996). Molecular mechanisms for neurodegeneration: synergism between reactive oxygen species, calcium and excitotoxic amino acids. *Adv Neurol* 69:177-194.

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.

Glover V, Sandler M (1986). Clinical chemistry of monoamine oxidase. *Cell Biochem Funct* 4: 89-97.

Glover V, Sandler M, Owen F, Riley GJ (1977). Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature* 265(5589): 80-81.

Goodman W, McDougie C, Lawrence P. (1990). Beyond the serotonin hypothesis: a role for dopamine in some forms of obsessive compulsive disorder? *J Clin Psychiatry* 51(Suppl 8): 36-42.

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: 3637-41

Grimsby J, Toth M, Chen K, Kumazawa T, Klaidman L et al. (1997). Increased stress response and  $\beta$ -phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nature Genet* 17:1-5.

Hare MLC (1928). Tyramine oxidase, a new enzyme system in the liver. *Biochem J* 22: 968-979.

Hawi Z, Gibson S, Straub R, Walsh D, Kendler K, Gill M (1999). Schizophrenia and HLA: No association with PCR-SSOP typed classical loci in a large Irish familial sample. *Am J Med Genet* 88: 422-429.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66(6):2621-2624.

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.

Hiro I, Tsugeno Y, Hirashiki I, Ogata F, Ito A (1996). Characterization of wild-type and mutant forms of human monoamine oxidase A and B expressed in a mammalian cell line. *J Biochem* 124(4):759-765.

Ho GY, Bailey-Wilson JE (2000). The transmission/disequilibrium test for linkage on the X chromosome. *Am J Hum Genet* 66(3):1158-1160.

Hollander E, Fay M, Cohen B, Campeas R, Gorman JM, Liebowitz MR (1988). Serotonergic and noradrenergic sensitivity in obsessive-compulsive disorder: behavioral findings. *Am J Psychiatry* 145: 1015-1023.

Hollander E, Decaria CM, Nitescu A, et al. (1992). Serotonergic function in obsessive-compulsive disorder: behavioral and neuroendocrine responses to oral m-chlorophenylpiperazine and fenfluramine in patients and healthy volunteers. *Arch Gen Psychiatry* 49: 21-28.

Holzer JC, Goodman WK, McDougle GJ, et al. (1994). Obsessive-compulsive disorder with and without a chronic tic disorder: a comparison of symptoms in 70 patients. *Br J Psychiatry* 164: 469-473.

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

Hsu Y-P, Loh EW, Chen WJ, Chen C-C, Yu J-M, et al. (1996). Association of monoamine oxidase A alleles with alcoholism among male Chinese in Taiwan. *Am J Psychiatr*: 153:1209-1211.

Hsu YP, Weyler W, Chen S, Sims KB, Rinehart WB (1988). Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences. *J Neurochem* 51(4): 1321-1324.

Jenike MA, Baer L, Minichiello WE, Rauch SL, Buttolph ML (1997). Placebo-controlled trial of fluoxetine and phenzazine for obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 154: 1261-1264.

Joffe RT, Bakish D (1994). Combined SSRI-moclobemide treatment of psychiatric illness. *J Clin Psychiatry* 55(1):24-25.

Jonhston JP (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem pharmacol* 17(7): 1285-97.

Jorm AF, Henderson PA, Jacomb PA, Christensen H, Korten AE, Rodgers B, Tan X, Easteal S (2000). Association of a functional polymorphism of the monoamine oxidase A gene promoter with personality and psychiatric symptoms. *Psychiatric Genet* 10: 87-90.

Jorm AF, Henderson PA, Jacomb PA, Croft L, Easteal S (1997). Quantitative trait loci for neuroticism: an allelic association study with the serotonin receptor (HTR2) and monoamine oxidase A (MAOA) genes. *Pers Indiv Differ* 22: 287-290.

Karayorgou M, Sobin C, Blundell LM, Galke BL, Malinova L, Goldberg P, Ott J, Gogos JA (1999). Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAOA on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 45:1178-1189.

Karayorgou M, Altman M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J, Gogos JA (1997). Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4572-4575.

Kearney EB, Salach JL, Walker WH, Seng RL, Singer TP (1971). The covalently bound flavin of hepatic monoamine oxidase. Isolation and sequence of a flavin peptide and evidence for binding at the 8<sup>a</sup> position. *Eur J Biochem* 24: 321-327.

Konradi C, Ozellus L, Breakefield XO (1992). Highly polymorphic (GT)<sub>n</sub> repeat sequence in intron II of the human MAOB gene. *Genomics* 12:176-177.

Korte SM, Meijer OC, De Kloet RE, Buwalda B, Keijsers J et al. (1996). Enhanced 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in forebrain regions of aggressive house mice. *Brain Res* 736(1-2):338-343.

Kunugi H, Ishida S, Kato T, Tatsumi M, Sakai T, Hattori M, Hirose T, Nanko S (1999). A functional polymorphism in the promoter region of monoamine oxidase-A gene and mood disorders. *Molecular Psychiatry* 4: 393-395.

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



Kwan SW, Lewis DA, Zhou BP, Abell CW (1995). Characterization of a dinucleotide binding site in monoamine oxidase B by site-directed mutagenesis. *Arch Biochem Biophys* 316(1): 385-391.

Lahiri DH, Numberger JI Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.

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.

Laux G, Classen W, Sofic E, Becker T, Riederer P, Lesch KP, Struck M, Beckmann H (1990). Clinical, biochemical and psychometric findings with the new MAO-A-inhibitors moclobemide and brofaromine in patients with major depressive disorder. *J Neural Transm Suppl* 32:189-195.

Leboyer M, Bellivier F, Nosten-Bertrand M, Jouvent R, Pauls D, Mallet J (1998). Psychiatric genetics: search for phenotypes. *TINS* 21:102-105.

Leckman JF, Gershon ES, Nichols AS, Murphy DL (1977). Reduced MAO activity in first-degree relatives of individuals with bipolar affective disorders. A preliminary report. *Arch Gen Psychiatry* 34(5):601-606.

Levy ER, Powell JF, Buckle VJ, Hsu Y-PP, Breakefield XO, Craig IW. (1989). Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xp11.23-11.4 by in situ hybridization: implications for Norrie disease. *Genomics* 5:368-370.

Lidberg L, Modin I, Orelund L, Tuck JR, Gillner A (1985). Platelet monoamine oxidase activity and psychopathy. *Psychiatry Res* 16(4):339-43.

Lieberman A, Olanow CW, Youdim M, Tipton KF (1993). *Monoamine oxidase: It's role in normal and disease states*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Liebowitz MR, Hollander E, Schneier F, Campeas R, Welkowitz L, Hatterer J, Fallon B. (1990). Reversible and irreversible monoamine oxidase inhibitors in other psychiatric disorders. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 360: 29-34.

Lim L, Powell J, Sham P, Castle D, Hunt N, Murray R, Gill M (1995). Evidence for a genetic association between alleles of monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genet)* 60: 325-331.

- López-Ibor JJ, Ruiz JS, López Ibor MI, et al. (1995). Obsessive-compulsive disorder and depression. *Actas Luso-Españolas Neurol, Psiquiatr Ciencias Afires* 23: 97-113.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J (1995). Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34(13):4202-4210.
- Luxenberg JS, Flament M, Swedo S, Rapoport J, Rapoport S (1988). Neuroanatomic abnormalities in obsessive-compulsive disorder detected in quantitative x-ray computed tomography. *Am J Psychiatry* 145: 1089-1094.
- Manuck SB, Flory JD, Ferrell RE, Mann JJ, Muldoon MF (2000). A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with variability in aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity. *Psychiatry Res* 95: 9-23.
- Marazziti D, Hollander E, Lensi P, Ravagli S, Cassano GB (1992). Peripheral markers of serotonin and dopamine function in obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res* 42(1):41-51.
- Mattiazzi PL, Ihde D, pizza A, Cappellini R, Bodmer WF (1970). New approach to population and genetics and segregation analysis of the HLA system. In: *Histocompatibility testing 1970*. Terasaki PI, editor. Copenhagen: Munksgaard. Pag: 193-205.
- McDougle CJ, Epperson CN, Price LH, Gelernter J (1998). Evidence for linkage disequilibrium between serotonin transporter protein gene (SLC6A4) and obsessive compulsive disorder. *Mol Psychiatry* 3, 270-273.
- McDougle J, Goodman WK, Leckman JF et al (1990). Neuroleptic addition in fluvoxamine-refractory obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 147: 652-654.
- McGuire PK, Bench CJ, Frith CD, et al. (1994). Functional anatomy of obsessive-compulsive phenomena. *Br J Psychiatry* 164: 459-468.
- Mejia JM, Ervin FR, Palmour R, Tremblay RE (2001). Aggressive behavior and Brunner Syndrome: No evidence for the C936T mutation in a population sample. *Am J Med Genet* 105: 396-397.

- Micallef J, Blin O (2001). Neurobiology and clinical pharmacology of obsessive-compulsive disorder. *Clin Neuropharmacol* 24: 191-207.
- Mitoma J, Ito A (1992). Mitochondrial targeting signal of rat liver monoamine oxidase B is located at its carboxy terminus. *J Biochem* 111(1):20-24.
- Mundo E, Richter MA, Sam F, Macciardi F, Kennedy JL (2000). Is the 5-HT(1Dbeta) receptor gene implicated in the pathogenesis of obsessive-compulsive disorder? *Am J Psychiatry* 157(7):1160-1161.
- Muramatsu T, Matsushita S, Kanba S, Higuchi S, Manki H (1997). Monoamine oxidase genes polymorphisms and mood disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genet)* 74: 494-496.
- Murphy DL, Belmaker RH, Buchsbaum M, Martin NF, Ciaranello R, Wyatt RJ (1977). Biogenic amine-related enzymes and personality variations in normals. *Psychol Med* 17(1):149-57.
- Murphy DL, Kalin NH (1980). Biological and behavioral consequences of alterations in monoamine oxidase activity. *Schizophrenia Bull* 6(2): 355-367.
- Murphy DL, Wyatt RJ (1972). Reduced monoamine oxidase activity in blood platelets from schizophrenic patients. *Nature* 238(5361):225-226.
- Neff NH, Yang HY (1974). Another look at the monoamine oxidases and the monoamine oxidase inhibitor drugs. *Life Sci* 14(11): 2061-74.
- Nestadt G, Lan T, Samuels J, Riddle M, Bienvenu OJ 3rd, Liang KY, Hoehn-Saric R, Cullen B, Grados M, Beaty TH, Shugart YY (2000). Complex segregation analysis provides compelling evidence for a major gene underlying obsessive-compulsive disorder and for heterogeneity by sex. *Am J Hum Genet* 67(6):1611-1616.
- 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.
- Nicolini H, Cruz C, Camarena B, Orozco B, Kennedy JL, King N, Weissbecker K, de la Fuente JR, Sidenberg D (1996). DRD2, DRD3 and 5HT2A receptor genes polymorphisms in obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry* 1:461-465.

- Nicolini H, Cruz C, Camarena B, Páez F, de la Fuente JR (1999). Understanding the genetic basis of obsessive-compulsive disorder. *CNS Spectrums* 4: 32-48.
- Nicolini H, Fresán A (2000). Escalas de evaluación de los trastornos afectivos. En: Apiquián R, Fresán A, Nicolini H. *Evaluación de la Psicopatología. Escalas en español*. Ed. Ciencias y Cultura Latinoamericana México, D.F. Pag: 49-59.
- Nicolini H, Hanna G, Baxter L Jr, Schwartz J, Weissbecker K, Spence MA (1991). Segregation analysis of obsessive compulsive and associated disorders: preliminary results. *Ursus Medicus* 1: 25-28.
- Nicolini H, Herrera K, Páez F, Sánchez de Carmona M, Orozco B, Lodeiro G, de la Fuente JR (1996). Traducción al español y confiabilidad de la escala Yale-Brown para el trastorno obsesivo-compulsivo. *Salud Mental* 19 (Supl.3):13-16.
- O'Carroll AM, Fowler CJ, Phillips JP, Tobia I, Tipton KF (1983). The deamination of dopamine by human brain monoamine oxidase. Specificity for the two enzyme forms in seven brain regions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 322(3): 198-202.
- Olivier B, Mos J (1992). Rodent models of aggressive-behavior and serotonergic drugs. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr* 16:847-870.
- Oreland L, Ekblom J, Garpenstrand H, Hallman J (1998). Biological markers, with special regard to platelet monoamine oxidase (trbc-MAO), for personality and personality disorders. *Adv Pharmacol* 42:301-304
- Oreland L, Fowler CJ, Schalling D (1981). Low platelet monoamine oxidase activity in cigarette smokers. *Life Sci* 29(24):2511-2518.
- Oxenstierna G, Edman G, Iselius L, Oreland L, Ross SB, Sedvall G (1986). Concentrations of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of twins and unrelated individuals—a genetic study. *J Psychiatr Res* 20(1):19-29.
- 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.

Parsian A (1999). Sequence analysis of exon 8 of MAO-A gene in alcoholics with antisocial personality and normal controls. *Genomics* 55: 290-295.

Parsian A, Suarez BK, Tabakoff B, Hoffman P, Ovchinnikova L, Fisher L, Cloninger CR (1995). Monoamine oxidases and alcoholism: I. Studies in unrelated alcoholics and normal controls. *Am J Med Genet* 60: 409-416.

Parsian A, Todd R (1997). Genetic association between monoamine oxidase and manic-depressive illness: comparison of relative risk and haplotype relative risk data. *Am J Med Genet*: 74: 475-479.

Pato MT, Pato CN, Kennedy JL, Pauls LD (1999). Summary of the genetics of obsessive-compulsive disorder proceedings of the third IOCDC. *CNS Spectrum* 4: 22-24.

Pauls DL, Alsobrook JP, Phil M, Goodman W, Rasmussen S, Leckman JF (1995). A family study of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 152: 76-84.

Pauls DL, Leckman JF (1986). The inheritance of Gilles de la Tourette's syndrome and associated behaviors. Evidence for autosomal dominant transmission. *N Engl J Med* 315: 993-997.

Pauls DL, Towbin KE, Leckman JF, Zahner GEP, Cohen DJ (1986). Gilles de la Tourette's syndrome and obsessive-compulsive disorder: evidence supporting a genetic relationship. *Arch Gen Psychiatry* 43: 1180-1182.

Pauls DL, Pakstis AJ, Kurlan R, et al. (1990). Segregation and linkage analyses of Gilles de la Tourette's syndrome and related disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 29: 195-203.

Pauls DL, Alsobrook J, Goodman W, et al. (1995). A family study of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 152: 76-84.

Preisig M, Bellivier F, Fenton B, Baud P, Berney A, Courtet P, Hardy P, Golaz J, Leboyer M, Mallet J, Matthey ML, Mouthon D, Neidhart E, Nosten-Bertrand M, Stadelmann Dubuis E, Guimon J, Ferrero F, Buresi C, Malafosse A (2000). Association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms: results of a multicenter study. *Am J Psychiat* 157: 948-955.

Plomin R, DeFries JC, McClearn GE, Rutter M (1997). Investigating the genetics of human behavior. En: *Behavioral Genetics*. Ed. W.H. Freeman and Company, New York, 3<sup>rd</sup> edición. Pag: 67-76.

Rasmussen SA, Tsuang MT (1986). Clinical characteristics and family history in DSM-III obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 143: 317-322.

Rauch SL, Jenike MA, et al. (1994). Regional cerebral blood flow measured during symptom provocation in obsessive-compulsive disorder using oxygen 15-labelled carbon dioxide and positron emission tomography. *Arch Gen Psychiatry* 51: 62-70.

Robinson D, Wu H, Munne RA, et al (1995). Reduced caudate nucleus volume in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 52: 393-398.

Rolfs A, Schuller I, Finckh, Weber-Rolfs I (1992). Single-strand conformation polymorphism. En: *PCR: clinical diagnostics and research*. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, 2<sup>a</sup>. Ed. pp: 165-167.

Rubinsztein DC, Leggo J, Goodburn S, Walsh C, Jain S, Paykel ES (1996). Genetic association between monoamine oxidase A microsatellite and RFLP alleles and bipolar affective disorder: analysis and meta-analysis. *Human Molec Genet* 5: 779-782.

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

Samochowiec J, Lesch KP, Rottmann M, Smolka M, Syagailo YV, Okladnova O, Rommelspacher H, Winterer G, Schmidt LG, Sander T (1999). Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. *Psychiatri Res* 86: 67-72.

Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS (1992). Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res* 20(4): 871-878.

Sánchez de Carmona M, Páez F, López J, Nicolini H. Traducción y confiabilidad del Inventario de Temperamento y Carácter (ITC) (1996). *Salud Mental* 19 (Supl.3):5-9.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74:5463-5467.

Sasson Y, Zohar J (1996). New developments in obsessive-compulsive disorder research: implications for clinical management. *Int Clin Psychopharmacol* 11: 3-12.

Saura J, Bleuel Z, Ulrich J, Mendelowitsch A, Chen K, et al. (1996). Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization. *Neuroscience* 70(3): 755-74.

Saura J, Kettler R, Da Prada M, Richards JG (1992). Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19-6327 in vitro: localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. *J Neurosci* 12(5): 1977-99.

Saura J, Richards JG, Mahy N (1994). Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs. *Neurobiol Aging* 15(4): 399-408.

Schatzberg AF (2000). Clinical efficacy of Reboxetine in major depression. *J Clin Psychiatry* 61(supp 10): 31-38.

Schooler C, Zahan TP, Murphy DL, Buschbaum MS (1978). Psychological correlates of monoamine oxidase activity in normals. *J Nervous and Mental Disease* 166:166-169.

Schwartz JM (1997). Obsessive-Compulsive Disorder. *Science & Medicine*, March/April: 14-23.

Schulze TG, Muller DJ, Scherk H, Ohraun S, Syagailo YV, Windemuth C, Neidt H, Stober G, Nothen MM, Maier W, Lesch KP, Rietschel M (1999). *Mol Psychiatry* 4(Supp 1): S98.

Shih JC (1991). Molecular basis of human MAO A and B. *Neuropsychopharmacology* 4(1): 1-7.

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

Suzuki O, Katsumata Y, Oya M (1981). Oxidation of  $\beta$ -phenylethylamine by both types of monoamine oxidase: examination of enzymes in brain and liver mitochondria of eight species. *J Neurochem* 36(3): 1298-301.

Swedo SE, Leonard H, Shapiro MB et al. (1993) Sydenham's chorea: physical and psychological symptoms of St Vitus's dance. *Paediatrics* 91: 706-713.

Terwilliger JD, Ott J (1992). A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum Hered* 42(6):337-346.

Thoren P, Askeng M, Bertilsson L et al. (1980). Clomipramine treatment of obsessive-compulsive disorder. II Biochemical aspects. *Arch Gen Psychiatry* 40: 1085-1089.

Tipton KF, O'Carroll AM, McCrodden JM (1987). The catalytic behaviour of monoamine oxidase. *J Neural Transm* 23 (suppl.): 25-35.

Vanyukov MM, Moss HB, Yu LM, Dekka R (1995a). A dinucleotide repeat polymorphism at the gene for monoamine oxidase A and measures of aggressiveness. *Psychiatry Res* 59: 35-41.

Vanyukov MM, Moss HB, Yu LM, Tarter RE, Dekka R (1995b). Preliminary evidence for an association of a dinucleotide repeat polymorphism at the MAO-A gene with early onset alcoholism/substance abuse. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 60:122-126.

Vega W, Kolody B, Aguilar-Gaxiola S, Alderete E, Catalano R, Caraveo-Anduaga J (1998). Lifetime prevalence of DSM-III-R Psychiatric disorders among urban and rural Mexican Americans in California. *Arch Gen Psychiatry* 55: 771-778.

von Knorring L, Oreland L, Winblad B (1984). Personality traits related to monoamine oxidase activity in platelets. *Psychiatry Res* 12(1):11-26.

von Knorring AL, Hallman J, von Knorring L, Oreland L (1991). Platelet monoamine oxidase activity in type 1 and type 2 alcoholism. *Alcohol Alcohol* 26(4):409-16.

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

Willoughby J, Glover V, Sandler M (1988). Histochemical localization of monoamine oxidase A and B in rat brain. *J Neural Transm* 74(1): 29-42

Wu HF, Chen K, Shih JC (1993). Site-directed mutagenesis of monoamine oxidase A and B: role of cysteines. *Mol Pharmacol* 43(6): 888-893.



Wyatt RJ, Murphy DL, Belmaker R, Cohen S, Donnelly CH, Pollin W (1973). Reduced monoamine oxidase activity in platelets: a possible genetic marker for vulnerability to schizophrenia. *Science* 179(76):916-918

Yu PH, Boulton AA (1987) Irreversible inhibition of monoamine oxidase by some components of cigarette smoke. *Life Sci* 41(6):675-682.

Zhou BP, Lewis DA, Kwan SW, Kirksey TJ, Abell CW (1995). Mutagenesis at a highly conserved tyrosine monoamine oxidase B affects FAD incorporation catalytic activity. *Biochemistry* 34(29): 9526-9533.

Zhu QS, Chen K, Shih JC (1994). Bidirectional promoter of human monoamine oxidase A (MAO A) controlled by transcription factor Sp1. *J Neurosci* 14(12): 7393-7403.

Zhu QS, Grimsby J, Chen K, Shih JC (1992). Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J Neurosci* 12(11): 4437-4446.

Zhu QS, Shih JC (1997). An extensive repeat structure down-regulates human monoamine oxidase A promoter activity independent of an initiator-like sequence. *J Neurochem* 69: 1368-1373.

Zohar J, Insel TR (1987). Obsessive-compulsive disorder: psychobiological approaches to diagnosis, treatment and pathophysiology. *Biol Psychiatry* 22: 667-687.

Zohar J, Zohar-Kadouch RC, Kindler S (1992). Current concepts in the pharmacological treatment of obsessive-compulsive disorder. *Drugs* 43: 210-218.

**APENDICE.****Criterios diagnósticos del DSM-IV para el trastorno obsesivo compulsivo.****A. Se cumple para las obsesiones y las compulsiones**

Las obsesiones se definen por 1, 2, 3 y 4.

1. Pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes y persistentes que se experimentan en algún momento del trastorno como intrusivos e inapropiados y causan ansiedad o malestar significativo.
2. Los pensamientos, impulsos o imágenes no se reducen a simples preocupaciones excesivas sobre problemas de la vida real.
3. La persona intenta ignorar o suprimir estos pensamientos, impulsos o imágenes, o bien neutralizarlos mediante otros pensamientos o actos.
4. La persona reconoce que estos pensamientos, impulsos o imágenes obsesivos son el producto de su mente (y no son impuestos por inserción del pensamiento).

Las compulsiones se definen por 1 y 2:

1. Comportamientos (por ejemplo, lavado de manos, puesta en orden de objetos; comprobaciones) o actos mentales (por ejemplo, rezar, contar o repetir mentalmente palabras) de carácter repetitivo, que el individuo se ve obligado a realizar en respuesta a una obsesión o con un arreglo a ciertas reglas que debe seguir estrictamente.
  2. El objetivo de estos comportamientos u operaciones mentales es la prevención o reducción del malestar o la prevención de un acontecimiento o situación negativos; sin embargo, estos comportamientos u operaciones mentales o bien no están conectados de forma realista con aquello que pretenden neutralizar o prevenir o bien resultan claramente excesivos.
- B. En algún momento durante el curso del trastorno la persona ha reconocido que estas obsesiones o compulsiones resultan excesivas o irracionales. Nota: Este punto no es aplicable en los niños.**

- C. Las obsesiones o compulsiones provocan un malestar clínico significativo, representan una pérdida de tiempo (suponen más de una hora al día) o interfieren marcadamente con la rutina diaria del individuo, sus relaciones laborales o académicas o su vida social.
- D. Si hay otro trastorno del eje I, el contenido de las obsesiones o compulsiones no se limita a él (por ejemplo, preocupación por la comida en un trastorno alimentario, arranque de cabellos en la tricotilomanía, inquietud por la apariencia propia en el trastorno dismórfico corporal, preocupación por la drogas en un trastorno por consumo de sustancias, preocupación por estar padeciendo una grave enfermedad en la hipocondría, preocupación por las necesidades o fantasías sexuales en una parafilia o sentimientos repetitivos de culpa en trastorno depresivo mayor).
- E. El trastorno no se debe a los efectos fisiológicos directos de una sustancia (por ejemplo, drogas o fármacos) o de una enfermedad médica.

Especificar si:

Con poca conciencia de enfermedad: si durante la mayor parte del tiempo del episodio actual, el individuo no reconoce que las obsesiones o compulsiones son excesivas o irracionales.

### 1- Método de Extracción de DNA.

- a) Descongelar la sangre, tomar 5 ml de sangre y colocarlo en un tubo Falcon de 50 ml. Llevarlo a un volumen de 20 ml con solución TKM-1. Agregar 5  $\mu$ l de Nonidet P-40. Mezclar por inversión y centrifugar a 1100 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente (Centrífuga Beckman, modelo J-6B, rotor JS-4.2).
- b) Sacar 1/3 parte del sobrenadante con pipeta desechable, teniendo cuidado de no tocar el pellet (color blanco).
- c) Nuevamente llevar a un volumen de 20 ml con TKM-1 y centrifugar a 900 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (Centrífuga Beckman. Mod. J-6B, rotor JS-4.2).
- d) Sacar todo el sobrenadante con pipeta desechable y teniendo cuidado de no tomar el pellet. Agregar 800  $\mu$ l de TKM-2, 5  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg/ml (concentración final 100  $\mu$ g/ml) y 25  $\mu$ l de SDS 20%. Mezclar bien e incubar a 37°C toda la noche.
- e) Agitar para mezclar todas las soluciones. Vaciar a un tubo eppendorf de 2 ml.
- f) Agregar fenol 1:1, mezclar por inversión varias veces hasta obtener una solución homogénea. Centrifugar en microfuga a 12,500 rpm por 2 minutos. Recuperar la parte acuosa y colocarla en un tubo eppendorf limpio.
- g) Agregar en relación 1:1 con la muestra, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1. Mezclar por inversión varias veces y centrifugar a 12,500 rpm/2 min. Recuperar nuevamente la parte acuosa.
- h) Agregar 1:1 de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inversión y centrifugar a las mismas condiciones. Recuperar la parte acuosa en un tubo de polipropileno de 5 ml.
- i) Precipitación del DNA: agregar 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión hasta que aparezca la hebra.
- j) Recuperar la hebra mediante centrifugación en microviales con tapón de rosca.
- k) Lavar la hebra con etanol al 70% a temperatura ambiente. Centrifugar y decantar.
- l) Secar la pastilla en el concentrador de muestras (Hetovac) por 5 min.
- m) Disolver la pastilla en buffer TE y almacenar a 4°C.

**Soluciones:****TKM-1:**

Tris-HCl pH 7.6	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	2 mM

**TKM-2:**

Tris-HCl pH 7.6	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	2 mM
NaCl	0.4 M

Nonidet P-40

SDS 20%

NaCl saturado 6M

Etanol absoluto

Etanol 70%

TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)

Fenol

Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1

**2- Análisis de los polimorfismos.****TAE 50X:**

Tris base	242.0 g
Acido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M, pH 8	100.0 ml

Dye de electroforesis 4X:

Azul de bromofenol 0.05%

Sacarosa (w/v) 40.0 %

EDTA pH 8 0.1 M

SDS (w/v) 0.5 %

### 3- Gel SSCP

Gel acrilamida 8% (37.5:1):

Acrilamida 40% 7.78 ml

Bis acrilamida 2% 4.27 ml

Glicerol 7% 2.80 ml

TEMED 30.8  $\mu$ l

Persulfato de amonio 10% 308  $\mu$ l

H<sub>2</sub>O para 40 ml

TBE 10X (Tris base 0.89 M, Acido bórico 0.89 M, EDTA 20 mM).

Dye SSCP 2X:

Azul de bromofenol 0.05%

Xylen cyanol 0.05%

Formamida 95 %

EDTA 20 mM

Acrilamida/Bis-acrilamida 40% (37.5:1):

Acrilamida 38.93 g

Bis-acrilamida 1.07 g

H<sub>2</sub>O para 100 ml

#### 4- Secuenciación.

a) El fragmento de interés es amplificado por PCR (mismas condiciones y reactivos utilizados para el análisis del polimorfismo *Fnu4HI*). El producto amplificado es extraído y purificado mediante el kit QIAquick gel extraction, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

b) Reacción de secuenciación para productos de PCR purificados.

Templado (fragmentos de 100-200 pb, usar 3 ng)	8 $\mu$ l
Primer (5 pmol)	4 $\mu$ l
RR terminator mix	<u>8 <math>\mu</math>l</u>
Vf	20 $\mu$ l

Mezclar bien y centrifugar brevemente.

Programa de secuenciación:

25 ciclos: 96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min.

c) Purificación del fragmento secuenciado mediante columnas Centri-Sep. Se siguen las instrucciones sugeridas por el fabricante. La pastilla es resuspendida con buffer TSR, se calienta a 95°C por dos minutos, se coloca en hielo manteniéndose así hasta cargar en el secuenciador automático de Perkin Elmer modelo 310, versión 3.0, ABI-CE1, con el kit ABI-PRISM.