UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

"APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SNP A644G DE MAO B EN UNA POBLACIÓN CONTROL"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA

SERGIO PÉREZ GUTIÉRREZ

ASESOR:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA CELULAR

CARLOS CORTÉS PENAGOS

Morelia, Michoacán; Septiembre 2014.

A

Mis familiares, que me apoyaron

Mis amigos, que me alentaron

Mis profesores, que me formaron

AGRADECIMIENTOS

Para realizar una tesis se requiere de muchas virtudes. Responsabilidad, paciencia, constancia y devoción por lo que se hace son indispensables, pero más importante aún, es el apoyo de quienes están a nuestro alrededor. En mi experiencia, a esas personas que me ayudaron desde el principio hasta el final de mi formación profesional y que han hecho posible la culminación de esta etapa de mi vida, que me atrevo a decir, fue la mejor. Por ello expreso mi gratitud a:

A mi familia, comenzando por mi madre, Dominga Gutiérrez, que siempre me dio, y me sigue dando, todo de manera incondicional; y por su ejemplo de esfuerzo, perseverancia, respeto y amor por la familia. A mi padre, Nicolás Pérez, que me otorgó la oportunidad de conocer la experiencia de la educación básica que me condujo hasta este momento. A mis hermanos, Eduardo, Ricardo y Gabriel, por confiar en mí siempre. A mi sobrina Erika, que sin saber, me ha otorgado una nueva visión de responsabilidad familiar. A mi abuela "Cande", que siempre me ha alentado a continuar estudiando y formándome profesionalmente sin perder la humildad y humanidad hacia la sociedad. A mis primos Alex, Irene, Viri, Christian y Juan por demostrarme su cariño.

A la familia Pérez-Castillejos, en especial a doña Angeles Castillejos y don Rodrigo Pérez, que me han brindado su confianza y los mejores consejos para guiar mi vida. A Pamela, quien me ha dado su amistad incondicional durante poco más de ocho años, me motivó a estudiar esta carrera y que en conjunto con su mamá me dieron lo necesario para estudiar esta licenciatura en esta ciudad. A Rodrigo, un buen amigo y compañero de casa que me enseñó la importancia de la paciencia en las relaciones humanas y me dio ánimo en momentos de nostalgia.

A mis amigas Brenda, July, Fany, Norma, Laura, Carmen, Bianney, Vane y Flor, que son mi familia en esta ciudad, por darme su apoyo en los momentos más difíciles dentro y fuera de la faculta; por haberme prestado su atención cuando la requerí, por tolerar mis "exigencias" académicas y conducta en los primeros días de mi estancia en esta ciudad, por haber compartido conmigo los mejores momentos de mi vida y que ocasionaron un cambio muy radical en mi persona; pero sobre todo por darme una amistad sincera y que estoy seguro, perdura mucho tiempo.

A mis profesores que me formaron profesionalmente, con especial énfasis a la Dra. Judit Araceli Aviña Verduzco, que me dio la oportunidad de aplicar por primera vez, mis conocimientos de química orgánica al trabajar en su laboratorio de síntesis de compuestos peptidomiméticos; y al Dr. Carlos Cortés Penagos, director de esta tesis, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y conocer el impresionante mundo de la genética y biología molecular, por tolerar mis muchos errores y porque gracias a su experiencia pude aprender lo necesario para realizar esta obra. Ambos son para mí, ejemplos a seguir.

A los maestros en ciencias, Luis José Flores y Llanelly Galindo, por su auxilio y sus consejos en la fase práctica de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio; Francisco, Sergio y Carlos, por compartir sus conocimientos conmigo y porque con ellos la estancia en el laboratorio fue más divertida sin perder la seriedad, bueno, un poco.

A mis revisores de tesis: la Q.F.B. Armida Sánchez Gallegos, a la Dra. Marcia Yvette Gauthereau Torres, al Dr. Daniel Godínez Hernández, al Dr. Rosalío Mercado Camargo y al Dr. Esteban Gudayol Ferré.

Gracias a todos.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares Aplicados al Diagnóstico por Laboratorio de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

“El polimorfismo genético es un estado transitorio en el proceso de fijación de alelos neutros” (Motoo Kimura)

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS I
ÍNDICE DE TABLAS III
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS IV
RESUMEN VII
ABSTRACT VIII
1. MARCO TEÓRICO 1
1.1 Características generales de la monoamino oxidasa 1
1.2 Reacción catalítica de la monoamino oxidasa 1
1.3 Isoenzimas de la monoamino oxidasa 5
1.4 Estructura molecular de la monoamino oxidasa 5
1.5 Localización y distribución anatómica de la monoamino oxidasa 6
1.6 Genética de la MAO B 9
1.6.1 Localización cromosómica del gen MAO B 9
1.6.2 Organización del gen MAO B 9
1.6.3 Organización del promotor MAO B 10
1.6.4 Transcripción y traducción del gen MAO B 11
1.7 Polimorfismos 12
1.7.1 Principales variaciones en el genoma humano 13
1.7.2 Polimorfismo de nucleótido único (SNP) 14
1.7.3 Clasificación de los SNP's 15
1.7.4 Polimorfismos en el gen MAO A 16
1.7.5 Polimorfismo de nucleótido único A644G en el gen MAO B 17
1.8 MAO B y trastornos psiquiátricos y conductuales 19
1.8.1 Descubrimientos clínicos 19
1.8.2 Descubrimientos preclínicos 19
1.9 Procesamiento del RNA 20

2. ANTECEDENTES 22
3. JUSTIFICACIÓN 25
4. HIPÓTESIS 26
5. OBJETIVOS 26
5.1 General: 26

5.2 Específico: 26
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 27
7. MATERIALES Y MÉTODOS 28
7.1 Población control 28
7.1.1 Criterios de inclusión 28
7.1.2 Criterios de no inclusión 28
7.1.3 Criterios de eliminación 29
7.2 Extracción de DNA 29
7.3 Genotipificación del SNP A644G de MAO B 30
7.3.1 Cuantificación de DNA 30
7.3.2 Oligonucleótidos 31
7.3.3 Determinación del SNP A644G de MAOB por AS-PCR 31
7.3.4 Análisis por electroforesis de los amplificados de A644G de MAOB obtenidos por AS-PCR 33
7.3.5 Amplificación del fragmento control de MAOB por PCR punto final 35
7.3.6 Análisis por electroforesis de los amplificados de A644G de MAOB generados por PCR punto final 35
7.3.7 Purificación de productos de PCR punto final 36
7.3.8 Secuenciación de los fragmentos control del A644G de MAOB 37
7.4 Análisis de datos 37
8. RESULTADOS 38
8.1 Genotipificación del SNP A644G de MAO B por AS-PCR 39
8.2 Genotipificación del SNP A644G de MAO B por secuenciación dideoxi de Sanger 42
8.2.1 Amplificación del fragmento control de MAO B por PCR punto final 42
8.2.2 Purificación de productos de PCR punto final 42
8.2.3 Secuenciación de los fragmentos control de MAO B 43
9. DISCUSIÓN 48
10. CONCLUSIÓN 54
11. REFERENCIAS 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción catalítica realizada por la MAO…….. 3

Figura 2. Estructura de la MAO……. 7

Figura 3. Compartimentación hipotética de MAO A y MAO B en neuronas serotininérgicas…….. 8

Figura 4. Organización del cromosoma X……..... 9

Figura 5. Localización y organización de los genes MAO en el cromosoma X……. 10

Figura 6. Secuencia del promotor del gen MAO B humano……..... 11

Figura 7. Vía de señalización celular propuesta para la regulación de la expresión del gen MAO B……. 12

Figura 8. Distribución de los distintos tipos de polimorfismos a lo largo del genoma humano……. 14

Figura 9. Clasificación de los SNP funcionales……... 15

Figura 10. Características del gen MAO B…….. 18

Figura 11. Secuencia nucleotídica del límite del intrón 13 y exón 14 del gen MAO B, secuencia y localización de cada uno de los oligonucleótidos empleados para los ensayos de AS-PCR……..... 32

Figura 12. Patrones electroforéticos teóricos generados por los oligonucleótidos diseñados……. 33

Figura 13. Análisis electroforético del primer ensayo de AS-PCR……. 39

Figura 14. Análisis electroforético de los amplicones del SNP A644G de MAO B obtenidos por AS-PCR de muestras femeninas…… 40

Figura 15. Análisis electroforético de los amplicones del SNP A644G de MAO B por AS-PCR de muestras masculinas……... 41

Figura 16. Análisis electroforético de los productos de PCR punto final…… 42

Figura 17. Análisis electroforético de los productos purificados de PCR punto final……. 43

Figura 18. Electroferogramas de los amplicones control del gen MAO B a partir de muestras femeninas…….. 44

Figura 19. Electroferogramas de los amplicones control del gen MAO B a partir de muestras masculinas……. 45

Figura 20. Alineamiento de las secuencias obtenidas por el método dideoxi de Sanger de los amplificados por PCR punto final de los amplificados controles del gen MAO B…… 46

Figura 21. Comparación de las secuencias de oligonucleótidos alelo específicos con la secuencia del gen MAO B……... 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales sustratos y productos del metabolismo ejecutado por la MAO acoplada con la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y la aldehído reductasa (ALR)……..... 4

Tabla 2. Polimorfismos más significativos en el gen MAO A…… 17

Tabla 3. Polimorfismos de nucleótido único más significativos en la secuencia del gen MAO B……. 18

Tabla 4. Protocolo para mezcla de reacción de los ensayos de AS-PCR……. 34

Tabla 5. Programa empleado para los ensayos de AS-PCR……. 34

Tabla 6. Reactivos empleados para los análisis electroforéticos…… 35

Tabla 7. Protocolo para mezcla de reacción de los ensayos de PCR punto final……..... 36

Tabla 8. Programa empleado para los ensayos de PCR punto final……..... 36

Tabla 9. Cuantificación de DNA para amplificación de A644G de MAO B por PCR punto final en muestras femeninas……. 38

Tabla 10. Cuantificación de DNA para amplificación de A644G de MAO B por PCR punto final en muestras masculinas...……. 38

Tabla 11. Genotipificación de las muestras femeninas por AS-PCR y secuenciación de Sanger……... 46

Tabla 12. Genotipificación de las muestras masculinas por AS-PCR y secuenciación de Sanger……... 47

Tabla 13. Comparación de los programas de AS-PCR para amplificación del SNP A644G de MAO B……..... 49

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Siglas	Significado
5-HT	5-Hidroxitriptamina
5-HTT	5-Hydroxytryptamine Transporter
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
ALR	Aldehído Reductasa
AS-PCR	Allele-Specific Polymerase Chain Reaction
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
cSNP	Coding Single Nucleotide Polymorphism
DA	Dopamina
dsDNA	Double stranded Deoxyribonucleic Acid
ESE	Exonic Splicing Enhancer
FAD	Flavina-Adenina Dinucleótido
ISE	Intronic Splicing Enhancer
kb	Kilobase
kDa	kiloDalton
MAO	Monoamino Oxidasa
MINI	Mini International Neuropsychiatric Interview
NADP	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato
NE	Norepinefrina
PEA	Phenilethylamine
PKC	Protein Kinase C

Siglas	Significado
PMA	Phorbol-12-Mirystathe-13-Acetate
ROS	Reactive Oxygene Species
rSNP	Regulatory Single Nucleotide Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
srSNP	Structural Single Nucleotide Polymorphism
uVNTR	Up stream variable number tandem repeat
VNTR	Variable number tandem repeat

RESUMEN

La monoamino oxidasa es una flavoproteína unida a la membrana mitocondrial externa de tipo oxigeno oxidoreductasa que cataliza la desaminación oxidativa de aminas neurotransmisoras biogénicas y xenobióticas a sus aldehídos correspondientes. Desde su descubrimiento en 1928, la monoamino oxidasa y sus isoenzimas A y B han sido dianas de una amplia variedad de estudios, ya sea para dilucidar su perfil bioquímico y farmacológico, o para asociarse con los trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos más frecuentes en seres humanos desde una perspectiva genética, es decir, a través del estudio de los polimorfismos más significativos en los genes MAO A y MAO B. Los avances en esta última línea de investigación respecto a la monoamino oxidasa proponen a los polimorfismos uVNTR de 1 y 3 repeticiones de MAO A y al SNP A644G de MAO B como marcadores moleculares para asociación con trastornos psiquiátricos. La genotipificación de polimorfismos y mutaciones puntuales por medio de técnicas genético-moleculares permite determinar las variante alélica del gen MAO B que prevalece en una población control, generando bases de datos genéticos específicas de esa población. En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis del SNP A644G por mediante amplificación de la secuencia límite del intrón 13 y el exón 14 del gen MAO B por PCR punto final a partir de células extraídas del epitelio bucal de 30 individuos control (15 masculinos y 15 femeninos). La genotipificación del SNP A644G se realizó por medio de PCR alelo específico y análisis por secuenciación de Sanger. Los resultados mostraron que más del 96% de las muestras corresponden con el alelo A del gen MAO B por medio de AS-PCR, mientras que por secuenciación de Sanger el 100% corresponden con el alelo A del mismo gen.

Palabras clave: monoamino oxidasa; genotipificación; población control.

ABSTRACT

Monoamine oxidase is a mitochondrial outer membrane-bound flavoprotein of oxygen-oxydoreductase type that catalyzes the oxidative deamination of xenobiotic and biogenic neurotransmitter amines to respective aldehydes. Since its discovery in 1928, monoamine oxidase and its isoenzymes A and B have been targets for a variety of studies, either to elucidate its biochemical and pharmacological profile, or to associating with the most common humans psychiatric and neurodegenerative disorders from genetic perspective, that is to say, through the study of the most significance polymorphisms in the MAO A and MAO B genes. Advances in this last line of research respect to monoamine oxidase propose to the polymorphisms uVNTR of 1 and 3 repetitions of MAO A and SNP A644G of MAO B as molecular markers for associating with psychiatric disorders. Genotyping of polymorphisms and point mutations by means of molecular-genetic techniques allows determining the allelic variant of the MAO B gen that prevails in a control population, generating specific genetic databases of that population. In the present work was carried out the A644G SNP analysis by means of amplification of the boundary sequence from intron 13 and exon 14 of the MAO B gene by PCR endpoint from oral epithelium cells of 30 control subjects (15 males and 15 females). A644G SNP genotyping was performed by means of Allele-specific PCR and analysis by Sanger sequencing. The results was showed that over 96% of sample correspond to the "A" allele of MAO B gene by means of AS-PCR, whereas by Sanger sequencing 100% corresponds to "A" allele of the same gene.

Key words: monoamine oxidase; genotyping, control subjects.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Características generales de la monoamino oxidasa

La Monoamino Oxidasa (MAO) es una enzima del tipo oxígeno oxidoreductasa (E.C. 1.4.3.4) que cataliza la desaminación oxidativa de aminas neurotransmisoras biogénicas y xenobióticas a sus correspondientes aldehídos, utilizando O_2 como aceptor de electrones y produciendo H_2O_2 (Bortolato et al., 2010; Edmondson et al., 2009).

$$RCH_2NH_2 + O_2 + H_3O^+ \longrightarrow RCHO + NH_4^+ + H_2O_2$$

La MAO pertenece a una familia de flavoproteínas, ya que contiene una molécula de flavín adenín dinucleótido (FAD) unido a un residuo de cisteína como cofactor redox; y se encuentra localizada en la membrana mitocondrial externa (Walker et al., 1971; Edmondson et al., 1993; Greenawalt & Schnaitman, 1970).

La enzima fue aislada por primera vez a partir de extractos de hígado de conejo en 1982 por Mary Hare, quién la llamó tiramina oxidasa en referencia a su habilidad para catalizar la conversión de tiramina en ácido p-hidroxifenilacético (Hare, 1928).

1.2 Reacción catalítica de la monoamino oxidasa

La reacción química catalizada por la MAO requiere flavín adenín dinucleótido (FAD) como un cofactor redox y consiste en la conversión de las monoaminas a sus aldehídos correspondientes, utilizando O_2 como aceptor de electrones (Figura 1). La acción catalítica de la MAO se lleva a cabo en tres pasos principales (Edmondson et al., 1993; Edmondson et al., 2009):

1. Después de la formación del aducto FAD_{ox}-sustrato monoamina, el cofactor es reducido a su forma hidroquinona ($FADH_2$), mientras que la amina es convertida a la imina correspondiente.

$$Enz\text{-}FAD + RCH_2NH_2 \longrightarrow Enz\text{-}FADH2 + RCH{=}NH$$

2. Aun permaneciendo unida la imina a $FADH_2$, el cofactor es reoxidado a FAD, con la conversión de oxígeno a peróxido de hidrógeno.

$$RCH{=}NH + FADH_2 + O_2 \longrightarrow RCH{=}NH + FAD + H_2O_2$$

3. Finalmente, la imina es hidrolizada espontáneamente al aldehído correspondiente y amonio. Esta reacción es el paso limitante de todo el proceso enzimático.

$$RCH{=}NH + H_3O^+ \longrightarrow RCHO + NH_4^+$$

(Bortolato et al., 2010; Bortolato & Shih, 2011; Edmondson et al., 2009).

Los aldehídos son principalmente oxidados a ácidos por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), pero también pueden ser convertidos a alcoholes o glicoles por la enzima aldehído reductasa (ALR), por lo que la MAO está acoplada funcionalmente con estas enzimas dependientes de $NADP^+$ (Tabla 1) (Bortolato et al., 2010; Bortolato & Shih, 2011).

Los subproductos generados por la actividad catalítica de MAO son especies potencialmente neurotóxicas. El peróxido de hidrógeno es un potente oxidante que puede desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inducir daño mitocondrial y apoptosis neuronal. Bajo condiciones fisiológicas, el potencial redox general se mantiene en equilibrio por medio de las enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa; sin embargo, altas concentraciones de amoniaco (el otro subproducto de la reacción) ha demostrado que disminuye la actividad de esta enzima y conduce a la formación de radicales superóxido. El estrés oxidativo inducido por activación de la MAO puede ser crítico en los mecanismos patogénicos en los que esta enzima ha sido relacionada, ya que conduce a daño permanente en el sistema nervioso central a través de muerte de neuronas y glía. Este mecanismo sienta las bases teóricas para

la implicación de MAO en la patofisiología de ciertos trastornos neurodegenerativos, tal como la enfermedad de Parkinson y otras demencias (Bortolato et al., 2010; Bortolato & Shih, 2011).

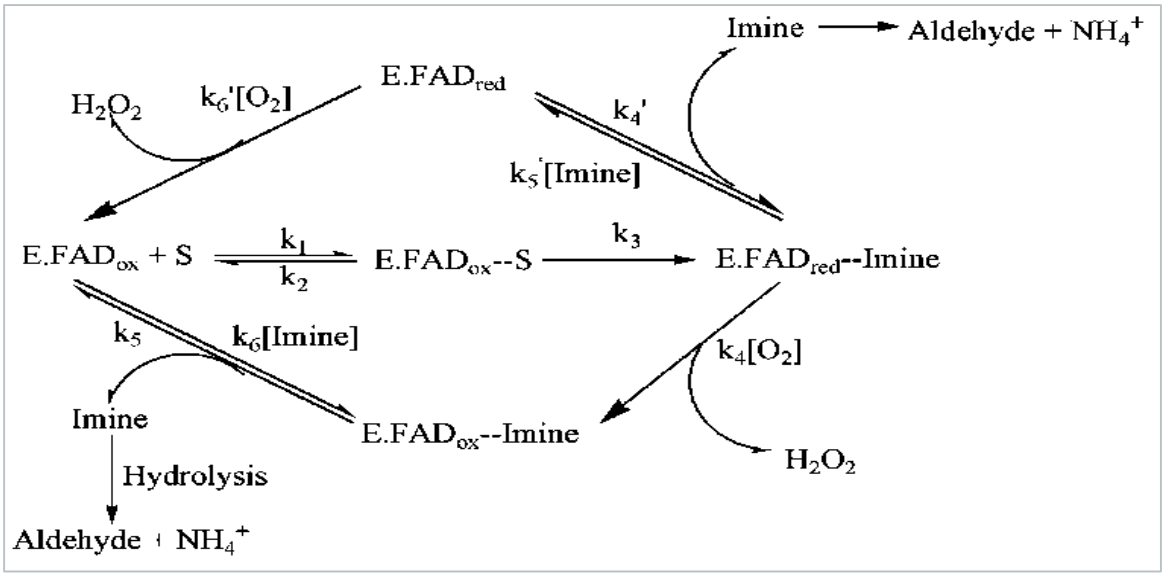
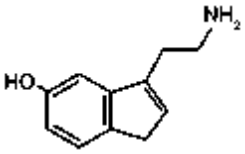
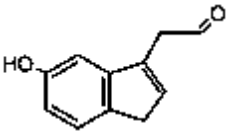
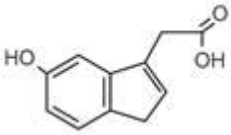
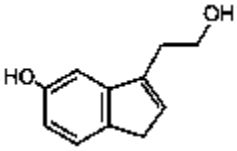
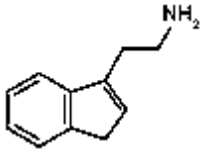
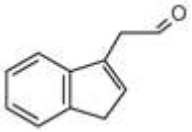
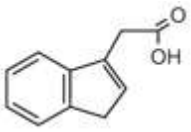
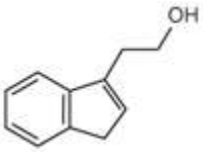
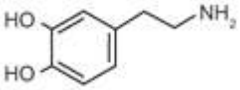
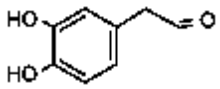
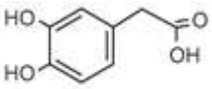
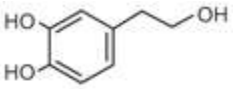
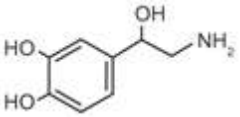
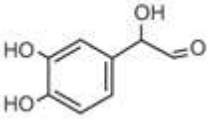
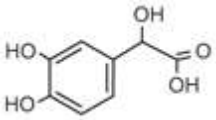
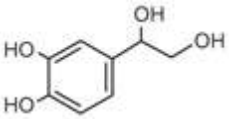
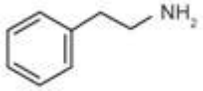
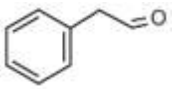
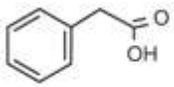
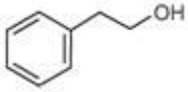
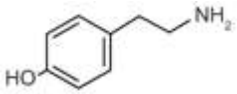
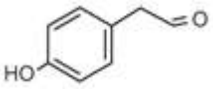
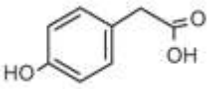
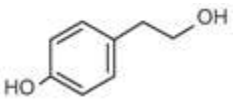


Figura 1. Reacción catalítica realizada por la MAO. Con la mayoría de los sustratos, ambas enzimas siguen la vía inferior. MAOB utiliza la ruta superior con la feniletilamina (PEA). Tomado de Edmondson et al., 2007.

La MAO tiene un papel principal en la degradación de aminas primarias, secundarias y algunas aminas terciarias xenobióticas, que ejercen su toxicidad al afectar la homeostasis cardiovascular y endócrina, con lo que adicionalmente desempeña una actividad citoprotectora. Un ejemplo de esta función protectora es la "reacción del queso", una crisis vasoconstrictora (a menudo letal) causada por la absorción de aminas simpaticomiméticas en los alimentos fermentados (queso, vino, etc.) después de la administración de inhibidores irreversibles de la MAO (Bortolato et al., 2010; Bortolato & Shih, 2011; Anderson et al., 1993).

Tabla 1. Principales sustratos y productos del metabolismo ejecutado por la MAO acoplada con la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y la aldehído reductasa (ALR).

Sustratos		Productos		
		MAO	ALDH	ALR
Indolaminas	 Serotonina	 5-HIAAL	 5-HIAA	 5-HIET
	 Triptamina	 IAAL	 IAA	 IET
Catecolaminas	 Dopamina	 DOPAL	 DOPAC	 DOPET
	 Norepinefrina	 DOPGAL	 DOMA	 DOPEG
Otras aminas	 PEA	 PAAL	 PAA	 PET
	 Tiramina	 HPAL	 HPA	 HPET

La epinefrina no se enlista ya que sus metabolitos son los mismos que se indican para la norepinefrina. Abreviaciones: 5-HIAAL (5-hidroxiindolaldehído), 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético), 5-HIET (5-hidroxietanol), IAAL (indol-3-acetaldehído), IAA (ácido indol-3-acético), IET (indol-3-etanol), DOPAL (3,4-dihidroxifenilacetaldehído), DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), DOPET (3,4-dihidroxifeniletanol), DOPGAL (3,4-dihidroxifenilglicolaldehído), DOMA (ácido 3,4-dihidroximandélico), DOPEC (3,4-dihidroxifeniletilenglicol), PEA (2-feniletilamina), PAAL (2-fenilacetaldehído), PAA (ácido 2-fenilacético), PET (2-feniletanol), HPAL (4-hidroxifenilaldehído), HPA (ácido 4-hidroxifenilacético), HPET (4-hidroxifeniletanol). Tomado de Bortolato & Shih, 2011.

1.3 Isoenzimas de la monoamino oxidasa

La existencia de dos isoenzimas MAO fue inicialmente propuesta de acuerdo a un número de datos experimentales que indicaban efectos neuroquímicos divergentes de diferentes inhibidores. La MAO A fue definida como la isoenzima inhibida por bajas dosis de clorgilina, mientras que la MAO B fue bloqueada por concentraciones nanomolares de (R)-deprenil. Las dos enzimas pueden ser separadas electroforéticamente. Esta distinción fue acompañada por conclusiones sobre el espectro de afinidad por diferentes sustratos monoaminas (Johnston, 1968; Knoll & Magyar, 1972; Shih & Eiduson, 1969; Youdim et al., 1969; Bortolato et al., 2010).

Estudios previos mostraron que la MAO A tiene una elevada afinidad por la serotonina (5-HT) (120 veces más alta que la MAO B) y, en menor grado, por la norepinefrina (NE); mientras que la MAO B es la principal enzima del catabolismo de PEA y bencilamina. La oxidación de la dopamina (DA), triptamina y tiramina es realizada por ambas isoformas de la MAO, pero la contribución relativa de cada isoenzima parece variar en gran medida en relación a la especie y al tejido en consideración. Por ejemplo, mientras que el metabolismo de DA es mediado principalmente por la MAO B glial en humanos, primates y otros mamíferos, sólo se metaboliza por la MAO A en ratones bajo condiciones basales y por ambas isoenzimas en concentraciones elevadas. Por último, la DA siempre se metaboliza por la MAO A en ratas independientemente de las concentraciones. Las dos isoenzimas no tienen especificidad de sustrato absoluta, ya que en ausencia de una su isoforma homóloga puede desaminar una cierta cantidad de los sustratos monoamina no preferidos. (Fowler et al., 1982; Bortolato & Shih, 2011; Garrick & Murphy, 1980; Cases et al., 1995; Fornai et al., 1999; Chen, 2004).

1.4 Estructura molecular de la monoamino oxidasa

La diferente naturaleza molecular de las dos isoenzimas MAO fue inequívocamente demostrada en 1988, con la clonación del cDNA de los genes MAO A y MOA B humanos.

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas para las dos isoenzimas indicó que ambas comparten 70% de identidad de secuencia, consistiendo de 527 y 520 aminoácidos, y con pesos moleculares de 59.7 kDa y 58.8 kDa, respectivamente. Las dos isoenzimas están constituidas por dos polipéptidos diferentes y no son la misma proteína diferencialmente modificada. MAO A es monomérica mientras que MAO B es dimérica. Entre las isoenzimas MAO de mamíferos y otras especies hay tres regiones altamente conservadas, las cuales incluyen un dominio de unión a sustrato/inhibidor, un dominio de unión covalente a FAD y un dominio C-terminal α-hélice transmembrana (Figura 3) (Bach et al., 1988; Hsu et al., 1988; Shih et al., 1999; Son et al., 2008).

La elucidación de la estructura de la MAO se realizó por medio de cristales de difracción de ambas enzimas, siendo la organización de la MAO A más difícil de dilucidar que la de la MAO B. El reporte inicial de la estructura de la MAO B y las estructuras posteriores de este enzima dieron lugar a nuevos conocimientos respecto al sitio activo (Edmondson et al., 2007; Binda et al., 2002; Binda et al., 2003).

1.5 Localización y distribución anatómica de la monoamino oxidasa

La localización de las isoenzimas MAO en el sistema nervioso central y en diferentes tejidos periféricos ha sido estudiada en diversas especies utilizando numerosos enfoques complementarios, tal como el uso de inhibidores enzimáticos, inmunohistoquímica, autoradiografía e hibridación *in situ* (Bortolato et al., 2010).

Debido a que la MAO está unida a la membrana mitocondrial externa, está presente en la mayoría de las células, excepto en las células sanguíneas rojas. Sin embargo, el patrón de distribución de MAO A y MAO B es muy distinto. En humanos, la MAO es expresada en hígado, pulmón, intestino delgado y cerebro. Específicamente, la MAO A está altamente expresada en fibroblastos y en placenta, mientras que la MAO B es la única isoenzima expresada en plaquetas y en linfocitos (Greenawalt & Schnaitman, 1970; Bortolato et al., 2010; Bond & Cundall, 1977; Dahlstroem & Fuxe, 1964; Donnelly & Murphy, 1977; Grimsby et al., 1990).

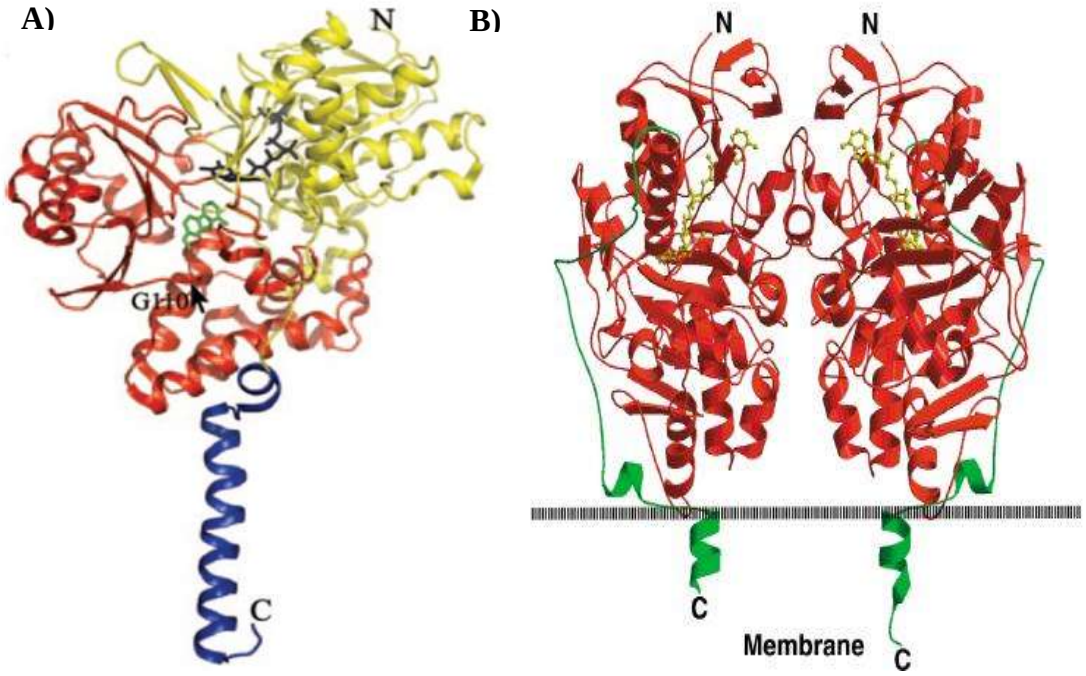


Figura 2. Estructura de la MAO. A) La estructura de la MAO puede ser dividida en dos dominios: extramembrana (amarillo y rojo) y de unión a membrana (azul). El dominio extramembrana puede ser dividido a su vez en dos dominios, la región de unión a FAD (amarillo) y la de unión a sustrato/inhibidor (rojo). En color negro puede apreciarse la molécula de FAD y en verde la correspondiente a harmina. Tomado de Son et al., 2008. B) Diagrama de listón del dímero de la MAO B. El monómero A está en la derecha y el monómero B está en la izquierda. Las letras N y C indican los extremos N-terminal (Lys 4 en ambos monómeros) y C-terminal (Thr 500 en el monómero A e Ile 496 en el monómero B), respectivamente. Los residuos 4-460 se indican en color rojo, y el extremo C-terminal (residuos 461-500) en color verde. El dímero está anclado a la membrana mitocondrial externa a través del extremo C-terminal y los residuos vecinos de cada monómero. El cofactor FAD está indicado en una representación de esferas y barras en color amarillo. La región límite de la membrana está indicada por una línea gruesa de trazos para propósitos ilustrativos y no está destinada para definir la profundidad exacta de la inserción de la proteína dentro de la membrana. Tomado de Binda et al., 2002.

Aunque el cerebro exhibe elevadas concentraciones de las dos isoenzimas MAO, su localización regional y celular específica es también muy diferente. La MAO A se encuentra predominante en neuronas catecolaminérgicas, en particular en el locus cerúleo, núcleo accumbens y en los complejos hipotalámico y mamilar. En contraste, la MAO B se encuentra en el soma de neuronas serotoninérgicas, células histaminérgicas y astrocitos. La importancia funcional de la distribución de las isoenzimas MAO en el cerebro no está del todo clara, considerando la especificidad de sustrato de cada una de ellas; por ejemplo, la

localización de la MAO B en neuronas serotoninérgicas está aparentemente en desacuerdo con la evidencia que muestra que la serotonina es metabolizada principalmente por la MAO A y que la inactivación de esta misma isoenzima, pero no la MAO B, resulta en niveles mejorados de serotonina. Se ha planteado la hipótesis de que una proteína MAO A puede ser sintetizada en el cuerpo celular de neuronas serotoninérgicas y segregarse a las terminales de los axones, para explicar las discrepancias en la localización cerebral de las isoenzimas MAO. Esta idea es apoyada por el descubrimiento de que la expresión de MAO B es abundante en el soma de las neuronas serotoninérgicas, pero completamente ausente en las mitocondrias de sus axones terminales (Figura 2). Se ha propuesto que la principal función de la MAO B en neuronas serotoninérgicas puede ser la eliminación de aminas extrañas, y de esta manera limitar su acceso a las vesículas sinápticas y contribuir a la pureza de la 5-HT sináptica (Jahng et al., 1997; Luque et al., 1995; Saura et al., 1994; Westlund et al., 1988; Cases et al., 1995; Grimsby et al., 1997; Mousseau & Greenshaw, 1989; Bortolato et al., 2010; Arai et al., 2002; Youdim et al., 2006).

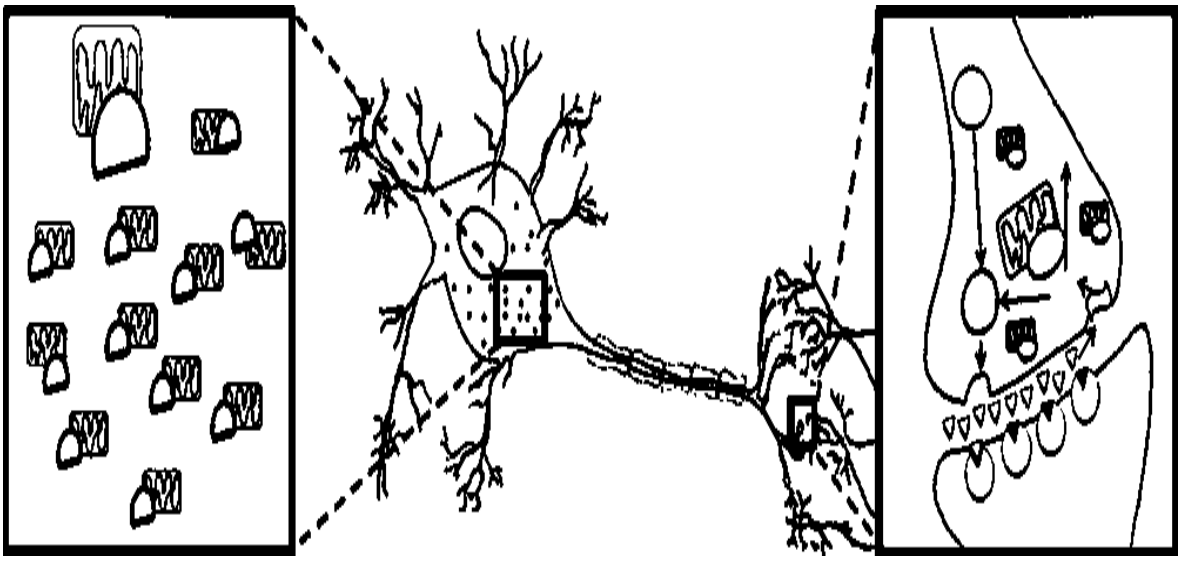


Figura 3 Compartimentación hipotética de la MAO A y la MAO B en neuronas serotoninérgicas. La localización de MAO B (representada como una forma semi ovalada en el cuadro izquierdo) está limitada a la mitocondria del cuerpo celular y dendritas de neuronas serotoninérgicas. Inversamente, la MAO A (esquematizada como una forma elíptica en la mitocondria del cuadro derecho) puede ser distribuida principalmente en las terminales sinápticas, donde puede metabolizar a la 5-HT después de su recaptura operada por el transportador de 5-HT (5-HTT). Tomado de Bortolato et al., 2010.

1.6 Genética de la MAO B

1.6.1 Localización cromosómica del gen MAO B

Estudios preliminares con anticuerpos sugirieron que los genes MAO se encontraban localizados en el cromosoma X en un número de especies de mamíferos. En 1989, los genes MAO A y MAO B humanos y de ratones fueron localizados en sitios adyacentes al locus Xp11.23 (Figura 4) y fueron detectados en pacientes con enfermedad de Norrie (Kochersperger et al., 1986; Pintar et al., 1981; Lan et al., 1989; Levy et al., 1989; Derry et al., 1989; Sims et al., 1989).

1.6.2 Organización del gen MAO B

Por medio de la utilización de fragmentos específicos de cDNA de las isoenzimas MAO, los genes MAO A y MAO B fueron aislados de librerías específicas del cromosoma X y se determinó que ambos genes están localizados en el locus Xp11.23 con una orientación contraria. Estudios posteriores encontraron que estos dos genes están constituidos de 15 exones y 14 intrones y que tienen idéntica organización exón-intrón (aproximadamente 70% de identidad de secuencia) y abarcan por lo menos 60 kb (Figura 5), lo que sugiere que ambos genes derivan de la duplicación de un gen ancestral común (Derry et al., 1989; Ozelius et al., 1988; Grimsby et al., 1991).

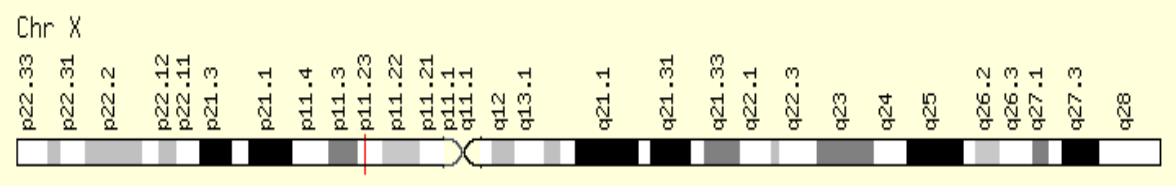


Figura 4. Organización del cromosoma X. La línea roja vertical indica el locus Xp11.23 en el que se localiza el gen MAO B. Tomado de NCBI.

El gen MAO B se compone de 122,865 pb y su secuencia codificante tiene una longitud de 1563 pb (NCBI: NG_008723.1). De manera interesante, los productos del exón 12 (sitio de unión covalente a FAD) tanto de MAO A como de MAO B comparten 93.9% de identidad de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de MAO B humana y de rata es altamente conservada en ambas especies, aproximadamente 88.3% de identidad. La fuerte conservación de la secuencia de aminoácidos de esta isoenzima entre especies de mamíferos puede reflejar presión evolutiva para mantener la función fisiológica específica de la MAO B (Grimsby et al., 1991; Bach et al., 1988; Ito et al., 1988; Shih et al., 1999).

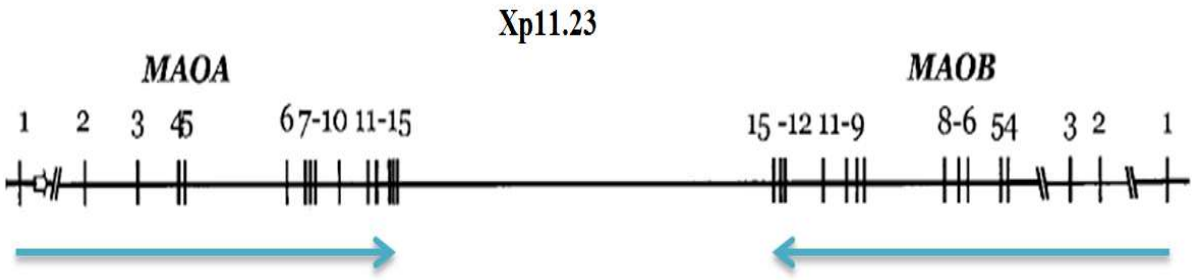


Figura 5. Localización y organización de los genes MAO en el cromosoma X. Las barras verticales indican los exones y las barras horizontales a los intrones. Las flechas indican la orientación de los genes. Modificado de Balciuniene et al., 2002.

1.6.3 Organización del promotor MAO B

Utilizando unas series de secuencias flanqueantes 5' ligadas al gen de la hormona de crecimiento humano, la secuencia de DNA responsable para la activación de la transcripción de los genes MAO A y MAO B fue identificada. Se encontró que la actividad máxima del promotor para los genes MAO A y MAO B está en las regiones -260/-60 y -246/-99, respectivamente. Aunque ambas regiones promotoras son ricas en guanina-citosina (GC) y comparten aproximadamente 60% de identidad de secuencia, contienen una organización distinta de los elementos cis, que pueden explicar la expresión diferencial de los genes MAO A y MAO B. El núcleo promotor de MAO B consiste de dos grupos Sp1 superpuestos separados por un elemento CACCC (Figura 7). La diferente organización de

los promotores de los genes MAO A y MAO B puede ser la razón de su diferente expresión tisular y celular especifica (Zhu et al., 1992; Wong, 2002; Shih et al., 1999).

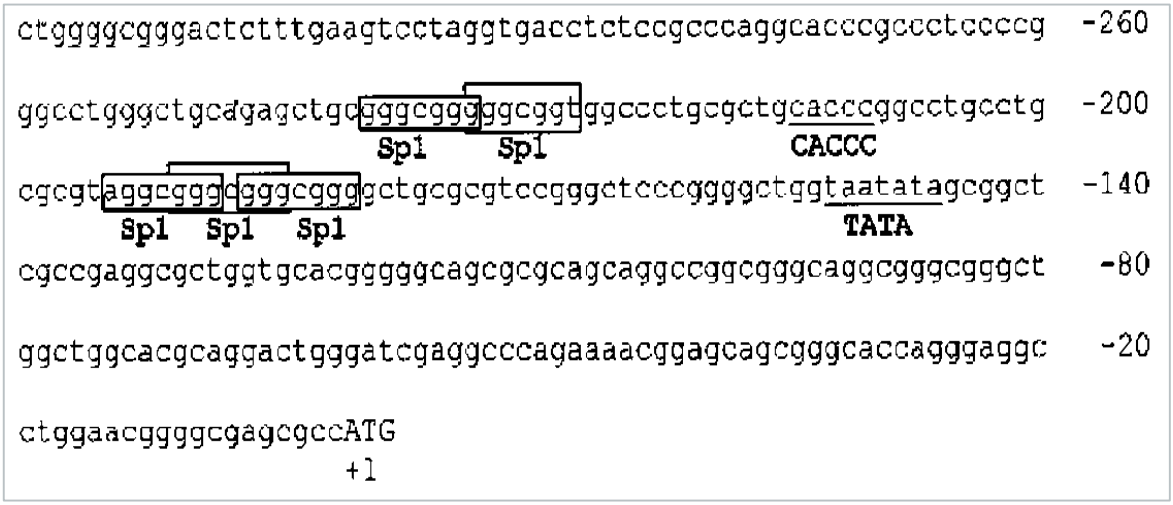


Figura 6. Secuencia del promotor del gen MAO B humano. La adenina del codón ATG del sitio de inicio de la transcripción está marcada con +1. Los elementos reguladores potenciales están subrayados y marcados en negrita. Tomado de Wong et al., 2001.

1.6.4 Transcripción y traducción del gen MAO B

La expresión de la MAO B humana es activada por PKC y por la vía de transducción de señales de MAPK, donde los genes c-Jun y Egr-1 parecen ser los últimos objetivos de esta regulación (Figura 8); pero es disminuida por metilación. Un papel clave en la regulación de la expresión de ambos genes es realizado por la familia de factores de transcripción Sp1 (Wong, 2002; Wong et al., 2003; Wong et al., 2001; Zhu et al., 1994).

Anteriormente se mostró que la región promotora de MAO B -246/-99 contiene dos grupos de sitios Sp1 superpuestos, un elemento CACCC y una caja TATA. El análisis de nueve mutaciones dirigidas a un sitio de la región -246/-99 reveló que ambos grupos de sitios de unión Sp1 contribuyen positivamente, mientras que el elemento CACCC contribuye negativamente a la actividad transcripcional. Un análisis de intercambio de geles demostró que en adición a Sp1, Sp3 puede interactuar con ambos grupos de unión Sp1, sin

embargo, una sobre expresión de Sp3 puede reprimir la actividad del promotor, por lo que la unión a los sitios superpuestos Sp1 por varios miembros de la familia Sp es importante para la regulación de la expresión del gen MAO B (Chen, 2004; Wong et al., 2001).

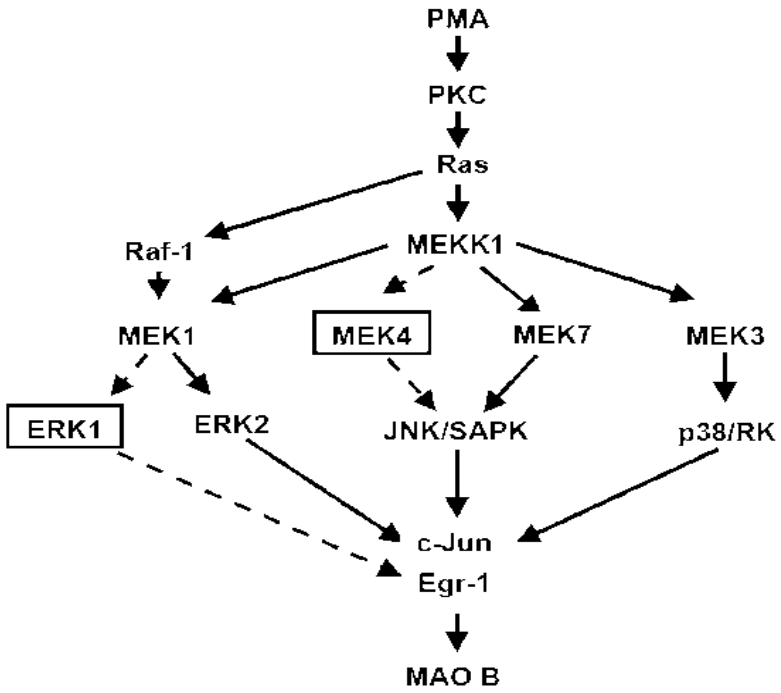


Figura 7. Vía de señalización celular propuesta para la regulación de la expresión del gen MAO B. Las cinasas indicadas con un cuadro parecen no estar involucradas en el vía principal. Las líneas continuas conectan cinasas individuales en la vía de transducción de señales, mientras que las líneas punteadas parecen no ser importantes para la activación de MAO B inducida por Forbol-miristato-acetato (PMA). Tomado de Wong, 2002.

1.7 Polimorfismos

El desarrollo de la genética y la biología molecular ha permitido identificar y caracterizar regiones del DNA y genes que intervienen en diversas enfermedades. Generalmente, la secuencia de DNA de la mayoría de los genes que codifican proteínas está conservada; sin embargo, dicha secuencia, pese a ser prácticamente idéntica, presenta variaciones. Estas variaciones se denominan polimorfismos, los cuales confieren diversidad a la población y son la consecuencia de mutaciones o cambios en la secuencia de DNA que han ocurrido durante la evolución y que no han sido eliminados a través de las

generaciones. La mayoría de las variaciones en la secuencia de DNA no tienen un efecto claro sobre la función del gen o de la proteína que codifican, mientras que otras pueden alterar en diferente medida su funcionamiento. Muchos autores utilizan los términos mutación y polimorfismo sin ninguna distinción. Por convención, en los estudios de genética humana, cualquier variante genómica con una frecuencia en la población inferior al 1% se denomina mutación, y, aquellas con una frecuencia superior al 1% se denominan polimorfismos (Mansego et al., 2007; Feuk et al., 2006).

1.7.1 Principales variaciones en el genoma humano

La publicación de la secuencia del genoma humano en el 2001, no solo puso de manifiesto la secuencia de pares de bases que componen el DNA, la cartografía y un número reducido de genes (mapa genético), sino que también reportó una gran cantidad de variantes genéticas comunes. Un hallazgo muy importante que resaltó la importancia de la variación genómica humana fue la gran similitud entre dos genomas humanos, en los que se observó que comparten un 99.9% de identidad en su secuencia, mientras que el resto constituye la variabilidad genética y fenotípica entre individuos (Ramírez-Bello et al., 2013).

La variabilidad genómica puede presentarse de varias formas, incluyendo polimorfismo de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés), numero variable de repeticiones en tándem (VNTR, por sus siglas en inglés; p.ej. mini y micro satélites), presencia o ausencia de elementos transposables (p.ej. elementos *Alu*) y alteraciones estructurales (p.ej. deleciones, duplicaciones e inversiones). Básicamente, todas estas alteraciones se diferencian en función del número de nucleótidos o bases implicados (Figura 9), pueden afectar a grandes regiones cromosómicas y ser visibles por técnicas de citogenética (trisomías, translocaciones, perdida de fragmentos cromosómicos, etc.), o bien pueden afectar sólo a unos cuantos nucleótidos, los cuales pueden ser detectados por técnicas de genética molecular (Freeman, 2006, Mansego et al., 2007).

1.7.2 Polimorfismo de nucleótido único (SNP)

Los SNP's son las formas más frecuentes de variación en el DNA, corresponden al cambio mínimo que este puede presentar, ya que consiste en la sustitución de un nucleótido por otro, lo que implica un cambio de secuencia basado en una perdida y adición que conlleva a una sustitución de nucleótidos. Este grupo de alteraciones son los polimorfismos más ampliamente investigados, así como los primeros identificados, y constituyen la mayor parte de variación en el genoma con más de 11.5 millones de SNP's reportados en el genoma humano, alcanzando una distribución de aproximadamente un SNP por cada 100-300 nucleótidos. La variabilidad genética se ha relacionado principalmente con los SNP's, y éstos con la susceptibilidad a padecer diversas enfermedades comunes. Así, estos polimorfismos representan los marcadores genéticos más ampliamente distribuidos en el genoma humano (Mansego et al., 2007; Madsen et al., 2007; Ramírez-Bello et al., 2013).

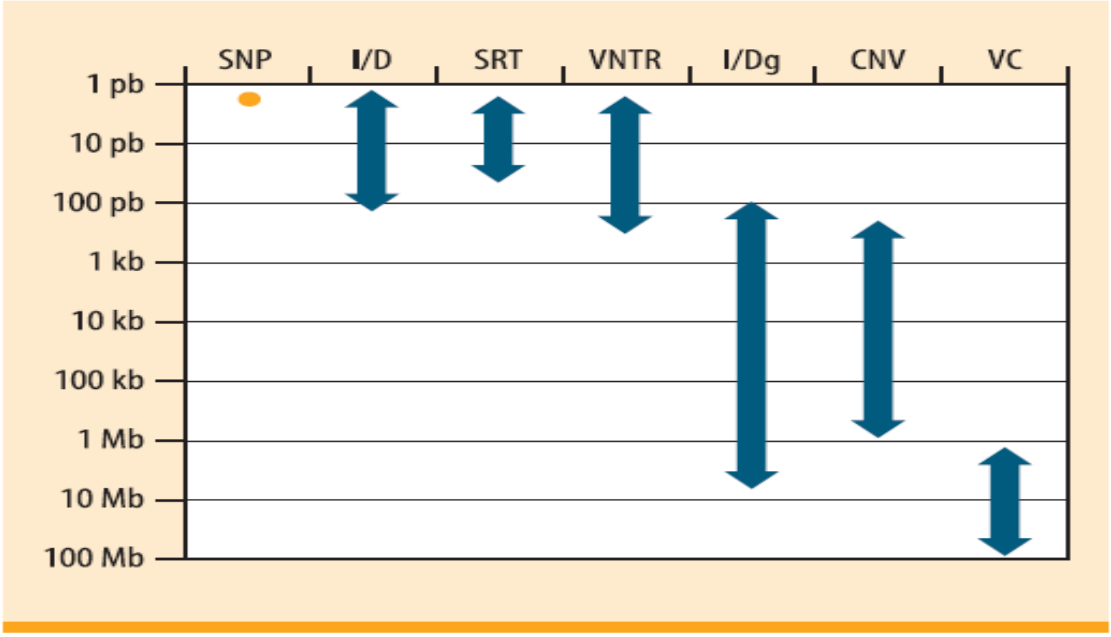


Figura 8. **Distribución de los distintos tipos de polimorfismos a lo largo del genoma humano.** Las flechas verticales expresan el rango de tamaño aproximado que implica cada variación. El eje de coordenadas está representado en escala logarítmica del número de nucleótidos. SNP: polimorfismo de nucleótido único; I/D: polimorfismos de inserción y deleción; STR: repeticiones breves en tándem; VNTR: número variable de repeticiones en tándem; I/Dg: polimorfismos de inserción y deleción grandes; CNV: variación del número de copias; VC: variaciones cromosómicas; Mb: megabases. Tomado de Mansego et al., 2007.

1.7.3 Clasificación de los SNP's

De acuerdo con su importancia funcional y su amplia localización, ya sea en la estructura del gen o del mRNA de los genes que sintetizan proteínas, los SNP funcionales se han dividido en SNP codificantes (cSNP), que pueden o no alterar la estructura de las proteínas y consecuentemente su función; en SNP reguladores (rSNP), que tienen implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica; y en SNP estructurales (srSNP), los cuales alteran la traducción de los mRNA, el "splicing", la eficiencia de los potenciadores de "splicing" y la estabilidad de los mRNA (Figura 11) (Ramírez-Bello et al., 2013).

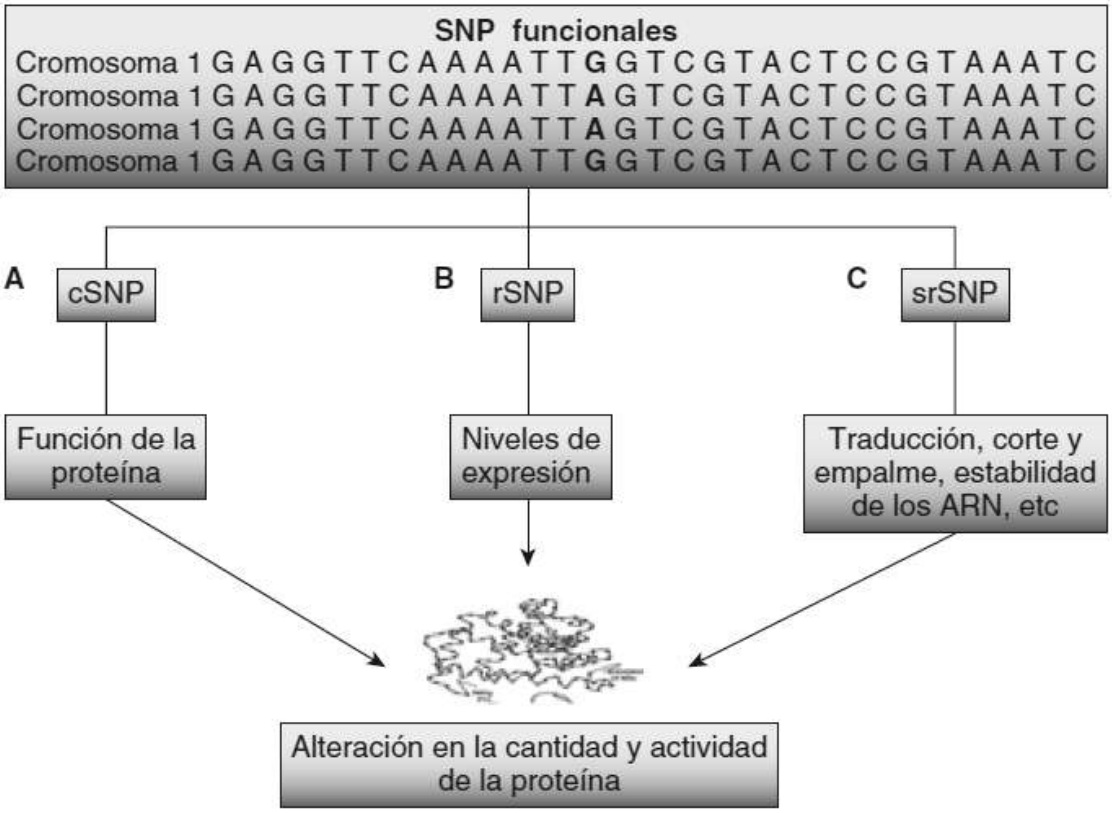


Figura 9. Clasificación de los SNP funcionales. Los SNP funcionales se dividen en tres grupos: a) cSNP codificantes, si alteran la estructura y función de la proteína); b) rSNP, si afectan a la expresión génica, y c) srSNP si afectan a la estructura de los mRNA genes que sintetizan proteínas. Tomado de Ramírez-Bello et al., 2013.

La expresión genética es un fenómeno biológico de vital importancia para el crecimiento, diferenciación, apoptosis y desarrollo de cada una de las células y de los organismos en un determinado espacio y tiempo. Dicho proceso depende de elementos *cis* reguladores encontrados en las regiones promotoras de los genes, específicamente en el núcleo y en los elementos próximos del promotor. Además de las diversas secuencias consenso *cis* unidas en el promotor, existen también diversas proteínas que actúan en *trans* tales como factores de transcripción, proteínas reguladoras de la transcripción que no se unen al ADN, ARN polimerasa II, y otros elementos que modulan la expresión genética de manera tejido especifica. Diversos reportes han documentado que las diferencias en la expresión entre un sujeto y otro pueden modificar el fenotipo en enfermedades complejas (Ogbourne & Antalis, 1998; Kininis et al., 2007; Näär et al., 2001; Hernández-Romano et al., 2009).

1.7.4 Polimorfismos en el gen MAO A

La secuenciación del gen MAO A permitió la caracterización de sus variantes y la influencia de cada una de ellas en la regulación conductual. Entre las numerosas variantes alélicas identificadas, cuatro polimorfismos han sido principalmente estudiados como potenciales biomarcadores/factores de riesgo para trastornos psiquiátricos. De los cuatro polimorfismos más significativos del gen MAO A (Tabla 2), el polimorfismo uVNTR ha sido el más estudiado. Seis variantes de este uVNTR han sido caracterizadas en base a su diferente número de repeticiones (2, 3, 3.5, 4, 5 y 6); en particular, los alelos de 3 repeticiones (3R) y 4 repeticiones (4R) son los más comunes en la población mundial. La variante 4R ha sido asociada a una elevada actividad transcripcional y enzimática, y diversos estudios han mostrado que portadores de este alelo tienen niveles elevados de ácido 5-hidroxiindolacético en el fluido cerebroespinal, así como también un alta prevalencia de trastorno de pánico y depresión mayor, acompañado de una respuesta pobre al tratamiento crónico con fluoxetina. Por otro lado, la variante de 3R ha sido relacionada con una disminución de la actividad catalítica en fibroblastos y con un alto riesgo para

rasgos conductuales relacionados a los síntomas del síndrome de Brunner, llamado también agresividad impulsiva y antisocial de la personalidad (Bortolato & Shih, 2011).

1.7.5 Polimorfismo de nucleótido único A644G en el gen MAO B

Varios polimorfismos en el gen MAO B han sido descritos (Tabla 3). Siete de diez polimorfismos de nucleótido único (SNP por sus siglas en inglés) en este mismo gen han sido identificados en poblaciones afroamericanas pero no fueron detectados en caucásicos y asiáticos. El único SNP encontrado en toda la población humana es el dimorfismo A/G (A644G) en la secuencia del intrón 13 (rs1799836), localizado a 36 pb rio arriba del exón 14, es decir, en el límite del intrón 13 y el exón 14 (Figura 10) (Sobell et al., 1997; Ho et al., 1995; Kurth et al., 1993).

Tabla 2. Polimorfismos más significativos en el gen MAO A.

Polimorfismo	Localización	Variación nucleotídica	Trastorno asociado
Repetición de dinucleótido	Intrón 2	(CA)n	Desorden bipolar
VNTR	Exón 1	23 pb	
RFLP's Fnu4H1 y EcoRV			
uVNTR	1.2 kb río arriba del promotor	30 pb	Desorden de pánico, depresión mayor y síndrome de Brunner

Tomado de Bortolato & Shih, 2011.

Tabla 3. Polimorfismos de nucleótido único más significativos en la secuencia del gen MAO B.

SNP ID	Localización del sitio de transcripción	Variación nucleotídica	Frecuencia alélica
rs2283729	63,640	C/T	0.28
rs3027452	83,893	C/T	0.20
rs1799836	**113,683**	**G/A**	**0.47**

Tomado de Kim et al., 2006.

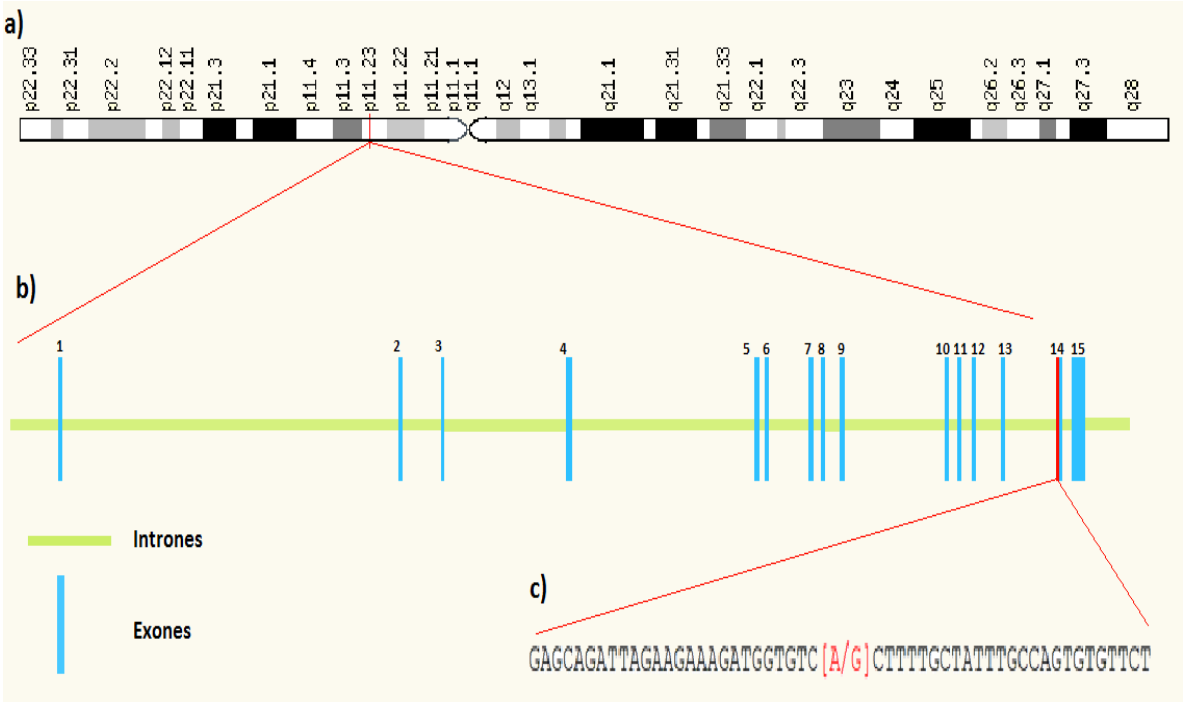


Figura 10. Características del gen MAO B. *a)* Localización del gen MAO B en el cromosoma X. *b)* Organización exón-intrón del gen MAO B y localización del SNP A644G. *c)* Punto de ocurrencia de la sustitución de adenina por guanina en el SNP A644G.

1.8 MAO B y trastornos psiquiátricos y conductuales

1.8.1 Descubrimientos clínicos

Niveles anormales de la actividad de la MAO que fueron reportados en estudios de varios trastornos mentales, tal como la depresión, esquizofrenia y Alzheimer, en conjunto con el descubrimiento de variaciones en los genes asociados a los cambios en la actividad cerebral y plaquetaria y la habilidad de las MAO para metabolizar neurotransmisores, sugiere su participación en la etiología de rasgos conductuales humanos y trastornos neuropsiquiátricos (Grimsby et al., 1991; Balciuniene et al., 2002; Garpenstrand et al., 2000; Jakubauskiene et al., 2012).

La actividad de la MAO B incrementa con el envejecimiento en el cerebro humano. Debido a que la MAO B se localiza predominantemente en células gliales un incremento grande de la MAO B puede ser atribuido a la proliferación de estas células. El aumento de la oxidación de la DA por MAO B en el adulto mayor puede ser asociado con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, que subyace a la enfermedad de Parkinson. De hecho, pacientes con enfermedad de Parkinson presentan elevada actividad de MAO B en la sustancia negra (Fowler et al., 1980; Levitt et al., 1982; Westlund et al., 1985; Shih et al., 1999).

1.8.2 Descubrimientos preclínicos

Por medio de la creación de cepas de ratones knockout MAO B se ha proporcionado evidencia de las consecuencias fenotípicas de los déficits de esta isoenzima. De acuerdo a la baja afinidad de la MAO B para 5-HT, los ratones deficientes de esta isoenzima mostraron únicamente cambios significativos en los niveles cerebrales de la PEA (particularmente en el núcleo estriado), y estuvieron acompañados por desinhibición conductual y alteraciones en la respuesta relacionada al estrés y ansiedad. Sin embargo, los niveles de los neurotransmisores monoamina principales (5-HT, NE y DA) fueron

comparables con los observados en ratones de tipo silvestre. Dada la implicación de la PEA en la regulación de las funciones de la DA y la relevancia de la DA en la desinhibición conductual y ansiolítica, es posible que la DA desempeñe una función importante en las características conductuales de los ratones MAO B knockout (Grimsby et al., 1997; Bortolato et al., 2009; Bortolato & Shih, 2011).

1.9 Procesamiento del mRNA

Usualmente los sitios ramificación en los pre-mRNA están localizados entre 18 a 40 nucleótidos río arriba del sitio aceptor de splicing. La mayoría de los genes eucariotas contiene intrones, que son eliminados por splicing de RNA. El reconocimiento de exones y splicing requiere de la presencia de sitos de empalme básicos "clásicos", tal como el punto de ramificación, la secuencia de polipirimidina y los sitios de empalme. La eficiencia de los procesos de splicing puede ser afectada por la presencia de elementos auxiliares y moduladores en algunos exones e intrones. Variaciones de un solo nucleótido en la secuencia de RNA puede modular el splicing alternativo o la eficacia del splicing al afectar la maquinaria de splicing basal o los factores de regulación de interacción splicing de pre-mRNA con RNA. Las proteínas SR contienen uno o más motivos de reconocimiento N-terminal de RNA y dominios C-terminal consistentes principalmente de residuos alternos de serina y arginina (S/R). Se cree que los dominios SR de las proteínas SR reclutan factores de splicing para el espliceosoma a través de múltiples interacciones entre proteínas con otros factores de splicing. Los potenciadores de splicing son sitios a los que las proteínas activadoras de splicing se unen, incrementando la probabilidad de que un sitio cercano sea utilizado como un punto de splicing. Los potenciadores de splicing pueden estar presentes tanto en exones como intrones (ESE e ISE, por sus siglas en inglés). La mayoría de las proteínas activadoras que se unen a ISE o ESE son miembros de la familia de proteínas SR, tal como las proteínas que contienen motivos de reconocimiento de RNA y dominios ricos en serina y arginina (SR). Se sabe que el aumento de unión de proteínas SR facilita la incorporación de los componentes de la maquinaria de splicing basal. La

eliminación de intrones de algunos pre-mRNA se produce más rápido que otros. Los eventos de splicing más lentos son los factores limitantes en la formación del mRNA. La mayoría de los genes humanos contiene intrones, la mayoría de los pre-mRNA se somete a splicing, y una alteración de los patrones normales de splicing puede causar o modificar una enfermedad humana. (Jakubauskiene et al., 2012; McCullough & Berget, 2000; Heinzen et al., 2008; Hull et al., 2007; Manley & Tacke, 1996; Wang & Burge, 2008; Hertel et al., 1997; Yue & Akusjärvi, 1999; Wetterberg et al., 1996).

2. ANTECEDENTES

Los estudios de casos y controles proporcionan un método eficiente para evaluar asociaciones entre genes candidatos y enfermedades complejas porque arrojan información sólida acerca de factores de riesgo ambientales, bioquímicos o genéticos después de que ha ocurrido la enfermedad de interés. La utilización de un grupo control en los ensayos de asociación evita obtener conclusiones erróneas al comparar los resultados de la variable que se investiga (Flores-Alfaro, 2012).

A través de los años, el SNP A644G de la MAO B ha sido investigado en varios estudios de casos y controles en diferentes razas humanas, principalmente en asociación con trastornos de carácter psiquiátrico, pero los resultados has sido poco concluyentes hasta ahora (Parsian et al., 2004). La identificación de un polimorfismo de nucleótido único en el intrón 13 del gen MAO B se asoció con la enfermedad de Parkinson (Kurth et al., 1993). Aunque la sustitución de adenina por una guanina en la secuencia limitante del intrón 13 con el exón 14 del gen de la MAO B no cambia la secuencia de aminoácidos, se asoció con variación en la actividad enzimática (Balciuniene et al., 2002). En plaquetas, se observó que la actividad de la MAO B es alta en portadores del alelo G comparado con los portadores del alelo A (Garpenstrand et al., 2000). En contraste, la actividad de la MAO B en el cerebro humano se relacionó con altos niveles de mRNA del alelo A (Balciuniene et al., 2002). En el 2005, un estudio de casos y controles para asociar polimorfismos en los genes MAO A y MAO B demostró que el SNP A644G de MAO B no está involucrado en el etiología de la migraña, y además, indicó que la frecuencia alélica en los grupos control es A>G para las mujeres y G>A en hombres (Filic et al., 2005). En el 2007, el genotipo A de MAO B se relacionó con un riesgo de dos veces mayor para el inicio temprano de la enfermedad de Parkinson comparado con controles sanos (Bialecka et al., 2007). Un año más tarde, se determinó al alelo G como un factor de riesgo para desarrollar esquizofrenia en mujeres de una población española (Gassó et al., 2008). De manera similar, un estudio realizado en población Han de China en 2011, para asociar los polimorfismos rs6323 de MAO A, rs1799836 de MAO B y el haplotipo rs6323T-rs1799836G con esquizofrenia,

identificó al alelo G de MAO B como un factor de susceptibilidad para esquizofrenia en toda la población estudiada, mientras que el haplotipo rs6323T-rs1799836G sólo es un factor de riesgo para la población femenina. En todos los grupos estudiados la frecuencia alélica de A644G fue A>G (Wei et al., 2011). En el año 2012, Jakubauskiene y colaboradores examinaron el impacto de A644G en el proceso de maduración del mRNA del gen MAO B; el estudio demostró que A644G en el gen de MAO B plaquetaria regula la formación del mRNA. Además, encontraron que este SNP no provoca cambios en la secuencia codificante, tampoco afecta los sitios aceptor y donador de splicing y que el alelo A es removido con mayor eficacia que el alelo G, ya que el nucleótido de adenina involucrada en el SNP aumenta la capacidad de montaje del complejo espliceosomal a una etapa temprana, por lo que las proteínas SR interactúan con mayor eficiencia y como consecuencia se lleva a cabo una eliminación más efectiva del intrón. Los pre-mRNA del alelo G del gen MAO B requieren de una cantidad mayor de proteínas SR para estimular el proceso de splicing.

También se han reportado efectos específicos de género de esta variante del gen MAO B en diferentes fenotipos, por ejemplo, un estudio de casos y controles con bases familiares encontró una asociación entre el SNP A644G de MAO B con la enfermedad de Parkinson en mujeres pero no en hombres (Kang et al., 2006). En un estudio realizado en el año 2007 para relacionar el SNP A644G de MAO B con la respuesta a tratamiento con paroxetina y mirtazapina en pacientes con depresión mayor, se demostró que las mujeres homocigotas A/A tienen un respuesta más destacada que las portadoras homocigotas G/G y heterocigotas A/G, mientras que en hombres no se encontró vinculación entre A644G y la respuesta al tratamiento antidepresivo (Tadić et al., 2007). En el 2012 en la ciudad de México, un estudio de casos y controles para asociar al polimorfismo uVNTR de MAO-A y el SNP A644G de MAO-B con síntomas positivos y negativos en pacientes con esquizofrenia, mostró una relación de la variante de 3 repeticiones del uVNTR de MAO A con el aplanamiento afectivo; mientras que para el gen MAO-B, encontró una asociación del SNP A644G con el mismo síntoma, siendo mayor en pacientes femeninas con genotipo GG (Camarena et al., 2012).

El presente trabajo parte de un propósito inicial de obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos más significativos de los genes MAO A y MAO B y relacionarlos con trastornos psiquiátricos, comenzando con la genotipificación de poblaciones control. En el 2012, Rojas-González determinó las frecuencias genotípicas y alélicas para las variantes de 3 y 4 repeticiones del uVNTR del gen MAO A en una población que contempló 102 individuos control (48 femeninos y 54 masculinos) en edad de 20 a 50 años, reclutados en la Facultad de Psicología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por medio de una historia clínica y valoración psiquiátrica por medio de la MINI (Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional), obteniendo para el género femenino una frecuencia alélica de 3R > 4R y para el género masculino una frecuencia alélica mayor de la variante 4R que de la variante 3R.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, las enfermedades mentales constituyen un problema importante de salud pública debido al incremento de su prevalencia con el paso de los años. De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente", uno de cada cuatro mexicanos de entre 18 y 65 años de edad ha padecido un trastorno mental en algún momento de su vida. Esta alza en la prevalencia de los trastornos mentales hace indispensable la búsqueda de marcadores moleculares y establecer metodologías eficaces para diagnóstico clínico de estos padecimientos. Diversos estudios de casos y controles en temática de genética y biología molecular proponen a los polimorfismos uVNTR de 1 y 3 repeticiones de MAO A y al SNP A644G de MAO B como marcadores moleculares para el diagnóstico de trastornos psiquiátricos, así como también, determinar la susceptibilidad de la población general a estos padecimientos. La genotipificación de polimorfismos y mutaciones puntuales en poblaciones particulares permite determinar la variabilidad genética intra e interpoblacional, suscitando la generación de bases de datos genéticos específicos de esa población, y la predisposición a una enfermedad.

4. HIPÓTESIS

La determinación de las variaciones alélicas del gen MAO B en una población control es posible por medio de técnicas moleculares de amplificación y análisis de secuencias de DNA.

5. OBJETIVOS

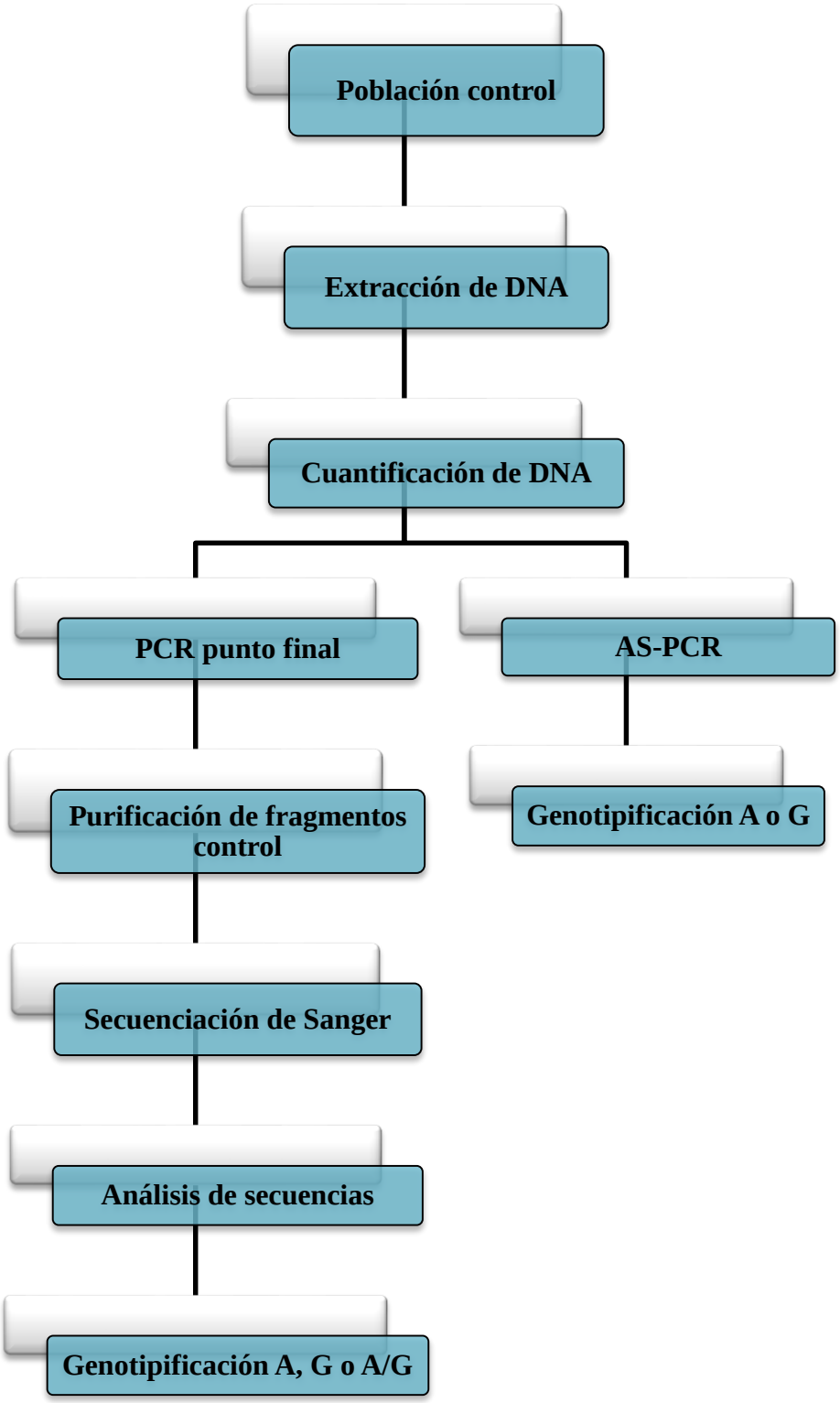
5.1 General:

- Determinar por medio de técnicas genético-moleculares las variantes alélicas del gen MAO B que prevalece en una población control.

5.2 Específico:

- Determinar el polimorfismo de nucleótido único (SNP) presente en el límite del intrón 13 y el exón 14 del gen MAO B.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Población control

La población control consistió de 102 muestras de individuos a los que se les reclutó, entrevistó y diagnosticó como individuos control en la Facultad de Psicología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo utilizando la herramienta de diagnóstico mental conocida como mini entrevista neuropsiquiátrica internacional (MINI, por sus siglas en inglés) y que accedieron a colaborar con el proyecto por medio de la firma de un consentimiento informado. El diagnóstico de los pacientes fue realizado por estudiantes pasantes de la facultad de Psicología bajo la supervisión del D. en C. Esteban Gudayol Ferré. El tamaño de muestra que se utilizó para la genotipificación del A644G de MAOB constió de treinta muestras equitativas en género, 50% de origen femenino y 50% de origen masculino.

7.1.1 Criterios de inclusión

- Diagnosticado como mentalmente sano.
- Sujetos de ambos sexos.
- Edad entre 20 y 50 años.
- Escolaridad mínima: secundaria concluida.
- Aceptar participar en el estudio y firma del consentimiento informado.

7.1.2 Criterios de no inclusión

- Antecedentes de enfermedades del sistema nervioso central con posibilidad de alteración neuropsicológica tales como epilepsia, meningitis e hidrocefalia.
- Presencia o antecedentes personales de otras enfermedades psiquiátricas.
- Presencia de enfermedad sistémica descompensada asociada a alteración cognoscitiva (Ej.:diabetes, hipertensión, hipertiroidismo).
- Obesidad mórbida.

- Presencia de trastornos sensoriales de tipo visual y/o auditivo (hipoacusia grave/ceguera).
- Uso de fármacos de acción central.
- Embarazo.

7.1.3 Criterios de eliminación

- Abandono voluntario del estudio.
- Dificultad para localizar al paciente después de una fallida extracción de DNA.

7.2 Extracción de DNA

La extracción del DNA genómico utilizado en este trabajo fue realizado por Rojas-González (2012), siguiendo las indicaciones del manual de Puregene Buccal Cell Core Kit B® de QIAGEN®. Éste emplea un detergente aniónico y un estabilizador de DNA para lisar la membrana celular y nuclear, una enzima digestora de RNA, sales para excluir las proteínas contaminantes y una solución de hidratación de DNA para preservar el material genético recién extraído.

El proceso de extracción se describe de la siguiente manera: primeramente se realizaron 10 raspados del epitelio de las paredes laterales de la cavidad oral de los pacientes por medio de un cepillo bucal perteneciente al kit de extracción antes mencionando, procurando no tocar los dientes y la lengua. Posteriormente, la base del cepillo se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le adicionó 330 µL de solución de lisis celular para liberar el material intracelular, enseguida se adicionó 1.5 µL de proteinasa K para lisar la membrana del núcleo celular y así poder liberar el DNA. Después de la incubación a la que se sometió la muestra para liberar todo el material intracelular, se agregó 1.5 µL de solución de RNAsa A para hidrolizar el RNA presente. Continuando con el procedimiento, se añadieron 100 µL de solución de precipitación de proteínas para deshidratar y romper los puentes de hidrógeno de las moléculas proteicas y así poder separarlas por centrifugación. Enseguida, el sobrenadante se agregó a un tubo Eppendorf de

1.5 mL, al cual se le depositó previamente 300 µL de isopropanol frío para remover la concentración residual de sales y promover la precipitación del DNA hasta ahora libre; y 0.5 µl de solución de glucógeno para favorecer este último propósito. Cuando se obtuvo el pellet de DNA, se le eluyó en 300 µL de etanol al 70% para lavarlo, este solvente se eliminó por evaporación en un Termoblock durante 5 minutos a 65°C. Al concluir este tratamiento, se agregó 20 µL de solución de hidratación de DNA para que éste obtuviera su estructura primaria y disolverlo; para este propósito, la solución se incubó toda la noche a 27°C con agitación de 55 rpm en el Termoblock. Al transcurrir el tiempo de incubación, se realizó el análisis de la integridad del DNA genómico extraído a través de ensayos de electroforesis con geles de agarosa al 1%. Una vez extraído el DNA, se procedió a cuantificar su concentración en cada una de las muestras por espectrofotometría, para lo cual se realizaron diluciones 1:50 y se utilizó la función dsDNA (DNA de doble cadena) del equipo a una longitud de onda de 260 nm (UV), obteniendo resultados en unidades de ng/µL.

7.3 Genotipificación del SNP A644G de MAO B

7.3.1 Cuantificación de DNA

La determinación de la concentración del DNA extraído se realizó por medio de un espectrofotómetro modelo BioPhotometer® de la marca Eppendorf® y de cubetas para DNA UVette® 220-1600 nm de la misma compañía, utilizando la función dsDNA (DNA de doble cadena) y una longitud de onda UV de 260/280 nm, para lo cual se prepararon diluciones 1:50 (1 µL de DNA genómico en 49 µL de agua libre de nucleasas) de cada una de las muestras, obteniendo los valores de esta magnitud en ng/µL.

Para expresar la concentración de DNA en unidades de µg/µL se empleó el valor registrado en la absorbancia de 260 nm en la siguiente fórmula:

$$\mu\mathbf{g}/\mu\mathbf{L} = \frac{(\mathbf{A})\ (\mathbf{50})\ (\mathbf{50}\ \mu\mathbf{g}/\mathbf{mL})}{\mathbf{1000}\ \mu\mathbf{L}/\mathbf{mL}}$$

Donde:

A = Absorbancia registrada a 260 nm.
50 = Factor de dilución de la muestra.
50 µg/mL = Concentración estándar de DNA a 260 nm por cada unidad de densidad óptica en una celda de 1 cm de longitud.
1000 µL/mL = Factor de conversión de volumen.

La importancia de este cálculo radica en la pequeña cantidad de DNA que debe utilizarse para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa.

7.3.2 Oligonucleótidos

El gen codificante para MAOB puede incluir un polimorfismo de cambio de una base nucleotídica (SNP por sus siglas en inglés) en el intrón 13; localizado a 36 pb río arriba del límite entre el intrón 13 y el exón 14, que involucra la sustitución de una Adenina por una Guanina A644G (Kurth et al., 1993) por lo que el gen MAOB existe en dos formas alternativas o alelos, A y G. Con esta información se buscó la zona donde tiene lugar esta sustitución de bases y se diseñaron los oligonucleótidos que permitan su identificación (Figura 11). Para esto se utilizó la secuencia reportada en la base de datos de NCBI con clave de acceso NG_008723. En base a esta secuencia se puede establecer que el amplicón correspondiente con la isoforma A tendrá una longitud de 125 pb, mientras que el de la isoforma G se constituirá de 193 pb (Figura 12) (Rojas González, 2012).

7.3.3 Determinación del SNP A644G de MAOB por AS-PCR

Para los ensayos de PCR Alelo específico (AS-PCR) se utilizaron treinta muestras de la población control general. Las cuales se seleccionaron de acuerdo a los parámetros de calidad de extracción (concentración de DNA igual o mayor a 2 ng/µL) determinados por cuantificación espectrofotométrica a 260 nm, y procurando igual proporción de muestras masculinas y femeninas. Las mezclas de los ensayos de AS-PCR se realizaron utilizando

12.5 µL de Multiplex PCR Master Mix, perteneciente al Multiplex PCR kit de QIAGEN®, el cual consta de cinco unidades por microlitro de HotStarTaq DNA polimerasa, 3mM de $MgCl_2$, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, y los DNTP´s; 0.8 µM de cada uno de los oligonucleótidos indicados en la figura 13; 0.2 µg de DNA genómico y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen de 25 µL (Tabla 4). La amplificación del A644G de MAO B por AS-PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo Gradient Palm-Cycler™ marca Corbett RESEARCH® el cual se programó a las condiciones que se muestran en la Tabla 5.

Connotación	Oligonucleótido	Posición en secuencia	Longitud (nucleótidos)	Tamaño de amplificado
→	MAO B Forward New	118556-118581	26	263 pb
→	Wild Type (Alelo A)	118694-118723	30	125 pb
←	Mutant Reverse (Alelo G)	118723-118747	25	192 pb
←	MAO B Antisense	118795-118818	24	263 pb
A	Sitio del SNP A644G	118723		

Figura 11. Secuencia nucleotídica del límite del intrón 13 y el exón 14 del gen MAO B, localización del SNP A644G (rojo), secuencia y localización de cada uno de los oligonucleótidos empleados para los ensayos de PCR Alelo específico (AS-PCR). Las flechas indican la dirección de amplificación y alineamiento de cada uno de los oligonucleótidos diseñados para el ensayo de PCR alelo específico para determinar el alelo presente en las muestras. Wild Type y Mutant Reverse consideran el nucleótido en posición 118723 en su estructura; siendo adenina para el primero y citosina para el segundo por ser complementario a la guanina que involucra el SNP A644G. Secuencia tomada de NCBI con clave de acceso NG_008723.

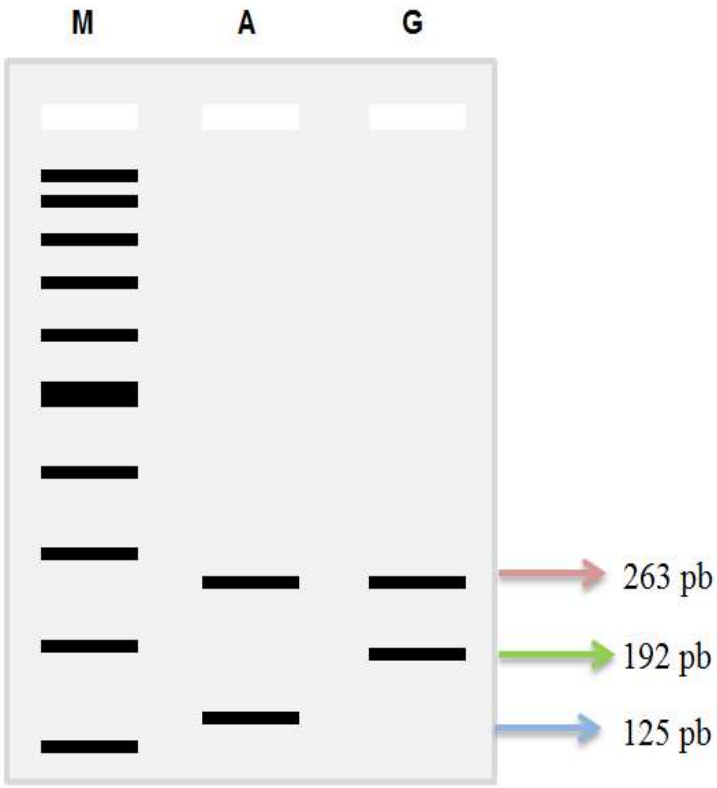


Figura 12. Patrones electroforéticos teóricos generados por los oligonucleótidos diseñados. A: amplicones esperados para el alelo A del gen MAO B. G: amplificados esperados para el alelo G. En ambos casos se espera una banda control de 263 pb generada por los oligonucleótidos MAO B Forward New y Mutant Reverse. M: marcador de peso molecular.

7.3.4 Análisis por electroforesis de los amplificados de A644G de MAOB obtenidos por AS-PCR

Al concluir el programa de amplificación, se procedió al análisis de los productos por medio de electroforesis en gel de agarosa. La concentración de agarosa empleada en la elaboración de los geles fue del 3%; para ello se utilizó 0.69 g de agarosa UltraPure™ de Invitrogen™ y se disolvió en 30 ml de buffer TBE 1X UltraPure™ de Invitrogen™. Una vez obtenido el gel, la cámara de electroforesis se llenó con buffer TBE 1X hasta la línea indicada. En todos los análisis se dispuso el volumen de reactivo indicado en la Tabla 6. La separación de los amplificados se llevó a cabo con un voltaje de ± 95V durante 120 minutos. Finalmente, para revelar los amplicones, el gel se sumergió en una solución de

bromuro de etidio al 0.01% durante 15 minutos. La captura de las imágenes correspondientes se llevó a cabo con el software fotodocumentador ChemiDoc™ de BIO-RAD®.

Tabla 4. Protocolo para mezcla de reacción de los ensayos AS-PCR.

Reactivo	Volumen empleado	Concentración final
QIAGEN Multiplex Master Mix®	12.5 µL	1X
Oligonucleótidos control	1 µL	0.8 µM
Oligonucleótidos alelo específicos	1 µL	0.8µM
Agua libre de nucleasas	c.b.p.	---
DNA genómico	variable	0.2 µg
Volumen final:	**25 µL**	

Tabla 5. Programa empleado para los ensayos de AS-PCR.

Etapa		Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1) Activación de la polimerasa		95	15 minutos	1
2) Ciclos de PCR	Desnaturalización	94	1 minuto	30
	Alineamiento	64	45 segundos	
	Extensión	72	30 segundos	
3) Extensión final		72	10 minutos	1
4) Conservación		4	∞	--

Tabla 6. Reactivos empleados para los análisis electroforéticos.

Reactivo	Concentración	Volumen empleado	Marca
Marcador de peso molecular 100 pb	1 µg/10 µL	1 µL	GeneCraft®
Buffer de carga Blue Juice®	10X	0.5 µL	Invitrogen™
Amplificados de AS-PCR	Variable	5 µL	---

Las concentraciones son las indicadas en el stock de cada uno de los productos.

7.3.5 Amplificación del fragmento control de MAOB por PCR punto final

Los ensayos de PCR punto final se elaboraron utilizando 12.5 µL del Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN® el cual contiene cinco unidades por microlitro de HotStarTaq DNA polimerasa, 3 mM de $MgCl_2$, KCL, $(NH_4)_2SO_4$, y los DNTP´s; 0.8 µM de cada uno de los oligonucleótidos Forward y Reverse (Ver figura 13), 0.2 µg de DNA genómico y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de reacción de 25 µL, como se observa en la Tabla 7. Se emplearon 20 muestras de DNA genómico para amplificar la región donde ocurre la sustitución del nucleótido de adenina por uno de guanina que involucra el SNP A644G de MAO B. La amplificación del A644G de MAOB por PCR punto final se llevó a cabo en un termociclador modelo Gradient Palm-Cycler™ marca Corbett RESEARCH® el cual se programó a las condiciones que se muestran en la Tabla 8.

7.3.6 Análisis por electroforesis de los amplificados de A644G de MAOB generados por PCR punto final

Los reactivos y condiciones de estos ensayos son similares a los empleados para los análisis de los amplificados obtenidos por AS-PCR, tal como se indica en la Tabla 6.

Tabla 7. Protocolo para mezcla de reacción de PCR punto final.

Reactivo	Volumen empleado	Concentración final
QIAGEN Multiplex Master Mix®	12.5 µL	1X
Oligonucleótidos control	2 µL	0.8 µM
Agua libre de nucleasas	c.b.p.	---
DNA genómico	variable	0.2 µg
Volumen final:	**25 µL**	

Tabla 8. Programa empleado para los ensayos de PCR punto final.

Etapa		Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1) Activación de la polimerasa		95	15 minutos	1
2) Ciclos de PCR	Desnaturalización	94	1 minuto	35
	Alineación	64	45 segundos	
	Extensión	72	30 segundos	
3) Extensión final		72	10 minutos	1
4) Conservación		4	∞	-

7.3.7 Purificación de productos de PCR punto final

Posteriormente los amplicones se purificaron de acuerdo a las indicaciones del QIAquick PCR Purification Kit® de QIAGEN®. Este kit emplea una membrana de sílice para unir el DNA en presencia de un buffer con un alto contenido de sales y posteriormente eluirlo con un buffer de bajo contenido en sales o agua.

7.3.8 Secuenciación de los fragmentos control del A644G de MAOB

La secuenciación de DNA permite identificar polimorfismos y mutaciones puntuales de una forma más precisa que la AS-PCR. El proceso de secuenciación se realizó en las instalaciones de la Unidad de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad LANGEBIO-CINVESTAV Unidad Irapuato utilizando el método de dideoxi de Sanger.

7.4 Análisis de datos

Los resultados de la secuenciación se analizaron a través de los software bioinfomáticos FinchTV 1.4.0 de Geospiza, Inc. y CLC Sequence Viewer 7.0 de QIAGEN®. El primero permite visualizar los electroferogramas y exportar la secuencia a un archivo de texto en formato FASTA. El segundo permite comparar y analizar de manera más detallada las secuencias previamente exportadas con FinchTV.

8. RESULTADOS

La identificación de las variantes alélicas del gen MAO B se llevó a cabo mediante la amplificación de la secuencia limitante entre el intrón 13 y el exón 14 del mismo gen, a partir del DNA genómico de células del epitelio bucal de 30 individuos control pertenecientes a una población general de 102 pacientes a los que se les reclutó, entrevistó y diagnosticó como mentalmente sanos en la Facultad de Psicología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, utilizando la herramienta de diagnóstico mental conocida como mini entrevista neuropsiquiátrica internacional (MINI, por sus siglas en inglés) y que accedieron a colaborar con el proyecto por medio de la firma de un consentimiento informado. Previo a los ensayos de amplificación, las muestras se cuantificaron por medio de un espectrofotómetro modelo BioPhotometer® de la marca Eppendorf®, obteniendo una concentración de DNA igual y mayor a 2 ng/µL, como puede verse en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Cuantificación de DNA para amplificación de A644G de MAOB por PCR punto final en muestras femeninas.

Muestras femeninas															
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
DNA ng/µL	3.5	3.2	3.1	3.1	3.0	7.3	4.9	5.0	4.4	8.0	2.8	2.0	2.0	2.0	2.0

Tabla 10. Cuantificación de DNA para amplificación de A644G de MAOB por PCR punto final en muestras masculinas.

Muestras masculinas															
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
DNA ng/µL	5.9	4.4	4.2	4	3.6	2.3	2.2	2.2	2.2	2.2	50.5	13.1	12.6	11.9	9.9

Para la genotipificación del SNP A644G de MAO B se realizó un primer ensayo de AS-PCR con las condiciones utilizadas por Rojas-González, 2012. Los resultados de aportados por este ensayo inicial mostraron productos de amplificación correspondientes con el alelo A del gen MAO B.

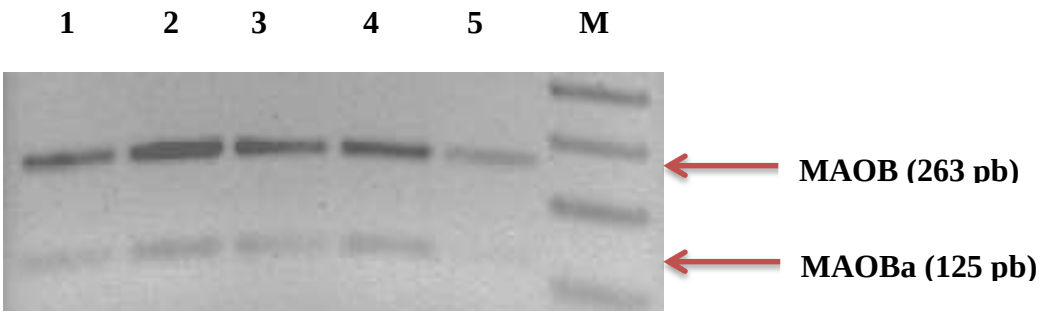


Figura 13. Análisis electroforético del primer ensayo de AS-PCR. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1.8%. (Carriles 1-5: productos de AS-PCR, carril M: Marcador de peso molecular de 100 pb).

8.1 Genotipificación del SNP A644G de MAO B por AS-PCR

Posterior al primer ensayo de AS-PCR con las condiciones utilizadas por Rojas-González, se procedió a realizar los ensayos para determinar la forma alélica presente en el DNA extraído de los pacientes control. Como se describe en materiales y métodos, se utilizaron 30 muestras con una cantidad de DNA genómico igual o mayor que 2 ng/µL, siendo el 50% pertenecientes al género femenino y el otro 50% al masculino. Después se realizaron análisis electroforéticos de los productos de AS-PCR. Se obtuvieron amplicones de 263 pb en el 100% de las muestras, que son los esperados para el control de la prueba, y en el 96% de las muestras se obtuvieron productos correspondientes con el alelo silvestre o A del gen MAOB, el cual se distingue por un tamaño de 125 pb (Figuras 14 y 15).

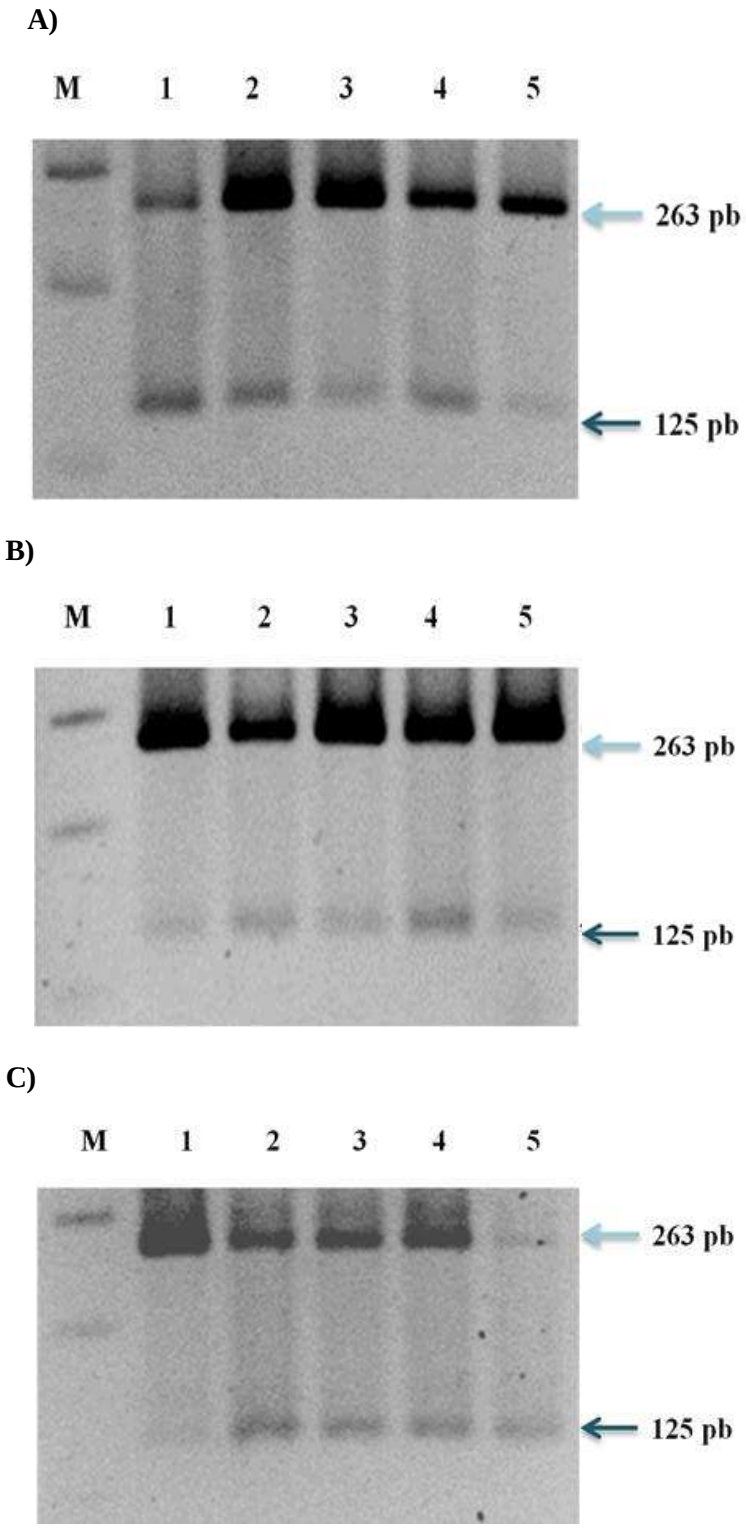


Figura 14. Análisis electroforético de los amplicones del SNP A644G de MAOB obtenidos por AS-PCR de muestras femeninas. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 2.3%. Carriles 1-5: productos de AS-PCR, carril M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

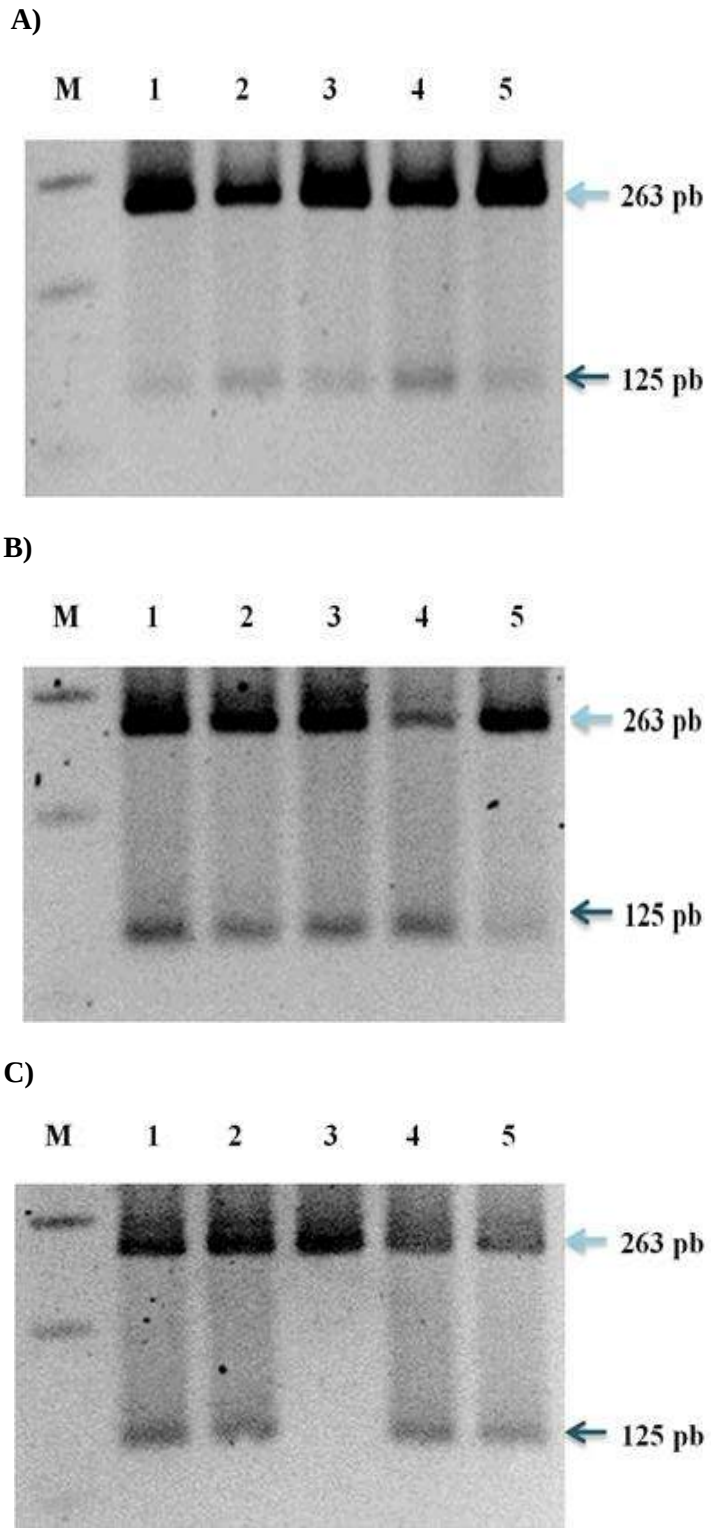


Figura 15. Análisis electroforético de los amplicones del SNP A644G de MAOB por AS-PCR de muestras masculinas. Los fragmentos de separaron en un gel de agarosa al 2.3%. Carriles 1-5: productos de AS-PCR, carril M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

8.2 Genotipificación del SNP A644G de MAO B por secuenciación de Sanger

8.2.1 Amplificación del fragmento control de MAO B por PCR punto final

Se realizaron previamente veinte ensayos de PCR punto final empleando los oligonucleótidos MAO B Forward New y MAO B Antisense, con la finalidad de amplificar el fragmento control de 263 pb que contiene el polimorfismo y que genera un buen rendimiento. Los reactivos y los volúmenes empleados de los mismos para estos ensayos de PCR se indican en la Tabla 7 del apartado de materiales y métodos, así mismo en esa sección en la Tabla 8 se indican las condiciones empleadas en el programa de PCR punto final utilizado. Al finalizar la amplificación los productos de la PCR punto final se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2.3%, obteniendo en todos los casos los fragmentos esperados de 263 pb (Figura 16).

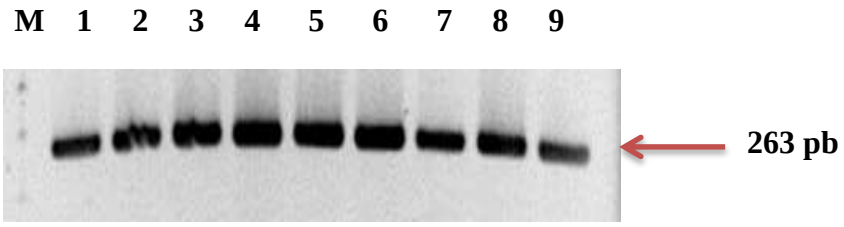


Figura 16. Análisis electroforético de los productos de PCR punto final. (Carriles 1-9: productos de PCR punto final, M: Marcador de peso molecular 100 pb).

8.2.2 Purificación de productos de PCR punto final

La purificación de los productos de amplificación se realizó de acuerdo a las indicaciones establecidas en el manual de QIAquick PCR Purification Kit® de QIAGEN®, sin embargo, la elución de los amplificados se realizó en el Buffer PE® perteneciente al mismo kit® debido a que en agua libre de nucleasas no se obtuvo evidencia después de realizar la electroforesis posterior y tampoco después de someterlos a radiación UV. Los

productos PCR punto final purificados se analizaron en un gel de agarosa al 2.3% utilizando el buffer de carga incluido en el kit de purificación (Figura 17).

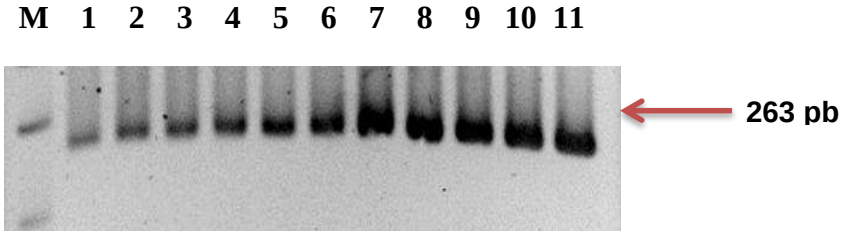


Figura 17. Análisis electroforético de los productos purificados de PCR punto final. Los amplificados se separaron en gel de agarosa al 2.3% a 95 V durante 120 minutos. (Carriles 1-5: productos purificados de PCR punto final, M: Marcador de peso molecular 100 pb).

8.2.3 Secuenciación de los fragmentos control de MAO B

Previo a la secuenciación los productos purificados de PCR punto final se cuantificaron por medio de un espectrofotómetro modelo BioPhotometer® de la marca Eppendorf®, obteniendo concentraciones de DNA en un rango de 10 a 25 ng/µL. El análisis de los electroferogramas por medio de FinchTV 1.4.0 demuestra la presencia del nucleótido de adenina involucrada en el SNP A644G en el 100% de las muestras secuenciadas (Figuras 18 y 19). El análisis de alineamiento de las muestras secuenciadas por medio de CLC Sequence Viewer 7.0 (Figura 20) confirma que las muestras corresponden al alelo A y que además la población es homocigota A/A para el gen MAOB.

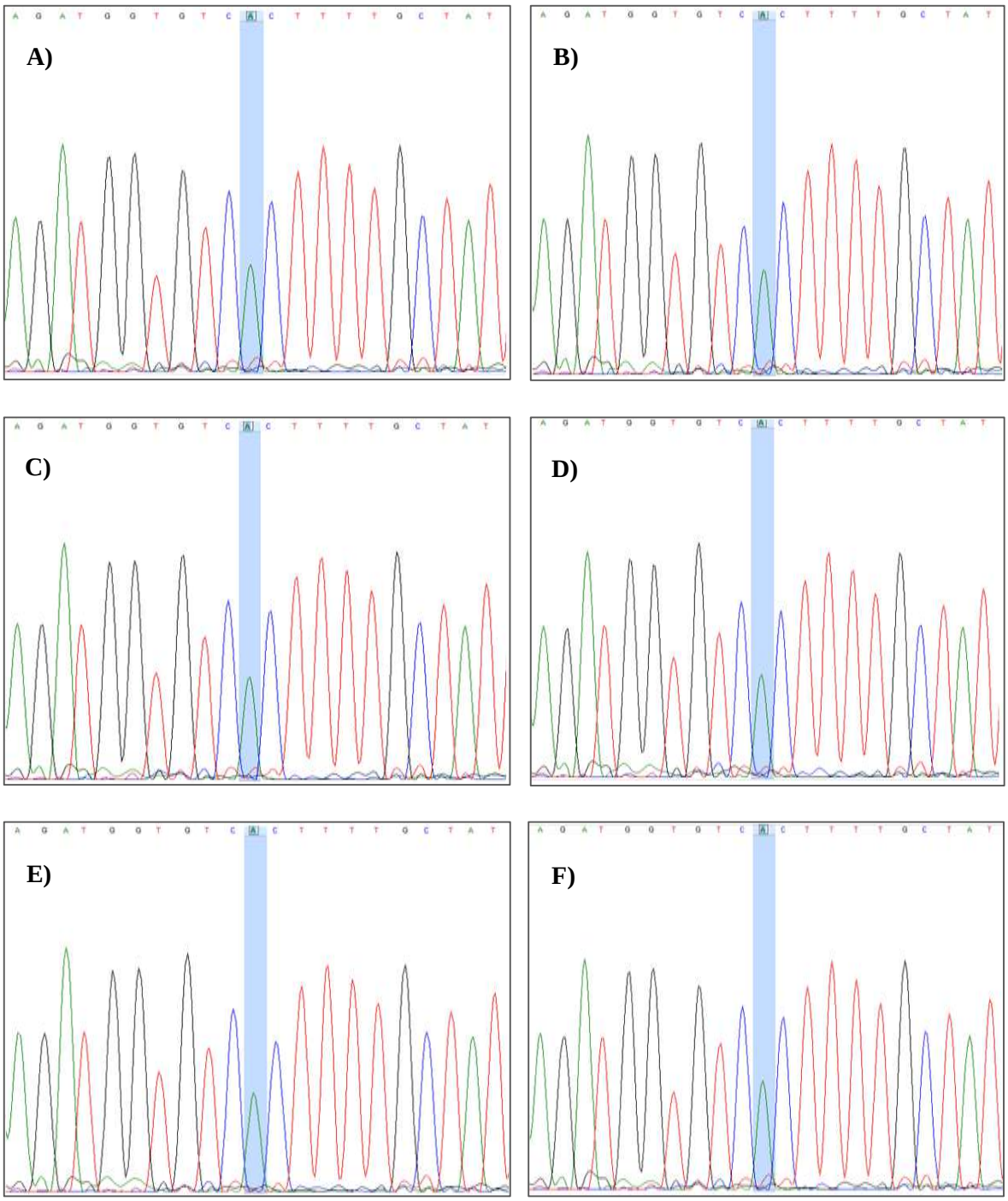


Figura 18. Electroferogramas de los amplicones control del gen MAOB a partir de muestras femeninas. La zona sombreada en color azul claro indica la presencia del nucleótido de adenina (involucrado en el SNP A644G) correspondiente a la secuencia del alelo A del gen MAO B. Verde: adenina; azul: citosina; negro: guanina; rojo: timina.

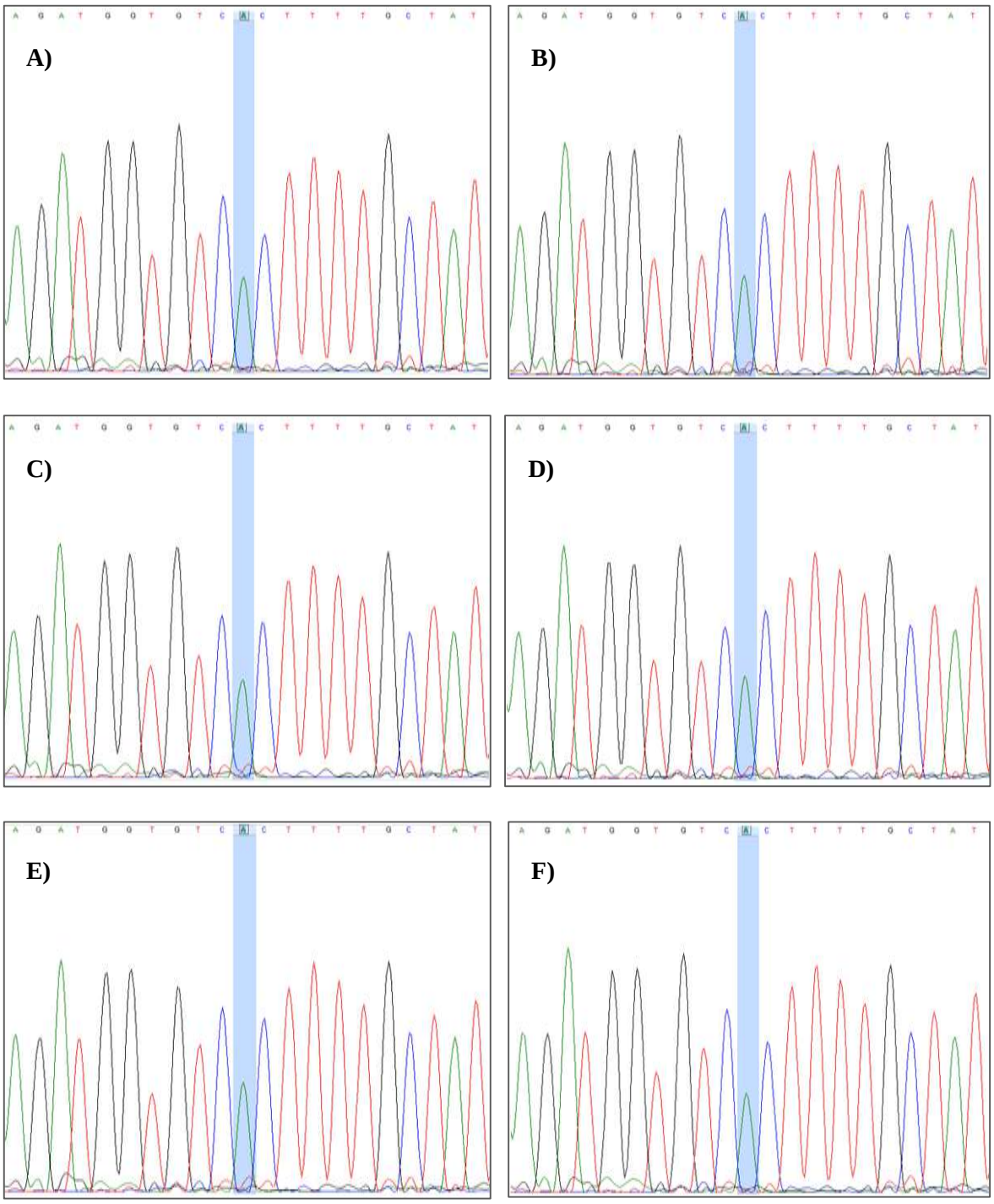


Figura 19. Electroferogramas de los amplicones control del gen MAOB a partir de muestras masculinas. La zona sombreada en color azul claro indica la presencia del nucleótido de Adenina (involucrado en el SNP A644G) correspondiente a la secuencia del alelo A del gen MAO B. Verde: adenina; azul: citosina; negro: guanina; rojo: timina.

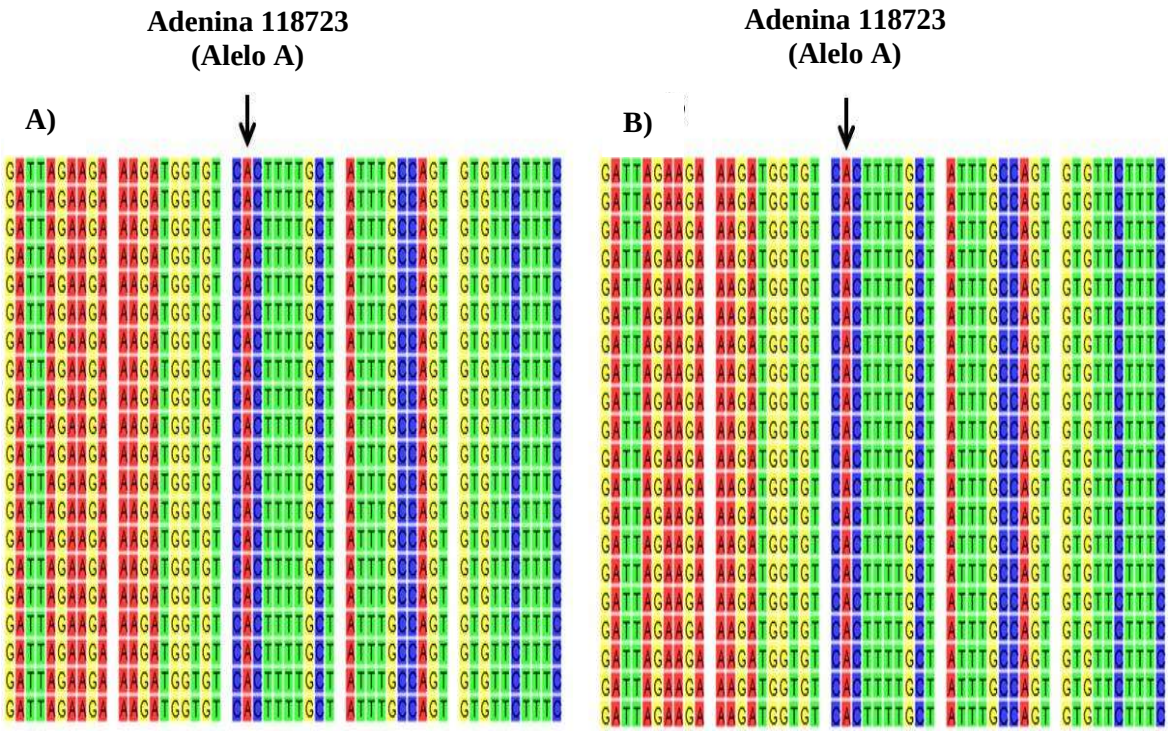


Figura 20. Alineamiento de las secuencias obtenidas por el método dideoxi de Sanger de los amplificados por PCR punto final de los fragmentos control del gen MAOB. a) Muestras femeninas; b) Muestras masculinas.

Tabla 11. Genotipificación de las muestras femeninas por AS-PCR y Secuenciación de Sanger.

Muestra	Genotipificación por AS-PCR			Genotipificación por Secuenciación	
	Fragmento control	Alelo A	Alelo G	Alelo A	Alelo G
01	+	+	-	N/U	N/U
02	+	+	-	N/U	N/U
03	+	+	-	+	-
04	+	+	-	+	-
05	+	+	-	+	-
06	+	+	-	+	-
07	+	+	-	+	-
08	+	+	-	N/U	N/U
09	+	+	-	+	-
10	+	+	-	+	-
11	+	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
13	+	+	-	N/U	N/U
14	+	+	-	N/U	N/U
15	+	+	-	+	-

+: amplificado y alelo presente; **-:** amplificado y alelo ausente; **N/U:** no utilizado para los ensayos.

Tabla 12. Genotipificación de las muestras masculinas por AS-PCR y Secuenciación de Sanger.

Muestra	Genotipificación por AS-PCR			Genotipificación por Secuenciación	
	Fragmento control	Alelo A	Alelo G	Alelo A	Alelo G
01	+	+	-	+	-
02	+	+	-	+	-
03	+	+	-	N/U	N/U
04	+	+	-	N/U	N/U
05	+	+	-	+	-
06	+	+	-	+	-
07	+	+	-	+	-
08	+	+	-	N/U	N/U
09	+	+	-	N/U	N/U
10	+	+	-	+	-
11	+	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-
13	+	+	-	+	-
14	+	+	-	N/U	N/U
15	+	+	-	+	-

+: amplificado y alelo presente; **-:** amplificado y alelo ausente; **N/U:** no utilizado para los ensayos.

9. DISCUSIÓN

La monoamino oxidasa es una flavoproteína unida a la membrana mitocondrial externa de tipo oxigeno oxidoreductasa que cataliza la desaminación oxidativa de aminas neurotransmisoras biogénicas y xenobióticas a sus aldehídos correspondientes. Desde su descubrimiento en 1928 (Hare, 1928), la monoamino oxidasa y sus isoenzimas han sido dianas de una amplia variedad de estudios, desde aquellos para dilucidar características bioquímicas propias de la enzima, hasta aquellos que procuran asociarla con los trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos más frecuentes en humanos desde una perspectiva genética, es decir, asociarla con estos padecimientos al estudiar los polimorfismos presentes en los genes MAO A y MAO B. Los avances en esta última línea de investigación respecto a la monoamino oxidasa proponen a los polimorfismos uVNTR de MAO A y SNP A644G de MAO B como marcadores moleculares para asociación con trastornos psiquiátricos.

La PCR alelo específico es una técnica de biología molecular que permite discriminar entre los alelos que presenta un gen en específico ya que se basa en la búsqueda de nucleótidos no complementarios en los extremos 3’ de los oligonucleótidos, es decir, uno de ellos tiene le nucleótido 3’ complementario para el gen normal, mientras que el otro tiene el nucleótido 3’ complementario para el gen mutado, por lo que se amplifican los alelos con una variante en específico.

En el presente trabajo se aplicaron técnicas de biología molecular basados en PCR, en sus variantes alelo específico y punto final; y secuenciación por método de Sanger para genotipificar el SNP A644G localizado en la secuencia del intrón 13 del gen MAO B en una población control, los cuales fueron reunidos en la facultad de Psicología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, obteniendo para el 100% de los casos un genotipo correspondiente con el alelo A de este mismo gen. El primer paso para la amplificación del SNP A644G de MAOB por PCR fue la cuantificación de DNA extraído a partir de las células epiteliales bucales de la población control, obteniendo una concentración de DNA igual y mayor a 2 ng/µL (Tabla 9 y 10). El segundo paso consistió en la genotipificación del SNP A644G de MAO B, y para ello realizó un primer ensayo de

AS-PCR con las condiciones utilizadas por Rojas-González, 2012. Los resultados del análisis electroforético muestran productos de amplificación correspondientes con el alelo A del gen MAO B. Después de analizar los productos por electroforesis observamos un buen rendimiento en los fragmentos amplificados de 263 pb por los oligonucleótidos control (MAO B Forward New y MAO B Antisense) y uno bajo para los amplicones generados por el alineamiento y amplificación de los oligonucleótidos MAO B Forward New y Wild Type (específico con el alelo A), por lo que decidimos modificar los tiempos de alineamiento y extensión empleados en el programa de AS-PCR de Rojas-González, 2012; pasando de 1 minuto en ambos ciclos a 45 segundos y 30 segundos respectivamente, como se puede observar en la Tabla 13. Las temperaturas de estos ciclos no se modificaron ya que la Tm de los cuatro oligonucleótidos es muy semejante (oscilan entre 56.8 y 60.6 °C) y porque la especificidad del AS-PCR aumenta con la temperatura de alineamiento, siendo 64 °C la temperatura máxima a la que pueden someterse los oligonucleótidos y 72 °C la temperatura a la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad.

Tabla 13. Comparación de los programas de AS-PCR para amplificación del SNP A644G de MAOB.

Etapa		Condiciones iniciales		Condiciones finales	
		Temperatura	**Tiempo**	**Temperatura**	**Tiempo**
1) Activación de la polimerasa		95° C	15 min	95°C	15 min
2) Ciclos de PCR	Desnaturalización	94°C	1 min	94°C	1 min
	Alineamiento	64°C	1 min	64°C	**45 seg**
	Extensión	72°C	1 min	72°C	**30 seg**
3) Extensión final		72°C	10 min	72°C	10 min
4) Conservación		4°C	∞	4°C	∞

Se indican las modificaciones realizadas al programa empleado por Rojas-González, 2012.

Como se menciona en el párrafo anterior, al modificar las temperaturas de alineamiento y extensión de los ciclos de AS-PCR, se obtuvo un buen rendimiento de los productos amplificados por los oligonucleótidos control (MAO B Forward New y MAO B Antisense); mientras que los generados por los oligonucleótidos alelo específicos mostraron una baja resolución y solamente se obtuvo una banda, la cual corresponde con el alelo A. En base a esta observación se analizó las secuencias de los oligonucleótidos alelo específico, encontrando que estas no coinciden con la secuencia reportada para el gen MAO B en NCBI. Esta disimilitud comprende nucleótidos que fueron sustituidos por otros y algunos que no están presentes en la secuencia de ambos oligonucleótidos (Figura 21). En un principio sólo se contemplaba la genotipificación de las muestras empleando únicamente la técnica de AS-PCR, pero debido a la diferencia en la estructura nucleotídica de los oligonucleótidos alelo específicos decidimos modificar la estrategia experimental, adicionando ensayos de PCR punto final con la finalidad de obtener el fragmento control que involucra la secuencia donde tiene lugar la sustitución del nucleótido de adenina por guanina en el SNP A644G en el intrón 13 del gen MAO B y posteriormente analizar sus secuencias nucleotídicas por el método dideoxi de Sanger. Los ensayos de AS-PCR se realizaron con el objetivo de observar la funcionalidad de los oligonucleótidos alelo específicos pese a la diferencia de su estructura con la secuencia nucleotídica del intrón 13 del gen MAO B.

La secuenciación de DNA permite identificar polimorfismos y mutaciones puntuales, por lo que la última etapa experimental de este trabajo consistió en aislar y analizar el fragmento de 263 pb que se obtiene a través del alineamiento y amplificación de los oligonucleótidos Forward y Reverse, y poder determinar cuál de las dos isoformas del gen MAO B está presente en la población control de este trabajo. El análisis de los electroferogramas obtenidos de la secuenciación de los amplificados de 263 pb generados por PCR punto final por medio de los software bioinformáticos FichTV 1.4.0 y CLC Sequence Viewer 7.0 permite identificar el nucleótido de adenina involucrado en el SNP A644G en el 100% de las muestras secuenciadas (Figura 20 y 21), lo que permite aseverar que las muestras corresponden al alelo A y que además la población es homocigota A/A

para el gen MAOB, confirmando los resultados por electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por AS-PCR.

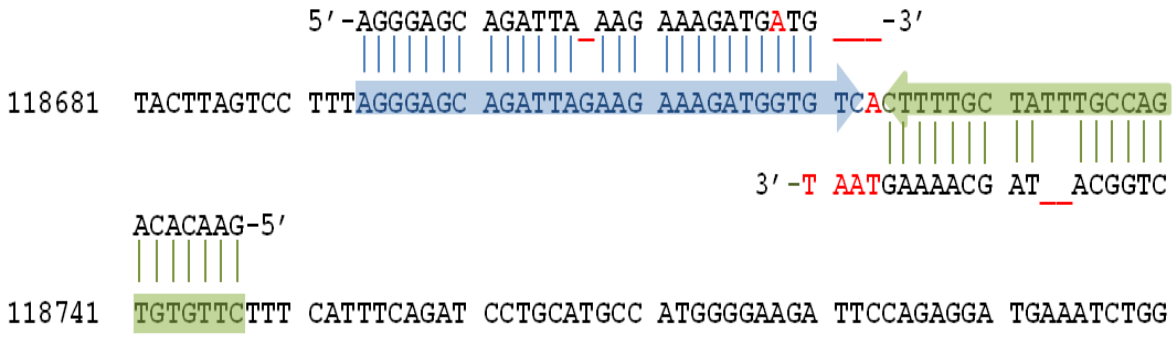


Figura 21. Comparación de las secuencias de los oligonucleótidos alelo específicos con la secuencia del gen MAO B. Las flechas indican la secuencia correcta de los oligonucleótidos Wild Type para el alelo A (azul) y Mutant Reverse para el alelo G (verde), así como la dirección 5'-3' de estos en el gen MAO B. Las secuencias de los oligonucleótidos alelo específicos que se utilizaron se indican en paralelo a la secuencia del gen. En negrita se indica los nucleótidos que coinciden con la secuencia diseño, en rojo los que se sustituyen; y con el mismo color y subrayado los ausentes en el inserto. La coincidencia de nucleótidos se indica con las líneas verticales.

La presencia de los productos de amplificación de un tamaño aproximado de 125 pb (Figuras 14 y 15), es un hecho inusitado, ya que teóricamente no debería generarse ningún amplificado por oligonucleótidos cuya especificidad no corresponde o está modificada por alteraciones en su secuencia nucleotídica. Una explicación para este hecho pueden ser una conjunción de la coincidencia en un 83.3% de la secuencia del oligonucleótido Wild Type con la correspondiente del gen MAO B (NCBI: NG_008723) para este mismo oligonucleótido, que permite su alineamiento pese a no poseer el nucleótido de adenina en el extremo 3' que corresponde con el alelo A; con la presencia de un nucleótido de timina en el extremo 3' del oligonucleótido Mutant Reverse en lugar de la citosina que corresponde con la secuencia del alelo G del gen MAO B, por lo que también podría estar alineándose y generando producto de amplificación con un tamaño menor de 200 pb. La ausencia de producto amplificado en la muestra masculina número 13 probablemente se debe a un error en la manipulación del oligonucleótido, ya que dentro de las muestras

secuenciadas se encuentra ésta, y como puede observarse en la Tabla 12 corresponde con el genotipo A/A del gen MAO B. A pesar de haber obtenido una genotipificación fiable por secuenciación de los amplicones de 263 pb, estos datos no se pueden considerar relevantes debido a que el pequeño tamaño de muestra excluye una interpretación fiable de estos resultados y da lugar a interpretaciones falsas positivas, por lo que se necesita realizar repeticiones de estos ensayos en poblaciones más grandes de grupos control y así como también en poblaciones de casos.

Dentro del ámbito clínico, el polimorfismo A644G del gen MAO B y otras mutaciones en su homólogo MAO A se han relacionado con diversos padecimientos y trastornos que involucran alteraciones en los sistemas de neurotransmisión. En un principio la monoamino oxidasa B se relacionó con trastornos mentales por la observación de cambios significantes en la actividad enzimática de esta proteína en pacientes con diversos trastornos psiquiátricos. MAO B se asoció principalmente con la enfermedad de Parkinson. Estos análisis condujeron a la investigación de los genes que codifican las dos isoenzimas MAO, A y B. Los resultados de estos estudios proporcionaron evidencia de que existen variantes en la secuencia de DNA de los genes MAO, y en conjunto con los descubrimientos previos de niveles anormales de la actividad de la MAO y la capacidad de esta enzima para oxidar neurotransmisores apoyan la idea de la participación de esta proteína en la etiología de muchos trastornos de carácter psiquiátrico.

Como ya se mencionó, los estudios de asociación del polimorfismo de nucleótido único A644G en la secuencia del intrón 13 del gen MAO B se basaron únicamente en observar la presencia de este SNP y los niveles de actividad enzimática de MAO B en el mismo individuo, ya sea control o paciente, pero hasta ahora los resultados son poco concluyentes debido a que diversos factores, los resultados de estos estudios de asociación convergen en la puntualización de que las mujeres son más propensas a padecer un trastorno mental en alguna etapa de su vida ya que el gen que codifica para las enzimas MAO se localiza en el cromosoma X y que la variación alélica y genotípica del SNP A644G es variable entre las diferentes poblaciones, por ejemplo, el estudio realizado en España por Gassó y colaboradores y el realizado en población Han de China por Wei y

colaboradores, en los que se ha demostrado una relación más estrecha entre el polimorfismo A644G de MAO B y esquizofrenia en mujeres ya que pueden ser portadoras del genotipo de riesgo G/G como del haplotipo rs6323T-rs1799836G, que es consecuencia de le presencia de dos cromosomas X en el genoma femenino, por lo que estudios posteriores para relacionar este polimorfismo con algún trastorno deben considerar diferencias de género y características de raza ya que cada población posee su propia variación genética, así como también tamaños de muestra mayores para obtener niveles de variación de resultados adecuados que conlleven a la aplicación de cálculos estadísticos que permitan obtener conclusiones más fiables.

10. CONCLUSIÓN

Es posible obtener el genotipo de un individuo por medio de la utilización de técnicas de biología molecular. Destacando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en su variante alelo específico, que en conjunto con la secuenciación de fragmentos de DNA, permiten identificar las formas en los que se puede presentar un gen, haciéndola una herramienta con alto nivel de fiabilidad para el diagnóstico por laboratorio de mutaciones y polimorfismo puntuales. Un tamaño de muestra grande en estudios de asociación con casos y controles permite obtener variabilidad de resultados, lo que permite detectar diferencias entre grupos y obtener conclusiones menos erróneas.

11. REFERENCIAS

Anderson, M. C., Hasan, F., McCrodden, J. M., & Tipton, K. F. (1993). Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochemical Research*, *18*(11), 1145–1149.

Arai, R., Karasawa, N., Kurokawa, K., Kanai, H., Horiike, K., & Ito, A. (2002). Differential subcellular location of mitochondria in rat serotonergic neurons depends on the presence and the absence of monoamine oxidase type B. *Neuroscience*, *114*(4), 825–835.

Bach, A. W., Lan, N. C., Johnson, D. L., Abell, C. W., Bembenek, M. E., Kwan, S.-W., … Shih, J. C. (1988). cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(13), 4934–4938.

Balciuniene, J., Emilsson, L., Oreland, L., Pettersson, U., & Jazin, E. (2002). Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Human Genetics*, *110*(1), 1–7. doi:10.1007/s00439-001-0652-8.

Bialecka, M., Klodowska-Duda, G., Honczarenko, K., Gawrońska-Szklarz, B., Opala, G., Safranow, K., & Droździk, M. (2007). Polymorphisms of catechol-0-methyltransferase (COMT), monoamine oxidase B (MAOB), N-acetyltransferase 2 (NAT2) and cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene in patients with early onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *13*(4), 224–229. doi:10.1016/j.parkreldis.2006.10.006

Binda, C., Li, M., Hubálek, F., Restelli, N., Edmondson, D. E., & Mattevi, A. (2003). Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(17), 9750–9755.

Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Edmondson, D. E., & Mattevi, A. (2002). Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature Structural & Molecular Biology*, *9*(1), 22–26. doi:10.1038/nsb732.

Bond, P. A., & Cundall, R. L. (1977). Properties of monoamine oxidase (MAO) in human blood platelets, plasma, lymphocytes and granulocytes. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *80*(2), 317–326.

Bortolato, M., Chen, K., & Shih, J. C. (2010). CHAPTER 2.4 - The Degradation of Serotonin: Role of MAO. In Christian P. Müller and Barry L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. Volume 21, pp. 203–218). Elsevier. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700795

Bortolato, M., Godar, S. C., Davarian, S., Chen, K., & Shih, J. C. (2009). Behavioral disinhibition and reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*, *34*(13), 2746–2757.

Bortolato, M., & Shih, J. C. (2011). Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 100, pp. 13–42). Elsevier. Retrieved from http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864673000029

Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., … Shih, J. C. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science (New York, N.Y.)*, *268*(5218), 1763–1766.

Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., … Shih, J. C. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science (New York, N.Y.)*, *268*(5218), 1763–1766.

Chen, K. (2004). Organization of MAO A and MAO B Promoters and Regulation of Gene Expression. *NeuroToxicology*, *25*(1-2), 31–36. doi:10.1016/S0161-813X(03)00113-X.

Dahlstroem, A., & Fuxe, K. (1964). EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, SUPPL 232:1–55.

Derry, J. M., Lan, N. C., Shih, J. C., Barnard, E. A., & Barnard, P. J. (1989). Localization of monoamine oxidase A and B genes on the mouse X chromosome. *Nucleic Acids Research*, *17*(20), 8403.

Donnelly, C. H., & Murphy, D. L. (1977). Substrate- and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochemical Pharmacology*, *26*(9), 853–858.

Edmondson, D. E., Bhattacharyya, A. K., & Walker, M. C. (1993). Spectral and kinetic studies of imine product formation in the oxidation of p-(N,N-dimethylamino)benzylamine analogues by monoamine oxidase B. *Biochemistry*, *32*(19), 5196–5202.

Edmondson, D. E., Binda, C., & Mattevi, A. (2007). Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *464*(2), 269–276. doi:10.1016/j.abb.2007.05.006.

Edmondson, D. E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A. K., & Mattevi, A. (2009). Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. *Biochemistry*, *48*(20), 4220–4230. doi:10.1021/bi900413g.

Feuk, L., Carson, A. R., & Scherer, S. W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, *7*(2), 85–97. doi:10.1038/nrg1767.

Filic, V., Vladic, A., Stefulj, J., Cicin-Sain, L., Balija, M., Sucic, Z., & Jernej, B. (2005). Monoamine oxidases A and B gene polymorphisms in migraine patients. *Journal of the Neurological Sciences*, *228*(2), 149–153. doi:10.1016/j.jns.2004.11.045.

Flores-Alfaro, E. (2012). Diseños de investigación en epidemiología genética. *Revista Panamericana de Salud Publica*, *31*(1).

Fornai, F., Chen, K., Giorgi, F. S., Gesi, M., Alessandri, M. G., & Shih, J. C. (1999). Striatal Dopamine Metabolism in Monoamine Oxidase B-Deficient Mice: A Brain Dialysis Study. *Journal of Neurochemistry*, *73*(6), 2434–2440.

Fowler, C. J., Mantle, T. J., & Tipton, K. F. (1982). The nature of the inhibition of rat liver monoamine oxidase types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline. *Biochemical Pharmacology*, *31*(22), 3555–3561.

Fowler, C. J., Wiberg, A., Oreland, L., Marcusson, J., & Winblad, B. (1980). The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase. *Journal of Neural Transmission*, *49*(1-2), 1–20.

Freeman, J. L. (2006). Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research*, *16*(8), 949–961. doi:10.1101/gr.3677206.

Garpenstrand, H., Ekblom, J., Forslund, K., Rylander, G., & Oreland, L. (2000). Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype. *Journal of Neural Transmission*, *107*(5), 523–530.

Garrick, N. A., & Murphy, D. L. (1980). Species differences in the deamination of dopamine and other substrates for monoamine oxidase in brain. *Psychopharmacology*, *72*(1), 27–33.

Gassó, P., Bernardo, M., Mas, S., Crescenti, A., Garcia, C., Parellada, E., & Lafuente, A. (2008). Association of A/G polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with schizophrenia in a Spanish population. *Neuropsychobiology*, *58*(2), 65–70. doi:10.1159/000159774.

Greenawalt, J. W., & Schnaitman, C. (1970). An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, *46*(1), 173–179.

Grimsby, J., Chen, K., Wang, L.-J., Lan, N. C., & Shih, J. C. (1991). Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(9), 3637–3641.

Grimsby, J., Lan, N. C., Neve, R., Chen, K., & Shih, J. C. (1990). Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. *Journal of Neurochemistry*, *55*(4), 1166–1169.

Grimsby, J., Toth, M., Chen, K., Kumazawa, T., Klaidman, L., Adams, J. D., … Shih, J. C. (1997). Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nature Genetics*, *17*(2), 206–210. doi:10.1038/ng1097-206.

Hall, D. (2007). *A Single Nucleotide Polymorphism is a change of a nucleotide at a single base-pair location on DNA. Created using Inkscape v0.45.1.* Retrieved from http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dna-SNP.svg.

Hare, M. L. C. (1928). Tyramine oxidase. *Biochemical Journal*, *22*(4), 968–979.

Heinzen, E. L., Ge, D., Cronin, K. D., Maia, J. M., Shianna, K. V., Gabriel, W. N., … Goldstein, D. B. (2008). Tissue-Specific Genetic Control of Splicing: Implications for the Study of Complex Traits. *PLoS Biology*, *6*(12), e1. doi:10.1371/journal.pbio.1000001.

Hernández-Romano, J., Martínez-Barnetche, J., & Valverde-Garduño, V. (2009). [Polymorphisms in gene regulatory regions and their role in the physiopathology of complex disease in the post-genomic era]. *Salud Pública De México*, *51 Suppl 3*, S455–462.

Hertel, K. J., Lynch, K. W., & Maniatis, T. (1997). Common themes in the function of transcription and splicing enhancers. *Current Opinion in Cell Biology*, *9*(3), 350–357.

Ho, S. L., Kapadi, A. L., Ramsden, D. B., & Williams, A. C. (1995). An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *37*(3), 403–405. doi:10.1002/ana.410370318.

Hsu, Y. P., Weyler, W., Chen, S., Sims, K. B., Rinehart, W. B., Utterback, M. C., … Breakefield, X. O. (1988). Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences. *Journal of Neurochemistry*, *51*(4), 1321–1324.

Hull, J., Campino, S., Rowlands, K., Chan, M.-S., Copley, R. R., Taylor, M. S., … Kwiatkowski, D. (2007). Identification of Common Genetic Variation That Modulates Alternative Splicing. *PLoS Genetics*, *3*(6), e99. doi:10.1371/journal.pgen.0030099.

Ito, A., Kuwahara, T., Inadome, S., & Sagara, Y. (1988). Molecular cloning of a cDNA for rat liver monoamine oxidase B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *157*(3), 970–976.

Jahng, J. W., Houpt, T. A., Wessel, T. C., Chen, K., Shih, J. C., & Joh, T. H. (1997). Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *Synapse (New York, N.Y.)*, *25*(1), 30–36. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199701)25:1<30::AID-SYN4>3.0.CO;2-G.

Jakubauskiene, E., Janaviciute, V., Peciuliene, I., Söderkvist, P., & Kanopka, A. (2012). G/A polymorphism in intronic sequence affects the processing of MAO-B gene in patients with Parkinson disease. *FEBS Letters*, *586*(20), 3698–3704. doi:10.1016/j.febslet.2012.08.028.

Johnston, J. P. (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochemical Pharmacology*, *17*(7), 1285–1297.

Kang, S. J., Scott, W. K., Li, Y.-J., Hauser, M. A., van der Walt, J. M., Fujiwara, K., … Martin, E. R. (2006). Family-based case-control study of MAOA and MAOB polymorphisms in Parkinson disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *21*(12), 2175–2180. doi:10.1002/mds.21151.

Kim, H., Lee, H., Rowan, J., Brahim, J., & Dionne, R. A. (2006). Genetic polymorphisms in monoamine neurotransmitter systems show only weak association with acute post-surgical pain in humans. *Mol Pain*, *2*(1), 24.

Kininis. (2007). A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nuclear Receptor Signaling*, *4*. doi:10.1621/nrs.06005.

Knoll, J., & Magyar, K. (1972). Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, *5*, 393–408.

Kochersperger, L. M., Parker, E. L., Siciliano, M., Darlington, G. J., & Denney, R. M. (1986). Assignment of genes for human monoamine oxidases A and B to the X chromosome. *Journal of Neuroscience Research*, *16*(4), 601–616. doi:10.1002/jnr.490160403.

Kurth, J. H., Kurth, M. C., Poduslo, S. E., & Schwankhaus, J. D. (1993). Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *33*(4), 368–372. doi:10.1002/ana.410330406.

Lan, N. C., Heinzmann, C., Gal, A., Klisak, I., Orth, U., Lai, E., … Shih, J. C. (1989). Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp 11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease. *Genomics*, *4*(4), 552–559.

Levitt, P., Pintar, J. E., & Breakefield, X. O. (1982). Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(20), 6385–6389.

Levy, E. R., Powell, J. F., Buckle, V. J., Hsu, Y. P., Breakefield, X. O., & Craig, I. W. (1989). Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xp11.23-11.4 by in situ hybridization: implications for Norrie disease. *Genomics*, *5*(2), 368–370.

Luque, J. M., Kwan, S. W., Abell, C. W., Da Prada, M., & Richards, J. G. (1995). Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, *363*(4), 665–680. doi:10.1002/cne.903630410.

Madsen, B. E., Villesen, P., & Wiuf, C. (2007). A periodic pattern of SNPs in the human genome. *Genome Research*, *17*(10), 1414–1419. doi:10.1101/gr.6223207.

Manley, J. L., & Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes & Development*, *10*(13), 1569–1579. doi:10.1101/gad.10.13.1569.

Mansego, M. L., Abellán, R., & Chaves, F. J. (2007). Tipos de mutaciones y polimorfismos. Posibles aplicaciones en terapia génica en la diabetes. *Avances En*, *461*, 425.

McCullough, A. J., & Berget, S. M. (2000). An intronic splicing enhancer binds U1 snRNPs to enhance splicing and select 5′ splice sites. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(24), 9225–9235.

Mousseau, D. D., & Greenshaw, A. J. (1989). Chronic effects of clomipramine and clorgyline on regional levels of brain amines and acid metabolites in rats. *Journal of Neural Transmission*, *75*(1), 73–79.

Näär, A. M., Lemon, B. D., & Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annual Review of Biochemistry*, *70*, 475–501. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.475.

Ogbourne, S., & Antalis, T. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J*, *331*, 1–14.

Ozelius, L., Hsu, Y. P., Bruns, G., Powell, J. F., Chen, S., Weyler, W., … Trofatter, J. A. (1988). Human monoamine oxidase gene (MAOA): chromosome position (Xp21-p11) and DNA polymorphism. *Genomics*, *3*(1), 53–58.

Parsian, A., Racette, B., Zhang, Z. H., Rundle, M., & Perlmutter, J. S. (2004). Association of variations in monoamine oxidases A and B with Parkinson's disease subgroups. *Genomics*, *83*(3), 454–460. doi:10.1016/j.ygeno.2003.09.002.

Pintar, J. E., Barbosa, J., Francke, U., Castiglione, C. M., Hawkins, M., Jr, & Breakefield, X. O. (1981). Gene for monoamine oxidase type A assigned to the human X chromosome. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *1*(2), 166–175.

Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., & Fragoso, J. M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Órgano Oficial de La Academia Nacional de Medicina de México, AC*, *149*, 220–8.

Rojas-González, M.R. (2012). APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE LA MONOAMINO OXIDASA EN GRUPOS CONTROL. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

Saura, J., Richards, J. G., & Mahy, N. (1994). Age-related changes on MAO in Bl/C57 mouse tissues: a quantitative radioautographic study. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, *41*, 89–94.

Shih, J. C., Chen, K., & Ridd, M. J. (1999). MONOAMINE OXIDASE: From Genes to Behavior. *Annual Review of Neuroscience*, *22*(1), 197–217. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.197.

Shih, J.-H. C., & Eiduson, S. (1969). Multiple Forms of Monoamine Oxidase in the Developing Brain. *Nature*, *224*(5226), 1309–1310. doi:10.1038/2241309a0.

Sims, K. B., Ozelius, L., Corey, T., Rinehart, W. B., Liberfarb, R., Haines, J., … others. (1989). Norrie disease gene is distinct from the monoamine oxidase genes. *American Journal of Human Genetics*, *45*(3), 424.

Sobell, J. L., Lind, T. J., Hebrink, D. D., Heston, L. L., & Sommer, S. S. (1997). Screening the monoamine oxidase B gene in 100 male patients with schizophrenia: a cluster of polymorphisms in African-Americans but lack of functionally significant sequence changes. *American Journal of Medical Genetics*, *74*(1), 44–49.

Son, S.-Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E., & Tsukihara, T. (2008). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-\AA resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(15), 5739–5744.

Tadić, A., Rujescu, D., Müller, M. J., Kohnen, R., Stassen, H. H., Dahmen, N., & Szegedi, A. (2007). A monoamine oxidase B gene variant and short-term antidepressant treatment response. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *31*(7), 1370–1377. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.05.015.

Walker, W. H., Kearney, E. B., Seng, R. L., & Singer, T. P. (1971). The covalently-bound flavin of hepatic monoamine oxidase. 2. Identification and properties of cysteinyl riboflavin. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *24*(2), 328–331.

Wang, Z., & Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, *14*(5), 802–813. doi:10.1261/rna.876308.

Wei, Y.-L., Li, C.-X., Li, S.-B., Liu, Y., & Hu, L. (2011). Association study of monoamine oxidase A/B genes and schizophrenia in Han Chinese. *Behav Brain Funct*, *7*(1), 42–47.

Westlund, K. N., Denney, R. M., Kochersperger, L. M., Rose, R. M., & Abell, C. W. (1985). Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science (New York, N.Y.)*, *230*(4722), 181–183.

Westlund, K. N., Denney, R. M., Rose, R. M., & Abell, C. W. (1988). Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem. *Neuroscience*, *25*(2), 439–456.

Wetterberg, I., Baurén, G., & Wieslander, L. (1996). The intranuclear site of excision of each intron in Balbiani ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *RNA (New York, N.Y.)*, *2*(7), 641–651.

Wong, W. K. (2002). Activation of Human Monoamine Oxidase B Gene Expression by a Protein Kinase C MAPK Signal Transduction Pathway Involves c-Jun and Egr-1. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(25), 22222–22230. doi:10.1074/jbc.M202844200.

Wong, W. K., Chen, K., & Shih, J. C. (2001). Regulation of human monoamine oxidase B gene by Sp1 and Sp3. *Molecular Pharmacology*, *59*(4), 852–859.

Wong, W. K., Chen, K., & Shih, J. C. (2003). Decreased Methylation and Transcription Repressor Sp3 Up-regulated Human Monoamine Oxidase (MAO) B Expression during Caco-2 Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(38), 36227–36235. doi:10.1074/jbc.M305549200.

Youdim, M. B. H., Collins, G. G. S., & Sandler, M. (1969). Multiple Forms of Rat Brain Monoamine Oxidase. *Nature*, *223*(5206), 626–628. doi:10.1038/223626a0.

Youdim, M. B. H., Edmondson, D., & Tipton, K. F. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews. Neuroscience*, *7*(4), 295–309. doi:10.1038/nrn1883.

Yue, B. G., & Akusjärvi, G. (1999). A downstream splicing enhancer is essential for in vitro pre-mRNA splicing. *FEBS Letters*, *451*(1), 10–14.

Zhu, Q. S., Chen, K., & Shih, J. C. (1994). Bidirectional promoter of human monoamine oxidase A (MAO A) controlled by transcription factor Sp1. *The Journal of Neuroscience*, *14*(12), 7393–7403.

Zhu, Q. S., Grimsby, J., Chen, K., & Shih, J. C. (1992). Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *The Journal of Neuroscience*, *12*(11), 4437–4446.