



Universidad Nacional Autónoma de México

**Instituto Nacional de Medicina
Genómica**



Proyecto para alcanzar el grado de Licenciada en Biología

Estudio piloto de la proteína de transporte de serotonina SLC64A, en plasma enriquecido en plaquetas de individuos con esquizofrenia paranoide y primer episodio psicótico, como posible biomarcador para medir la respuesta a medicamentos antipsicóticos

Presentado por Brittany Cecilia Pereo Sánchez

Tutor: Dr. José Humberto Nicolini Sánchez

**Laboratorio de Enfermedades Psiquiátricas y
Neurodegenerativas.**

Ciudad de México, Febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTUDIO PILOTO DE LA PROTEÍNA DE TRANSPORTE DE
SEROTONINA SLC64A, EN PLASMA ENRIQUECIDO EN
PLAQUETAS DE INDIVIDUOS CON ESQUIZOFRENIA
PARANOIDE Y PRIMER EPISODIO PSICOTICO, COMO
POSIBLE BIOMARCADOR PARA MEDIR LA RESPUESTA A
MEDICAMENTOS ANTIPSICOTICOS.**

Quiero dedicar este trabajo, al amor de mi vida, mi corazón, a la fuente de mis energías y mayor motivación.

Elyon

AGRADECIMIENTOS

A la valiente guerrera, quien además de dirigirme y guiarme, me enseñó que no es malo caer siempre y cuando te levantes con el doble de energías, me apoyo en mis locas odiseas y sueños, me exigió todo lo que ella sabía que era capaz de lograr aunque ni yo misma lo supiese, me acompañó durante todo el proceso y quien sobre todo, pese a que en muchas ocasiones no entendía mis razones ni decisiones, creyó en mí.

Gracias mamá, por fungir de papá, de protectora, de psicóloga, de tirana, hoy sé que te he provocado mucho dolor, pero espero también causarte muchas alegrías pues este trabajo y yo no estaríamos hoy aquí si no fuera por tu valentía, tu fuerza y tu amor.

Al Dr. José Humberto Nicolini Sánchez y la Dra. Alma Delia Genis, quienes pese a los obstáculos a los que me enfrento la suerte, destino o casualidad, creyeron en mí y me ayudaron a dirigir este proyecto.

A la Dra. Sandra Margarita Morales Mulia, por todo el conocimiento que me aportó, por su amistad, por su constante apoyo, espero que con el paso de los años algún día pueda ser igual de inteligente, amable y maravillosa como es usted.

Finalmente quiero agradecer el Instituto Nacional de Medicina Genómica y a la Universidad Nacional Autónoma de México por facilitarme el desarrollo de esta investigación.

Índice de contenidos

Resumen	1
1. Introducción	
1.1 Esquizofrenia.....	2
1.1.2 Factores de riesgo.....	2
1.1.3 Historia Natural de la enfermedad y su curso.....	3
1.2 Serotonina	5
1.2.1 Serotonina y trastornos mentales.....	5
1.3 Biomarcadores	7
1.3.1 Muestras periféricas y centrales.....	7
1.3.2 Plaquetas.....	9
1.3.3 Distribución de la 5-HT en el sistema nervioso y a nivel periférico.....	9
1.3.4 Transportador (SLC6A4)	11
1.4 Farmacología.....	14
1.4.1. Farmacodinamia.....	14
1.4.2 Clasificación de los fármacos.....	15
1.4.3 Antipsicóticos típicos y atípicos.....	15
2. Antecedentes.....	18
3. Justificación.....	18
4. Planteamiento del Problema.....	19
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	19
5. Material y Métodos	20
5.1 Extracción de plasma rico en plaquetas (PRP).....	21

5.2 Observación de PRP en la cámara de Neubauer.....	22
5.3 Conteo de plaquetas por absorbancia en espectrofotómetro.....	23
5.4 Determinación de proteína por Lowry-Peterson	24
5.5 Registro de la integridad de las proteínas por electroforesis	26
5.6 Western Blott con anticuerpo anti SLC6A4.....	28
6. Resultados	
6.1 Observación de PEP en la cámara de Neubauer.....	31
6.2 Conteo de plaquetas por absorbancia en espectrofotómetro y determinación de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson adaptado a un volumen de 300.1 microlitros en una placa de ELISA.....	32
6.3 Registro de la integridad de las proteínas por electroforesis	34
6.4 Western Blott con anticuerpo anti SLC6A4.....	35
6.5 Análisis	38
7. Discusión	
7.1 Risperidona.....	48
7.2 Aripiprazol.....	50
7.3 Haloperidol y Levomepromazina.....	51
7.4 Trifluoperazina.....	52
7.5 Zuclopentixol.....	53
7.6 Limitaciones de la investigación.....	54
7.7 Recomendaciones para futuras investigaciones.....	55

8. Conclusiones	57
9. Referencias	58
Anexo I	62
Anexo II	63
Anexo III.....	64
Anexo IV	65
Anexo V	68

RESUMEN

La esquizofrenia es un trastorno mental con prevalencia alta, cuyo tratamiento depende del tipo de paciente. Cada paciente es diferente, por lo que su tratamiento debe de ser específico. Actualmente se desconoce la totalidad de efectos y rutas alteradas por los agentes activos de cada fármaco. Los biomarcadores periféricos son un posible medio para estudiarlos, ya que representan características del organismo que pueden evaluarse objetivamente.

Uno de los blancos de los antipsicóticos es la serotonina que se encuentra presente en el Sistema Nervioso Central, en el torrente sanguíneo y en el tracto intestinal. En el torrente sanguíneo se encuentra en un 90% embebida en plaquetas, que son fragmentos irregulares anucleados constituidos en un 60% por proteína y que comparten una amplia variedad de características con las neuronas serotoninérgicas, además del transportador SLC6A4.

La diferencia más notable entre neuronas serotoninérgicas y las plaquetas es la capacidad de biosintetizar serotonina a partir de su precursor triptófano, gracias a la enzima triptófano hidroxilasa.

Sin embargo, el estudio de las neuronas es complejo debido a la dificultad de llegar a las estructuras cerebrales que las poseen, y hacer con ellas un modelo de cultivo 3D que imite su entorno físico.

El presente trabajo propone un protocolo experimental que puede servir para estudiar el posible efecto secundario de algunos medicamentos antipsicóticos, enfocados en el transportador SLC6A4 presente en plaquetas en virtud de ser un posible modelo para comprender lo que puede estar sucediendo en las neuronas serotoninérgicas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno psicótico grave, considerado como una enfermedad crónica degenerativa, caracterizada por distorsión en el pensamiento, las percepciones, las emociones, el lenguaje, la conciencia de sí mismo y la conducta⁵, para una descripción más detallada se puede consultar el Anexo I.

1.1.1 Factores de riesgo

Alteraciones del neurodesarrollo, la neurotransmisión y transducción de señales, de los neuropéptidos y la disfunción autoinmune⁶.

Factores ambientales: Las complicaciones obstétricas durante el nacimiento del individuo (TO; traumatismo obstétrico) aumenta de 4 a 6 veces la probabilidad⁷ infecciones o lesiones prenatales, así como el consumo de sustancias por parte de la madre durante el embarazo. Ciertas infecciones virales, pueden duplicar el riesgo general, como la exposición prenatal a virus como la influenza y el citomegalovirus⁷.

Factores genéticos: La genética de la esquizofrenia es compleja. Es un trastorno familiar con expresividad muy variable. Los estudios epidemiológicos realizados a gemelos, familiares y en sujetos dados en adopción, muestran la desigual y variación existente en el riesgo poblacional para el desarrollo de esquizofrenia y han permitido estimar su heredabilidad en alrededor del 81 %, por lo que sin duda su origen puede ser atribuido fundamentalmente a factores genéticos.^{2,3} En la actualidad los resultados de la aplicación de métodos de estudio del genoma completo sugieren, que los principales modelos en la arquitectura alélica de la esquizofrenia es la variación genética rara y la

variación genética común. Estos resultados vienen a confirmar que la esquizofrenia es un trastorno multifactorial complejo con múltiples genes influyendo en su aparición.

1.1.2 Historia Natural de la enfermedad y su curso

El inicio de la esquizofrenia se produce de manera característica durante la adolescencia o al inicio de la edad adulta. La mayor parte de los pacientes alternan los episodios psicóticos agudos con fases estables de remisión total o parcial. Son frecuentes los síntomas residuales entre los episodios. Esta enfermedad que habitualmente es de tipo crónico puede caracterizarse por tres fases (fase aguda, fase de estabilización y fase estable) que se fusionan unas con otras sin que existan límites claros y absolutos entre ellas⁸.

Primer episodio psicótico. La aparición del primer episodio puede ser brusca o insidiosa, sin embargo, la mayoría de los individuos presentan algún tipo de fase prodrómica manifestada como el desarrollo lento y gradual de diversos signos y síntomas (retraimiento social, pérdida de intereses en la escuela o el trabajo, deterioro de la higiene y cuidado personal, enfado e irritabilidad) tras los cuales pueden aparecer los síntomas positivos característico de la fase activa que define el trastorno como esquizofrenia.

Fase aguda o activa. Durante esta fase los pacientes presentan síntomas positivos, es decir síntomas psicóticos graves, como delirios y/o alucinaciones, y un pensamiento gravemente desorganizado; y generalmente, no son capaces de cuidar de sí mismos de forma apropiada. Con frecuencia, los síntomas negativos pasan a ser más intensos⁸.

Fase de estabilización. se reduce la intensidad de los síntomas psicóticos agudos. La duración de la fase puede ser de 6 meses o más después del inicio de un episodio agudo⁸.

Fase estable. Los pacientes pueden estar asintomáticos; otros pueden presentar síntomas no psicóticos, como tensión, ansiedad, depresión o insomnio⁸.

Antes de que un paciente que se encuentra en la fase estable, habitualmente se produce un periodo prodrómico en el que puede haber síntomas disfóricos no psicóticos, como formas atenuadas de síntomas positivos o conductas idiosincrásicas²⁰. En la figura 1 el resumen en forma esquemática de lo anteriormente mencionado referente a las fases de la Esquizofrenia.

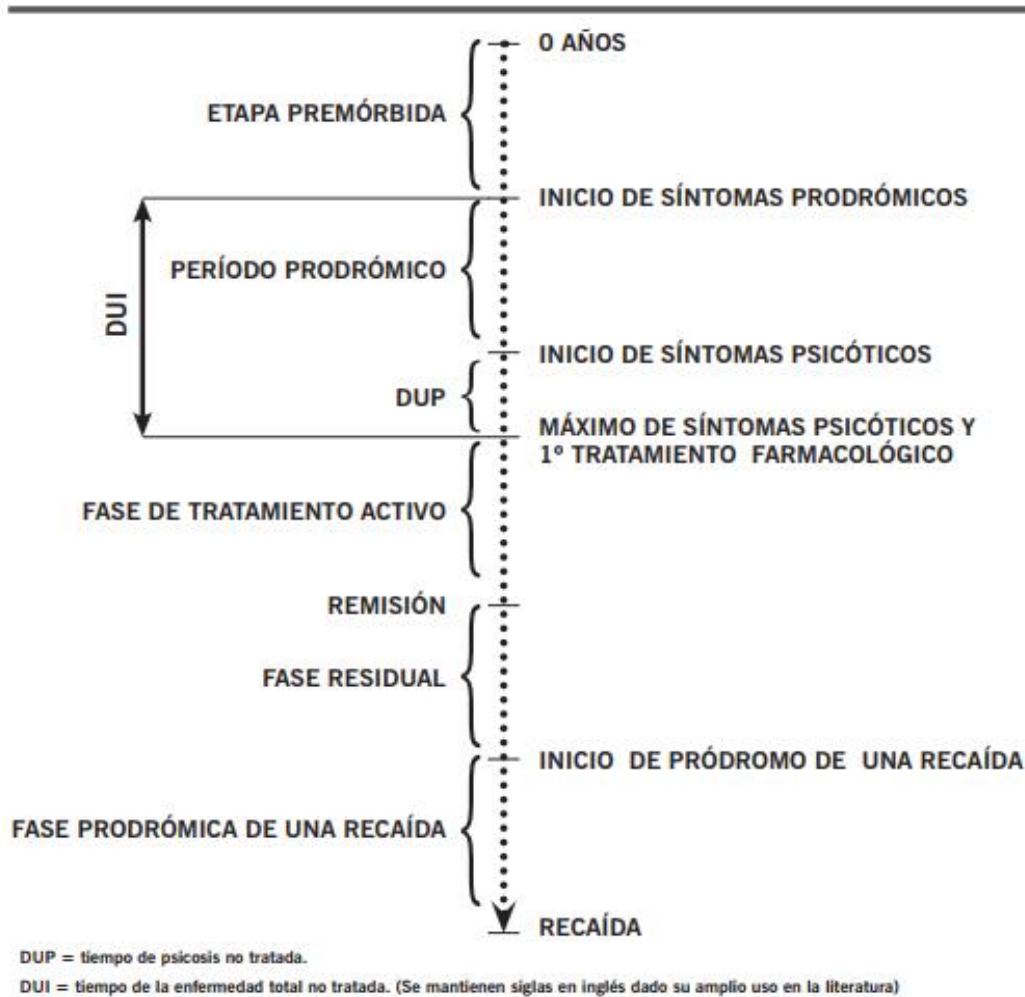


Figura 1. Esquema de la historia natural de la Esquizofrenia El primer episodio psicótico comienza desde el inicio de los síntomas prodrómicos (PEP prodrómicos) y se mantiene durante el DUP o DUI, que es el tiempo de psicosis no tratada⁸.

Se ha relacionado a ciertos neurotransmisores con síntomas exacerbados en diferentes fases de esta enfermedad; por ejemplo a la dopamina con la sintomatología positiva característica del PEP, y a la serotonina con los síntomas negativos característicos de la fase prodrómica³.

1.2 Serotonina

La monoamina 5- hidroxitriptamina (5-HT), también conocida como serotonina es un neurotransmisor indoleamina derivada del aminoácido triptófano, que esta implicada en: la regulación del apetito; impulsividad; agresión; ansiedad; sueño; actividad sexual; apetito; ritmos circadianos; funciones neuroendócrinas; temperatura corporal; dolor; actividad motora y funciones cognitivas¹.

Es sintetizada en el cerebro medio, en los núcleos de Raphe, en las enterocromafines intestinales y neuronas serotoninérgicas del plexo mientérico. Estas neuronas proyectan muchas zonas del cerebro como la corteza, el hipotálamo y el sistema límbico.

El número de diversos tipos de receptores de serotonina en el cerebro es superior a 15, pero solo poseen un tipo de transportador codificado por el gen *SLC6A4*. En el cuerpo hay serotonina en el tracto gastrointestinal, las plaquetas y la médula espinal¹.

1.2. Serotonina y trastornos mentales

El primer acercamiento de los investigadores a la 5-HT desde un punto de vista psiquiátrico se derivó de la observación de la ingesta del ácido lisérgico comúnmente llamado LSD en diferentes personas, ya que esta sustancia causa profundos efectos sobre el estado de ánimo y la conducta, además de inducir a estados alucinatorios². Actualmente se sabe que el LSD es un agonista serotoninérgicos que pueden conducir a síntomas psicóticos en individuos sanos³.

El papel de la 5-HT en psiquiatría se ha evidenciado de tres formas:²

- a) Las evidencias que apoyan la teoría de que los sistemas serotoninérgicos se encuentran alterados en pacientes con depresión.
- b) Los progresos en la clonación de subtipos de receptores de 5-HT y la síntesis de agonistas y antagonistas selectivos para dichos subtipos.
- c) La síntesis y el desarrollo de compuestos altamente selectivos para inhibir la recaptura de 5-HT, en todos los tipos celulares que poseen al transportador de captura de la 5-HT.

Incluso existe una hipótesis que implica a la 5-HT en la esquizofrenia, dicha hipótesis señala su papel trófico en el neurodesarrollo, su interacción con el sistema dopaminérgico y los efectos de la serotonina en la corteza prefrontal a través de sus receptores 5HT_{2A}. La hipótesis serotoninérgica sugiere un aumento del tono serotoninérgico central en los pacientes con Esquizofrenia. Además de que diversos autores sostienen que la sintomatología negativa de la Esquizofrenia reflejaría en parte, una hipofunción dopaminérgica en la corteza prefrontal, debida al efecto inhibitorio que tendría la serotonina a ese nivel. Es por ello, que los fármacos inhibidores de la función serotoninérgica desinhiben la transmisión dopaminérgica en el córtex prefrontal, mejorando la clínica negativa⁴.

Pese a que la hipótesis serotoninérgica ha sido ampliamente criticada, muchos de los tratamientos actuales para tratar los síntomas negativos y reducir los efectos secundarios extrapiramidales se basan en antipsicóticos atípicos que son potentes antagonistas de los receptores de serotonina³.

1.3 Biomarcadores

Se pueden encontrar en diferentes tipos celulares, moléculas o metabolitos que representan características de un organismo. Dichas características pueden medirse y evaluarse de forma objetiva, obteniendo información sobre procesos biológicos normales, procesos patológicos o para medir las respuestas a un tratamiento⁹.

1.3.1 Muestras periféricas y centrales.

Los trastornos psiquiátricos son enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) y, por lo tanto, los estudios con células cerebrales vivas derivadas de pacientes son ideales para obtener información . Sin embargo, las biopsias cerebrales de pacientes psiquiátricos vivos son raras, y mantener vivo el tejido resulta complicado, las neuronas maduras no se dividen fácilmente. Tejidos de cerebros postmortem también son empleados pero, dichas muestras, están sujetas a problemáticas como; la medicación, la causa de la muerte y el intervalo postmortem ya que los procesos de destrucción celular post mórtem desencadenan daños estructurales a nivel celular⁶. Por lo tanto, es complicado determinar si los cambios observados son primarios a la enfermedad o son efectos secundarios. Las nuevas técnicas, que involucran células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), son herramientas poderosas, y la diferenciación de iPSCs en diferentes clases de células cerebrales pueden brindar la oportunidad de estudiar neuronas de pacientes y perfiles de respuesta terapéutica *in vitro*. No obstante, establecer las células lleva varias semanas, existe inestabilidad y diversidad genética, incluso entre diferentes clones de un individuo, además de que implementar esta estrategia tiene un alto costo. Es más factible obtener muestras periféricas que puedan actuar como Biomarcadores potenciales de progresión de la enfermedad y respuesta terapéutica en diferentes momentos.

Debido a que ciertos trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia, tienen componentes genéticos, las alteraciones del sistema nervioso central pudieran verse reflejadas en los tejidos periféricos. De hecho, los análisis de microarreglos han encontrado numerosas clases de genes que se expresan tanto en células sanguíneas como en corteza prefrontal, incluida aproximadamente la mitad de los llamados genes de susceptibilidad a esquizofrenia. Curiosamente, se ha demostrado que aproximadamente el 50% de las variantes genéticas afectan de manera similar la abundancia de transcritos en tejidos múltiples, incluida la sangre y el cerebro ¹⁰.

El 22% del transcriptoma total se expresa tanto en el cerebelo como en células mononucleares de sangre periférica con alta correlación, lo que implica que la expresión génica en células periféricas puede servir como biomarcadores para las enfermedades del SNC. Un análisis de loci¹⁰ de rasgos cuantitativos de expresión reciente también ha revelado que muchos polimorfismos de nucleótido único (SNP) que actúan en cis se comparten entre la sangre y el tejido cerebral ¹⁰.

A pesar de las ventajas de estas muestras se han obtenido resultados desalentadores que sugieren similitudes limitadas entre diferentes tipos de tejidos, y es crucial determinar qué vías de señalización y procesos biológicos se conservan, entre el SNC y muestras periféricas. Las muestras periféricas se deben usar como sustitutos solo cuando se observan vías de señalización comunes o procesos biológicos en los dos tipos de muestras¹⁰.

1.3.2 Plaquetas

Son fragmentos celulares anucleados que miden de 1-2 micrómetros. Su masa seca, es un 60% proteína y un 15% lípidos, se aíslan fácilmente ¹⁰. Se generan a partir de un proceso llamado trombopoyesis, dentro de la médula ósea, tras la fragmentación de megacariocitos, una vez formadas dichos fragmentos tienen de siete a diez días de actividad dentro del torrente sanguíneo. Entre las funciones de las plaquetas se encuentra la coagulación; ayudan a este proceso formando nudos en la red de fibrina; liberando sustancias constrictoras ¹⁰. Expresan una amplia gama de receptores y transportadores de neurotransmisores. Por lo tanto, no es sorprendente que las plaquetas se hayan utilizado ampliamente para examinar las propiedades funcionales de los receptores y las actividades de transportadores.

1.3.3 Distribución de la 5-HT en el sistema nervioso y a nivel periférico (plaquetas)

La serotonina en específico dentro de las plaquetas, se encuentra en forma de reserva de lento recambio que puede ser liberada de las plaquetas por exocitosis, y participa en la activación de las plaquetas, lo que facilita su agregación en el proceso de coagulación ². La captura de 5-HT por las plaquetas ocurre de dos maneras: por difusión pasiva y por un mecanismo activo. El mecanismo activo está mediado por una proteína similar al transportador de 5-HT neuronal, que requiere de energía y de la presencia de Na⁺ y Cl⁻. Posteriormente libera la serotonina almacenada en ellas, en presencia de una herida, y como consecuencia se produce una vasoconstricción, reduciendo el flujo de sangre y contribuyendo a la formación de coágulos.

Este sistema plaquetario de captura tiene un grado de afinidad similar al del sistema neuronal. Hay evidencia experimental de que la proteína transportadora de serotonina

del cerebro y las plaquetas está codificada por el mismo gen, y dicha proteína presenta características funcionales y farmacológicas similares ².

Las funciones que desempeña la serotonina dentro del SNC y en las plaquetas, no tiene punto de comparación, ya que su función es completamente divergente. Sin embargo, en cuanto a los mecanismos de captura se puede observar una sorprendente homología en

	<i>Neuronas</i>	<i>Plaquetas</i>
Transporte activo para serotonina	+	+
Receptores 5-HT _{2A}	+	+
Sitios de unión a [^{3H}]	+	+
Almacenamiento subcelular de 5-HT en vesículas	+	+
MAO tipo B	+	+
Biosíntesis de 5-HT	+	-
Transportador de 5-HT en la membrana plasmática	+	+
Transportador de 5-HT en la membrana vesicular	+	+
Enolasa neurona específica	+	+
Unión de serotonina a proteínas	+	-
Vesículas secretorias de serotonina	+	-

ambos tipos celulares, esta y otras características que comparten se pueden apreciar en la figura 2.

Figura 2. Cuadro comparativo entre neuronas serotoninérgicas y plaquetas².

1.3.4 Transportador de serotonina (SLC6A4) en la membrana plasmática de las plaquetas y de las terminales axónicas serotoninérgicas

El gen SLC6A4 codifica para la proteína que es diana terapéutica de algunos fármacos. Este gen codifica una proteína integral de membrana SLC6A4 y su función es transportar el neurotransmisor serotonina actuando después de la liberación vesicular del neurotransmisor, la proteína codificada finaliza la acción de la serotonina y la recicla, desempeñando un papel clave en la mediación de la regulación de su disponibilidad²¹.

El gen está ubicado en el cromosoma 17 en la posición 17q11.1-17q12 y abarca 31 kb. Se compone de 14 exones y pertenece a una gran familia de genes de transportadores de neurotransmisores, que tienen una actividad dependiente de sodio y cloro. El transportador contiene 12 dominios transmembrana²¹.

La transcripción de este gen es modulada por dos polimorfismos primarios en su región reguladora 5' (promotor). Uno de los polimorfismos es 5HTTLPR que se encuentra ubicado en la región promotora del gen 1kb corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción. El polimorfismo consiste en una inserción/delección de 44 pares de bases (pb) con dos variantes alélicas; la variante larga (L) consta de una inserción de 44 pb en el extremo 5' de la región promotora del gen, lo que resulta en un alelo de 528 pb rico en guaninas y citosinas, esta variante se compone de 16 elementos de repetición de 20-23 pb de largo. La variante corta (s) consta de una delección de 44 pb en el extremo 5' de la misma región, este alelo tiene 484 pb y 14 elementos de repetición²¹.

El alelo largo (L) confiere un aumento de 3 veces en la eficacia y la actividad transcripcional mientras que el alelo corto (s) está asociado con una menor eficacia de la

transcripción. La expresión del alelo corto (s) al producir una menor actividad transcripcional y por lo tanto menor actividad transportadora de la serotonina, se ha asociado a desordenes de ansiedad, depresión, conducta suicida y esquizofrenia²¹.

En la figura 3 se puede apreciar como las neuronas sintetizan la enzima Triptofano hidrolasa que ayudara a la síntesis de serotonina. En la terminal sináptica, el triptófano libre es convertido en serotonina y ésta es almacenada en las vesículas. La 5-HT que no es almacenada en vesículas es degradada por la MAO mitocondrial a 5-HIAA.

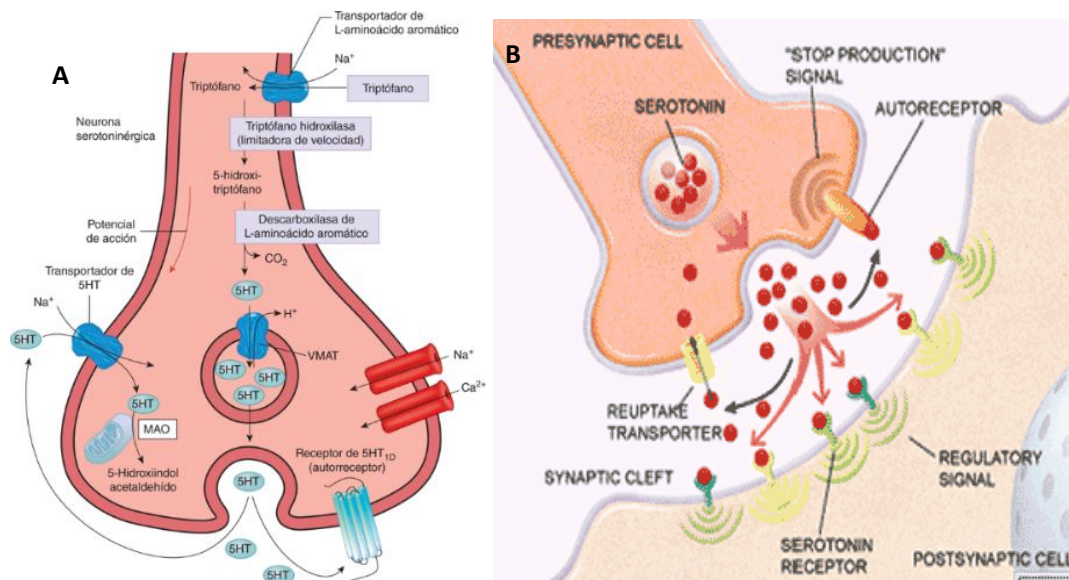


Figura 3. Sinapsis y la neurona serotonérgica. A) en la figura A se puede apreciar la constitución de una neurona presináptica y en la figura B) se puede apreciar la sinapsis entre las neuronas presináptica y post sináptica.

Los transportadores serotonérgicos realizan la captura de 5-HT desde la hendidura sináptica. Los autorreceptores presinápticos 5-HT_{1A} disminuyen la liberación de 5-HT de las terminales sinápticas por la reducción de la frecuencia de impulso de 5-HT después de la hiperpolarización de la membrana, debido a la estimulación de los canales de K⁺ por la proteína Gi.² En tanto el sistema serotonérgico en plaquetas se puede apreciar en la figura número cuatro que se muestra a continuación.

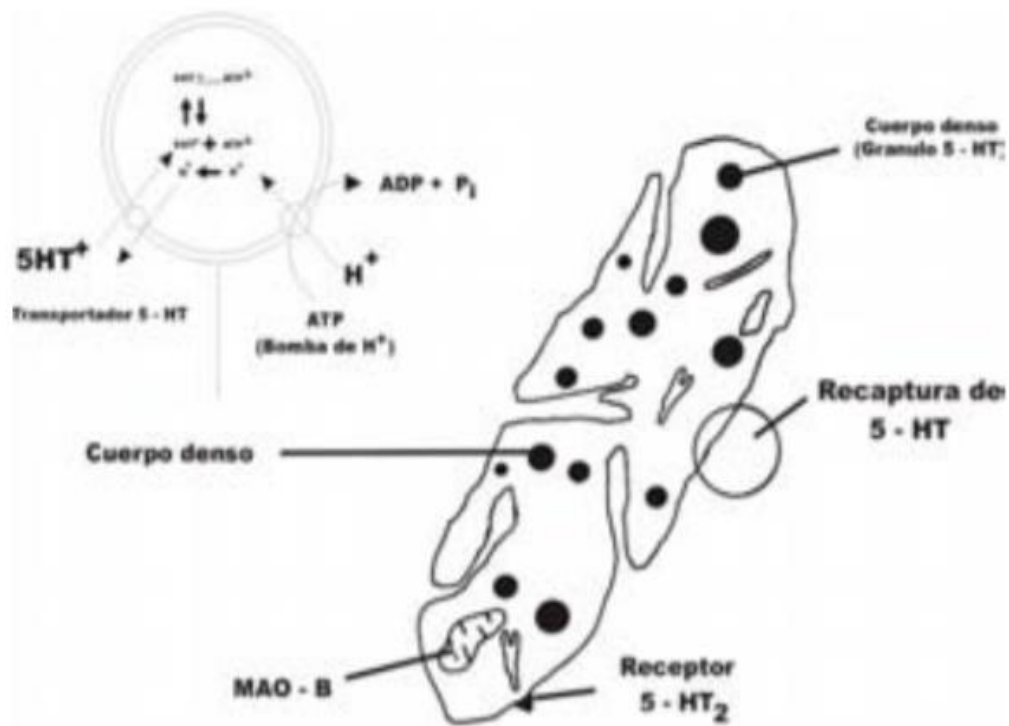


Figura 4. Sistema serotoninérgico en plaquetas sanguíneas. Las plaquetas, en comparación con las neuronas serotoninérgicas, sólo tienen función de almacenamiento de 5-HT, dado que no poseen triptófano hidroxilasa, y por ello no sintetizan serotonina. El receptor 5-HT_{2A} tiene similitudes biológicas con el receptor postsináptico 5-HT_{2A} ².

1.4 Farmacología

Se considera de manera general, como el estudio de los efectos activos presentes en cada fármaco, cuando dicho fármaco es empleado para el diagnóstico, prevención y tratamiento de alguna patología. Un fármaco es cualquier sustancia química que al entrar en contacto con el organismo desencadena una reacción biológica medible, puede ser de origen natural, sintético, semisintético o biotecnológico ¹¹.

Algo importante de resaltar es que todos los fármacos tras el proceso de absorción y aplicación en el torrente sanguíneo se distribuyen en el plasma y en el líquido intracelular, y su posterior cinética dependerá tanto de las propiedades químicas del fármaco, así como de las características intrínsecas del organismo. Generalmente los fármacos viajan a través del plasma de manera libre, por medio de la fijación a proteínas plasmáticas (como la albúmina) o incorporados en células (principalmente eritrocitos)¹¹.

La mayoría de los fármacos pasan por torrente sanguíneo, por lo que las moléculas de cualquier fármaco llegarán primero a aquellos órganos que tengan mayor irrigación sanguínea y dependiendo de la naturaleza del compuesto activo puede que el medicamento desencadene una reacción no esperada conocida como efecto secundario.

1.4.1 Farmacodinamia

Rama de la farmacología encargada de estudiar las acciones y los efectos de los fármacos sobre los distintos aparatos, órganos, sistemas y su mecanismo de acción bioquímico o molecular ¹¹. Cuando un fármaco es administrado, absorbido y distribuido por la circulación, se espera que tenga un efecto específico, esto se da porque cada principio activo es específico para un receptor celular, es decir que solo se unirá y

afectara a las células que posean los receptores (proteínas) necesarios para reconocerlos, a dichas células se les llama “diana”.

1.4.2 Clasificación de los fármacos

Agonistas	Antagonistas
Es aquella sustancia que tiene la capacidad de acoplarse a un receptor y cuya estructura tridimensional activa la función de este y las vías de señalización químicas intracelulares ¹¹ .	Es aquella sustancia que tiene afinidad por receptores específicos, pero carece de actividad; es decir, su estructura molecular concuerda con el receptor pero no produce respuesta bioquímica intrínseca. Estos fármacos se pueden acoplar a receptores activados o inactivados sin cambiar su estado, pero al unirse fuertemente a él evitan la unión de las sustancias activadoras una vez que la estructura proteica vuelva a su estado de inactivación y evita de nuevo su activación. Se les conoce como antagonistas competitivos ya que por sus propiedades estructurales evitan la unión de los agonistas con el receptor a favor del que se presente en mayor concentración ¹¹ .

1.4.3 Antipsicóticos

Son un grupo de fármacos empleados en procesos o patologías psiquiátricas, tales como la esquizofrenia, los trastornos neurocognitivos o el trastorno bipolar, dentro de estos grupos hay numerosas moléculas, con estructuras químicas muy heterogéneas, pero con la característica en común de tener actividad anti dopaminérgica; sin embargo, este no es su único mecanismo de acción¹¹.

Clasificación de antipsicóticos:

Típicos: Son los más antiguos, con acción fundamentalmente anti dopaminérgica y caracterizados por su eficacia en el control de síntomas psicóticos positivos y poco eficaces sobre los negativos. La respuesta de cada paciente puede variar dependiendo del fármaco empleado. La variabilidad individual, con este tipo de fármaco, no se plasma en diferencias muy marcadas en cuanto a la reacción que se busca causar, sin

embargo, presenta una amplia gama de variabilidad entre los individuos en sus efectos secundarios¹⁰. Entre los fármacos que son parte de esta clasificación se encuentran los siguientes; fenotiazinas (clorpromazina, flufenazina, levomepromazina, perfenazina, pipotiazina, tioproperazina y la trifluoperazina), butirofenonas (haloperidol), tioxantenos (zuclopentixol) y las ortopramidas (amisulprida, sulpirida y la tiaprida).

Atípicos: Se caracterizan por bloquear simultáneamente los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos (resultando eficiente en pacientes resistentes a los antipsicóticos típicos) y eficaces tanto en los síntomas positivos como en los negativos. La clozapina es el fármaco que dio origen a este grupo de nuevos antipsicóticos. En la actualidad, este grupo lo forman 7 fármacos: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, sertindol y aripiprazol¹¹.

Ambos tipos de antipsicóticos comparten un mecanismo de acción común, los antipsicóticos bloquean a nivel central los receptores dopaminérgicos D2. En concentraciones terapéuticas, pero también bloquean a los receptores de serotonina 5-HT2 con diferente sensibilidad, algunos otros subtipos de receptores noradrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos. Por tanto, además de la acción antipsicótica, poseen otras acciones farmacológicas¹¹.

Antipsicóticos de interés para este estudio

Nombre	Tipo	Mecanismo de Acción	Dosis sugerida	Efectos secundarios
Aririprazol	Atípico	Agonismo del receptor D2 que modula la actividad dopaminérgica en las áreas mesolímbica y mesocortical. Agonista parcial del receptor 5-HT1A y 5-HT2A. Moderada afinidad por los receptores alfa-adrenérgicos de las histaminas.	30 mg/día	Mareos, somnolencia, náuseas, vómitos, cansancio, salivación excesiva, visión borrosa, aumento de peso, estreñimiento, cefalea y dificultades para dormir, también puede producir hipotensión ortostática, lo que se traduce en una baja del conteo plaquetario normal.
Haloperidol	Típico	Antagonista de los receptores postsinápticos de la dopamina en el cerebro,.	100 mg/día	Requedad de mucosas, estreñimiento, retención urinaria hipotensión ortostática, síntomas extrapiramidales, discinesia tardía.
Levomepromazina	Típico	Antagonista de los receptores dopaminérgicos del sistema límbico,	12.5-25 mg/día	Resequedad de mucosas, somnolencia, hipotensión arterial, retención urinaria, parkinsonismo, acatisia, disquinesia, fotosensibilidad, ictericia colestática, discrasias sanguíneas, hiperprolactinemia hipotensión arterial, depresión de la médula ósea, coma, enfermedad de Parkinson.
Risperodona	Atípico	Antagonista de receptores 5-HT2 de serotonina y D2 de dopamina. Inhiben las acciones de los agonistas de la dopamina	2,4 ó 6 mg/día	Distonía aguda, síndrome extrapiramidal y acatisia dentro de los primeros dos meses del tratamiento, aumento de peso, sedación, hipotensión postural, erupciones cutáneas y discrasias sanguíneas y depresión de la médula ósea.
Trifluoperazina	Típico	Antagonista de los receptores dopaminérgicos.	5-40 mg/día	Estreñimiento, resequedad de mucosas, hipotensión arterial, síncope, síntomas extrapiramidales, acatisia, disquinesia, ginecomastia, fotosensibilidad, ictericia colestática, discrasias sanguíneas. Entre sus efectos secundarios se encuentra la hipersensibilidad al fármaco, depresión de la médula ósea, insuficiencia hepática, insuficiencia renal, coma, epilepsia no tratada y síndrome convulsivo ¹² .
Zuclopentixol	Típico	Antagonista de los dos tipos de receptores dopaminérgicos, D1 y D2.	200-400 mg	Síndrome extrapiramidal, hipotensión ortostática, sequedad de boca, estreñimiento, retención urinaria, disfunción eréctil, anorgasmia femenina, amenorrea, galactorrea, ginecomastia y aumento de peso, depresión de médula ósea, feocromocitoma, porfiria, glaucoma, insuficiencia hepática, insuficiencia renal ¹² .

2. ANTECEDENTES

Estudios remotos ya habian mostrado relación entre plaquetas y neuronas serotoninérgicas. El investigador Pletscher, en un estudio sobre reserpina, descubrió que provoca depleción de la 5-HT dentro del cerebro de conejos, y Paasonen encontró que causaba disminución de la concentración plaquetaria, mostrando que el mecanismo de acción de los fármacos antagonistas de serotonina capaces de producir alteraciones en las neuronas serotoninérgicas, también las producen en las plaquetas².

A recientes fechas, estudios como el de Kazuya Iwamoto en el 2014 defienden que los niveles de expresión son similares entre neuronas catecolaminérgicas y plaquetas¹⁰.

3. JUSTIFICACIÓN

Por muchos años, el estudio de enfermedades y biomarcadores periféricos fue dejado de lado o pasado a segundo término, siendo que estos son de fácil obtención, por métodos poco invasivos y expresan una amplia gama de proteínas receptoras y transportadoras presentes a nivel del SNC. Ejemplo de ello es la proteína transportadora de serotonina expresada tanto en el cerebro como en las plaquetas, codificada por el mismo gen (*SLC6A4*), y teniendo ambos las mismas características funcionales y farmacológicas².

Además tomando en referencia el estudio de Kazuya Iwamoto que demuestra que los niveles de expresión de receptores de serotonina y dopamina en el SNC sufren cambios paralelos en presencia de neurolépticos, es factible considerar que el transportador de membrana de serotonina (presente en plaquetas) también sufrirá cambios paralelos a los que sufre el transportador de membrana de neuronas serotoninérgicas en presencia de los agentes activos de medicamentos antipsicóticos.

Por lo que es viable proponer a las plaquetas como modelo de detección en modificaciones proteicas del sistema serotoninérgicos neuronal, para conocer los efectos secundarios de los medicamentos mencionados previamente sobre el transportador *SLC6A4*.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el presente proyecto se buscó estandarizar un protocolo que ayuda a identificar de manera cualitativa los posibles efectos secundarios de los agentes activos de los medicamentos antipsicóticos, sobre el transportador *SLC6A4* presente en muestras de plasmas enriquecidos en plaquetas en un grupo de pacientes con esquizofrenia paranoide y un grupo de pacientes durante su primer episodio psicótico.

OBJETIVOS

Estandarizar un protocolo para cuantificar la concentración de plaquetas y la proteína total presentes en plasma enriquecido de plaquetas, de los tres grupos.

Observar de manera cualitativa el contenido y la integridad de la proteína de membrana *SLC6A4* presente en las plaquetas de los tres grupos.

Realizar una comparación de los resultados obtenidos de los dos objetivos anteriores con la información de los datos epidemiológicos, clínicos y farmacológicos de cada paciente.

HIPÓTESIS

Existen diferencias en el bandeo de transportador de serotonina, entre los grupos de pacientes diagnosticados con esquizofrenia tipo paranoide en comparación con los pacientes de Primer Episodio Psicótico e individuos del grupo control, según el tratamiento farmacológico.

5. MATERIAL Y METODOS

Población de Estudio

Pacientes con esquizofrenia

Se trabajó con diez pacientes diagnosticados con esquizofrenia paranoide según los lineamientos del DSM-IV, con historia clínica completa, obtenidos del estado de Tabasco, de agosto a octubre del 2012.

Pacientes con Primer Episodio Psicótico

Se trabajó con cuatro pacientes con PEP₁ obtenidos del Hospital Psiquiátrico San Fray Bernardino y del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, durante septiembre del 2012 al mes de octubre del 2013.

Grupo de individuos controles.

Se trabajó con diez individuos controles, con historial clínico completo y que se encontraban en buen estado de salud mental. Obtenidos del estado de Tabasco, desde el año 2010 al año 2012 y del estado de Puebla desde el año 2015 al año 2016.

El desarrollo de este proyecto se realizó con muestras de plasma libre de eritrocitos enlistados bajo un código y con la base de datos correspondiente al historial clínico de los pacientes e individuos controles, quienes fueron informados del posible desarrollo de proyectos de investigación basados en sus muestras biológicas.

5.1 Extracción de Plasma rico en Plaquetas.

El plasma sanguíneo cuenta con una amplia variedad de tipos celulares, factores y componentes biológicos (lípidos, proteínas, etc.). Todos estos componentes pueden ser separados en fracciones mediante centrifugación, dicho método tiene su fundamento teórico en la Ley de Stokes que “establece los movimientos que un sólido tienen dentro de un líquido cuando existe un gradiente de densidad, dicho movimiento puede ser causado por la fuerza gravitacional o por una fuerza centrífuga¹³”.

Para obtener el plasma enriquecido en plaquetas se requiere un volumen inicial mínimo de 1 mL de los plasmas previamente mencionados, los cuales fueron puestos en centrifugación a 14,600 gravedades / 10 minutos / 4°.

Las pastillas obtenidas fueron re-suspendidas en 1 mL de buffer amortiguador de citratos (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 145 mM, Glucosa 11 mM, Ácido cítrico 7 mM, Citrato de Sodio 8 mM), con el fin de mantener estables a las plaquetas el mayor tiempo posible, la receta de dicho buffer se puede encontrar en la sección Anexo II. Se debe de repetir una vez más el proceso de centrifugación bajo los mismos parámetros descartando el sobrenadante y re-suspendiendo en 1 mL de buffer de citratos en cada repetición. Esto con la finalidad de limpiar el plasma rico en plaquetas (PRP) de cualquier contaminante (células o metabolitos ajenos).

Este proceso se aplicó en cada una de las 24 muestras y una vez extraído y limpio el PRP se hicieron alícuotas en tubos de centrifuga de 1 ml (eppendorf) y se guardaron a -20 °C, hasta el siguiente procedimiento.

5.2 Observación de plasma rico en plaquetas en cámara de Neubauer en microscopio óptico.

La cámara de Neubauer es un instrumento con forma de portaobjeto que es empleado en biología e investigaciones médicas para realizar un conteo de células, esporas o fragmentos celulares como son las plaquetas^{14,15}.

Esta cámara está adaptada para su uso en microscopio óptico de campo claro o de contraste de fases, sobre su superficie se encuentra tallada con punta de diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas, por lo que con la ayuda de un contador se puede calcular el número de células presentes en un volumen determinado de líquido y con ello calcular la concentración celular en la muestra^{14,15}.

El volumen recomendado a emplear son 10 microlitros de muestra sobre la cámara de Neubauer y el conteo se puede realizar con la ayuda de un contador estándar (aparato con el cual al oprimir un botón aumenta un número en la cifra de este).

Debido a la alta concentración de plaquetas por microlitro esta técnica resulta poco fiable para un conteo exacto, por lo que se recomienda verificar la cantidad de plaquetas por métodos más exactos como la absorbancia de luz a 800 nm en un espectrofotómetro. Esta técnica resulta útil para corroborar de manera visual que no exista contaminación de otras células o basura celular en las muestras.

5.3 Conteo de plaquetas por absorbancia en espectrofotómetro.

Como se mencionó en la metodología pasada, la concentración de plaquetas resulto muy alta para un conteo visual, por lo cual, aprovechando las características colorimétricas de las plaquetas, que desprenden una tonalidad verde fosforescente tenue en condiciones estándares, que absorben luz a una longitud de onda de 800 nanómetros (nm) se puede emplear el espectrofotómetro para cuantificar las plaquetas por muestra.

Para realizar dicho protocolo se deben emplear 1 ml de plasma rico en plaqueta medir a una absorbancia a 800 nm. Una vez obtenida dicha absorbancia se aplica la siguiente formula $N(108/ML) = (6.23/2.016 - Abs\ 800nm) \cdot 3.09$, para cada una de las 24 muestras.

5.4 Determinación de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson adaptado a un volumen de 300.1 microlitros en placas de ELISA.

Las proteínas son biomoléculas conformadas por complejas estructuras de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, dichos enlaces peptídicos pueden reaccionar con iones de cobre si se encuentran dentro de un medio alcalino, produciéndose una oxidación en los residuos aromáticos de las proteínas, dando como resultado una tonalidad violácea tenue, que con la ayuda del reactivo Folin-Ciocalteu genera una reacción colorimétrica exponencial, dicha reacción colorimétrica puede ser cuantificada con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Sin embargo, para conocer la concentración final de proteínas dentro de un medio acuoso no basta con aplicar esta reacción a dicha muestra, se requiere de la fórmula de pendiente de una curva estándar lineal semi-exponencial de una mezcla de proteínas estandarizadas, es decir, que se conozca la concentración de proteína por microlitro de muestra. La proteína más comúnmente empleada es la de Suero Fetal Bovino (BSA). Para realizar una curva estándar de BSA se requiere conocer la concentración de la muestra de BSA a emplear y dependiendo de la concentración de esta será la cantidad de muestra que se tome como alícuota para cada punto de la curva. Lo más recomendable es emplear un mínimo de cuatro a un máximo de diez puntos en la curva.

Para realizar el conteo se emplearon placas con 96 pozos, con duplicado de la curva de BSA y muestras. En la figura 5 se puede apreciar los reactivos empleados para realizar la curva estándar de cada placa.

Los mismos reactivos que fueron empleados para la curva estándar fueron empleados en cada muestra, el único reactivo que varió fue el agua, ya que el volumen fue

modificándose para no pasar de trescientos microlitros de solución final. Para las muestras de esquizofrenia se emplearon 5 microlitros de cada muestra, para las muestras PEP se emplearon 3.3 microlitros y para todos los controles se utilizaron hasta 10 microlitros.

N° pozo	BSA		H2O	NaOH	Reactivo de Cu	Folin 1:1
	µg	µl	µl	0.5N µl	µl	µl
1	0	0	34.62	11.54	230.8	23.08
2	5	1.5	33.12	11.54	230.8	23.08
3	10	3	31.62	11.54	230.8	23.08
4	15	4.5	30.12	11.54	230.8	23.08
5	20	6	28.62	11.54	230.8	23.08
6	40	12	22.62	11.54	230.8	23.08
7	60	18	16.62	11.54	230.8	23.08
8	80	24	10.62	11.54	230.8	23.08
9	100	30	4.62	11.54	230.8	23.08

Figura 5. Reactivos para realizar la curva estándar. El orden en el que se fue aplicando los reactivos en los pozos fue el siguiente; 1. Agua; 2. BSA; 3. NaOH; 4. Reactivo de Cu, entre este paso y el siguiente se pone en agitación durante 15 minutos exponiéndose lo menos posible a cualquier tipo de luz; 5. Reactivo folin en proporción 1:1 con agua.

Tras agregar el reactivo folin se dejó en agitación durante treinta minutos lo más aislado de cualquier luz.

El orden y las muestras que fueron cuantificadas en cada caja se encuentran en la sección de Anexo IV, al igual que la absorbancia obtenida a 450 nm en el medidor de ELISA y los cálculos para preparar cada reactivo en el Anexo III.

5.5 Registro de la integridad de las proteínas presentes en cada muestra por medio de la metodología de electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) es una técnica de separación de proteínas cargadas por migración dentro de un campo eléctrico a través de un material denominado poliacrilamida, resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y de N,N'- metileno-bis (acrilamida) y con cierto porcentaje de SDS detergente aniónico que se une a las proteínas, desnaturalizándolas y devolviéndole a su conformación lineal o extendida recubierta de moléculas de SDS. El SDS además de otros procedimientos como agregar beta-mercapto al buffer de corrida, cuidando no afectar el buffer final, y calentar la muestra a noventa grados centígrados se hace con la finalidad de desnaturalizarla, ya que como consecuencia de la desnaturalización la molécula de la proteína es directamente proporcional a su longitud de aminoácidos y su cara queda enmascarada por la mayor carga del SDS que la recubre, que es también proporcional a la longitud. Por lo que con todos estos compuestos la movilidad dentro de los geles por la electroforesis es únicamente dependiente de su masa molecular.

Cada muestra fue alícuotada de tal forma que los microlitros puestos para el gel correspondieran a treinta microgramos de proteína, en caso de tener un volumen menor a los 10 microlitros se diluyó la muestra en agua mili Q, de tal forma que todas las muestras tuvieron un volumen final de 10 microlitros., Además a cada muestra se le agregaron 5 microlitros de buffer de corrida Laemmli con beta- mercapto etanol, quedando un volumen final de quince microlitros, inyectados en los pozos de sus respectivos geles.

Se recomienda el uso de un marcador de peso molecular de Bio-Rad llamado Kaleidoscope™, Prestained Standards que fue el empleado durante este protocolo.

Para obtener los resultados mostrados en la sección de análisis de resultados los geles se corrieron en una cámara para electroforesis Bio- Rad, la forma de montaje se muestra en la figura 9, se partió de un voltaje de 60 volts hasta que el frente de corrida atravesó todo el gel concentrador y entro al gel separador, en ese momento el voltaje fue aumentando 15 volts cada 15 minutos, hasta alcanzar un voltaje de 120 volts, hasta que el buffer de corrida saliera del gel separador, y dependiendo de la finalidad del gel, se realizó un tratamiento posterior.

En caso de ser únicamente para el registro de integridad de las proteínas se teñó con azul de coomassie durante un mínimo de doce horas, después se destiñe con solución desteñidora (45.45% etanol; 45.45% agua destilada; 1.1% de ácido acético) durante tres horas, para finalizar se dejo en solución fijadora (90% agua; 10% ácido acético) durante una hora, para posteriormente escanear el gel (en el escáner Molecular Imagen Gel Doc™ XR System), se recomienda guardar las imágenes en formato Imagen J, para su futuro análisis. En caso de ser para realizar un Western Blotting su futuro tratamiento se mencionará en el siguiente apartado.

5.6 Metodología Western Blotting para observar de manera cualitativa a la proteína transportadora de membrana SLC6A4.

La metodología de Western Blotting o inmunoblot, es una técnica empleada para detectar y cuantificar proteínas específicas en una muestra determinada, esta técnica se realiza mediante electroforesis, donde las proteínas fueron separadas en base a su peso molecular, tras lo cual fueron transferidas desde el gel a la membrana absorbente (PVDF) electroforéticamente, para poder buscar la proteína de interés con ayuda de anticuerpos y antígenos específicos para dicha proteína, generalmente se emplearon dos anticuerpos, uno primario que se ancla al epítipo de su antígeno específico presente en la membrana de la proteína, y uno secundario cuya epítipo es el anticuerpo primario que tiene su paratopo ya unido a la proteína y que posee la cualidad de reaccionar bajo ciertas circunstancias (densidad de incidencia de luz es decir cierta longitud de onda) dando una señal luminosa de refracción.

Dicha señal luminosa puede ser registrada y escaneada, la imagen se analizó con ayuda del programa Image Lab y se puede obtener la cantidad aproximada de proteína presente en cada carril.

Las 24 muestras empleadas para el desarrollo experimental del presente proyecto fueron distribuidas en diferentes Western Blot (WB), para cada uno de estos WB se siguió el siguiente procedimiento:

El gel obtenido se sumergió en buffer de transferencia durante diez minutos en constante agitación, en tanto se activó con metanol la membrana de PVDF millipore empleada para el Western blot, se montó la cámara como se sugiere en el esquema de la figura 6 mostrada a continuación, con la diferencia de que durante nuestra

transferencia no empleamos una membrana de nitrocelulosa si no una de PVDF millipone.

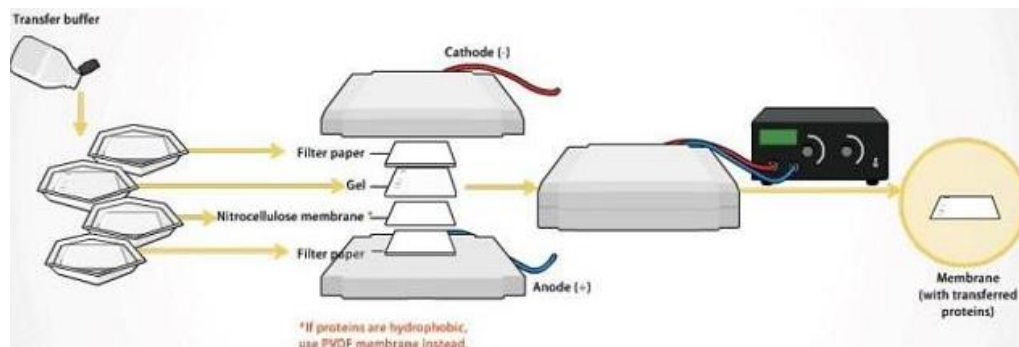


Figura 6. Ejemplo de montaje de un Western Blott. Para montar un Western blott lo primero es activar la membrana con metanol en agitación por cinco minutos, posteriormente enjuagar con agua des ionizada y equilibrar el gel además de humedecer los papeles filtros en buffer de transferencia, posteriormente se acomodan como lo indica el esquema y colocan dentro de la cámara¹⁶.

Una vez montado el Western blott se dejó correr durante una hora a cien volts, tras lo cual se desmontó poniendo al gel en solución teñidora con azul de coomassie para corroborar la transferencia, de igual manera la membrana se tiñó con rojo de punzón y se escaneo para corroborar la cantidad de proteína transferida.

Tras lo cual se debe dejar un mínimo de doce horas en seco para estabilizar la membrana prosiguiendo a bloquearla con una solución de BSA o leche svelty a una concentración de 5% con TBST 1x.

El bloqueo durante un mínimo de dos horas, tras lo cual se realizó un lavado de cinco minutos con TBST 1x, una vez enjuagado se aplicó el anticuerpo primario, en nuestro caso el anticuerpo empleado fue el Anti transportador de serotonina SLC64A (sc: 33724) de la compañía Santa Cruz Biotechnology INC, en una concentración de 1:500, se dejó en exposición a la membrana con dicho anticuerpo durante doce horas, tras lo cual se retiró el anticuerpo y se realizaron cuatro lavados cada diez minutos con TBST 1x.

Una vez terminados los lavados se expuso a la membrana al anticuerpo secundario anti mouse en una concentración 1:10,000 durante una hora en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual se le retiró el anticuerpo secundario y se le dio tres lavados con TBST 1x durante 10 minutos en constante agitación a temperatura ambiente y otros tres lavados con PBS 1x con una duración de diez minutos en constante agitación a temperatura ambiente¹⁶.

Tras lo cual se le aplicó a la membrana el kit Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad, para esto se mezcló los componentes del kit de sustrato en una porción 1:1. Preparándose 0.1 ml de solución por cm cuadrado de membrana.

6. RESULTADOS

6.1 Observación de plasma rico en plaquetas en cámara de Neubauer en microscopio óptico.

En la figura 7 se aprecian las imágenes obtenidas del microscopio óptico, con un objetivo de 40x, a simple vista no se observan diferencias de concentración de plaquetas en el plasma enriquecido en plaquetas, sin embargo, si se puede apreciar la ausencia de otras células o de contaminación dentro de los plasmas.

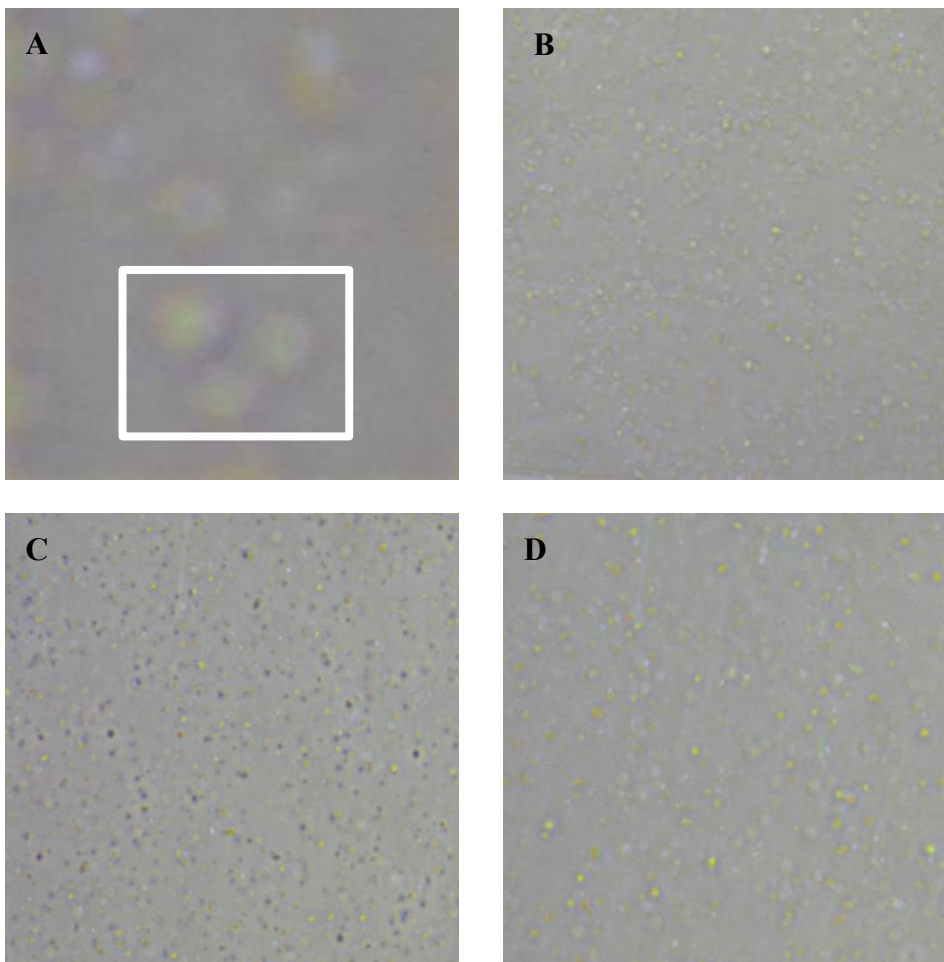


Figura 7. Imágenes de plaquetas. A) La presente imagen muestra un acercamiento del plasma enriquecido en plaquetas, donde se puede apreciar dentro del cuadro rojo tres plaquetas, como se puede ver y se mencionó previamente, las plaquetas tienen una tonalidad verde. B) la presente imagen corresponde a una de las muestras de plasma rico en plaquetas de uno de los pacientes controles, C) imagen de plasma enriquecido en plaquetas de un paciente con esquizofrenia paranoide, D) imagen de plasma enriquecido en plaquetas de pacientes diagnosticados con primer episodio psicótico.

6.2 Conteo de plaquetas por absorbancia en espectrofotómetro y determinación de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson adaptado a un volumen de 300.1 microlitros en una placa de ELISA.

Curva estándar representativa.

Por fines prácticos solo expondré una de las curvas estándares, mostrada en la figura 8, realizadas durante el conteo de proteína, sin embargo, el resto de las curvas estándares se podrán encontrar en la sección de anexos.

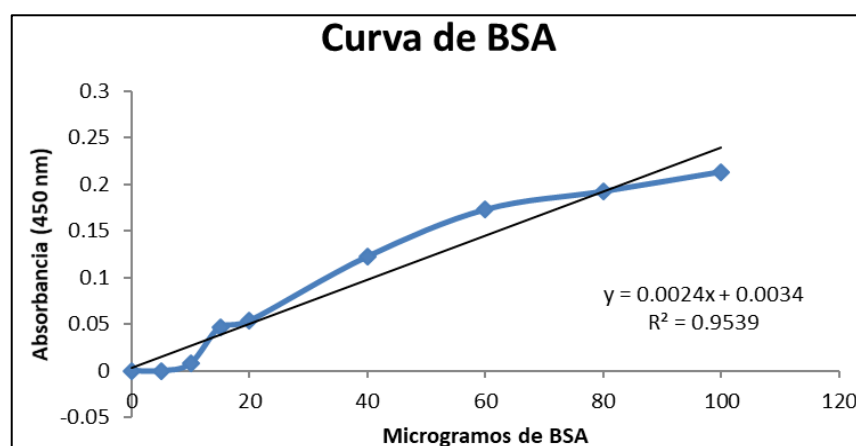


Figura 8. Curva estándar La presente curva estándar se realizó con BSA, el valor de la “r” al cuadrado nos indica el margen de error, y ya que es muy cercano al uno el margen de error es mínimo (margen de error es igual al valor de la r al cuadrado menos uno, en nuestro caso es de 0.9539)

A continuación, se muestra la exposición de los resultados promedios del conteo de plaquetas a 800 nm, del conteo de proteínas a 450 nm y la cantidad promedio de proteína por plaquetas entre los tres diferentes grupos dentro de la tabla 1.

Grupo	Proteinas	Plaquetas	Proteinas/Plaquetas
Esquizofrenia	16.2875	221719656	8.247E-08
Primer Episodio	28.4719663	2650210246	3.43621E-08
Control	4.24184685	101476859	4.6547E-08

Tabla 1. Exposición de resultados por grupos. Los valores mostrados a continuación son el promedio de los individuos pertenecientes a cada grupo. Se puede apreciar por tipo de muestra; la cantidad de proteínas y plaquetas obtenida para cada muestra y el promedio aproximado de proteína total por plaqueta cabe destacar que estos cálculos buscan ser un reflejo de las diferencias existentes desde el nivel de todas las proteínas presentes en los pacientes y los controles.

Para hacer más fáciles de analizar los resultados expuestos en la tabla 1, la figura 9 esta conformada por las gráficas de barras de los resultados expuestos en la tabla 1.

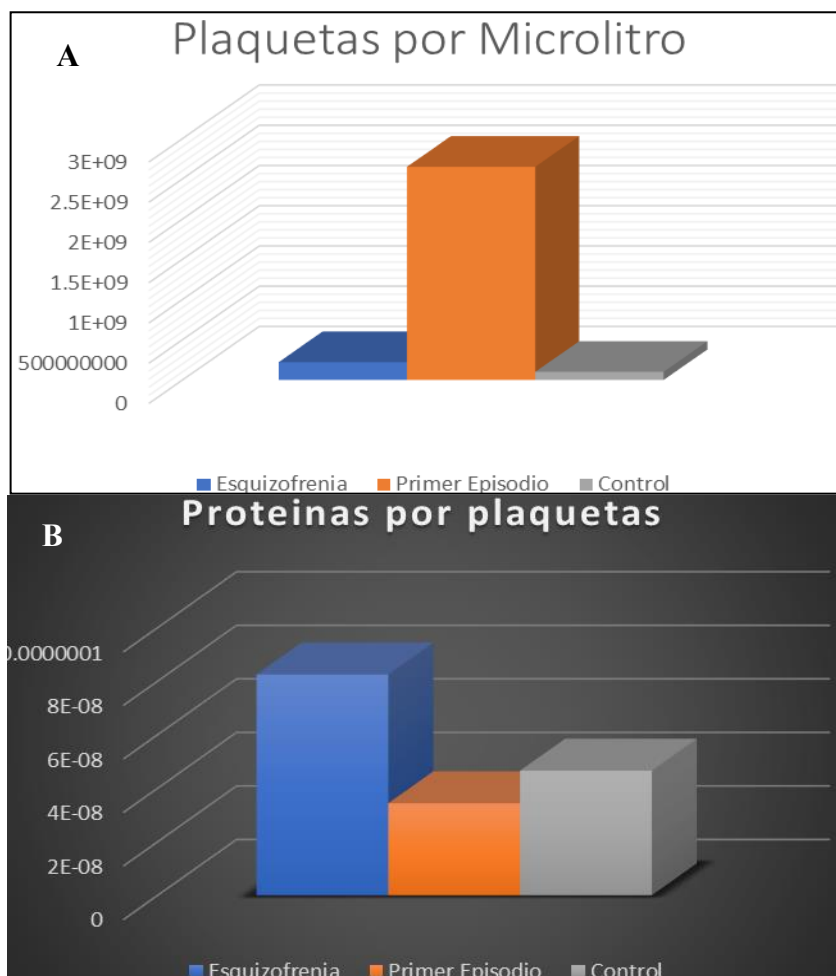


Figura 9. Graficas de barras de los datos obtenidos después del conteo por absorbancia
Las cantidades mostradas a continuación se obtuvieron del promedio de los resultados de las muestras agrupadas por género, en la imagen A se aprecia la cantidad de plaquetas que poseen, y en la imagen B se puede apreciar la cantidad de proteína total que posee aproximadamente cada plaqueta.

En la figura 9, imagen A se observa que el grupo de pacientes de Primer Episodio Psicótico posee mayor cantidad de plaquetas en comparación con el grupo de pacientes con esquizofrenia paranoide, sin embargo como se aprecia en la imagen C de la figura 9, una vez que se hace la relación de proteína total por plaquetas en un volumen de 1 mL, los pacientes con esquizofrenia paranoide son los que poseen más proteína por mL

de plaquetas, en tanto los grupos controles presentan el menor número de plaquetas y de proteína total por plaqueta.

6.3 Registro de la integridad de las proteínas presentes en cada muestra por medio de la metodología de electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS.

En la siguiente imagen se muestra un gel de poliacrilamida representativo, mostrado en la figura 10 y en la figura 11 se puede observar la curva estándar obtenida a partir del marcador de peso molecular de la figura 10, con el programa Image Lab.

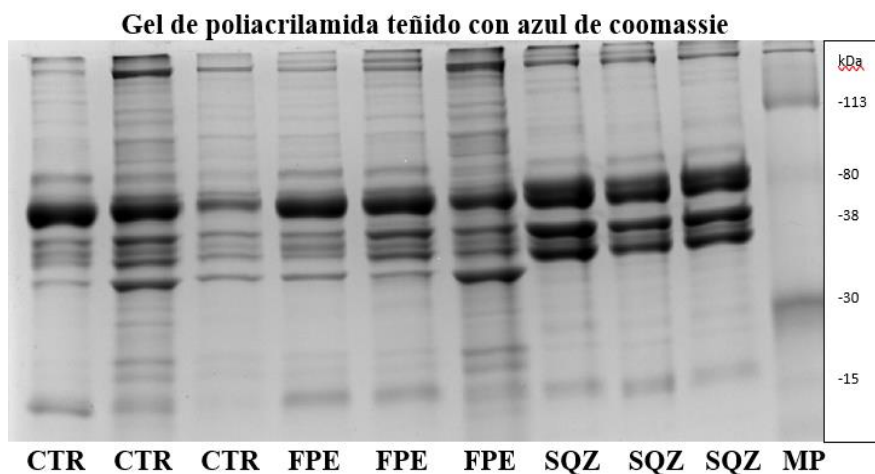


Figura 10. Gel 30% poliacrilamida-SDS pH= 8.8. El presente gel se realizó con tres muestras de cada grupo, cada carril se encuentra marcado con la muestra correspondiente que se corrió en cada carril, los marcados con CTR son los pacientes controles, los FPE son los pacientes con Primer Episodio Psicótico, los SQZ son los pacientes con esquizofrenia paranoide y el MP es el marcador de peso molecular.

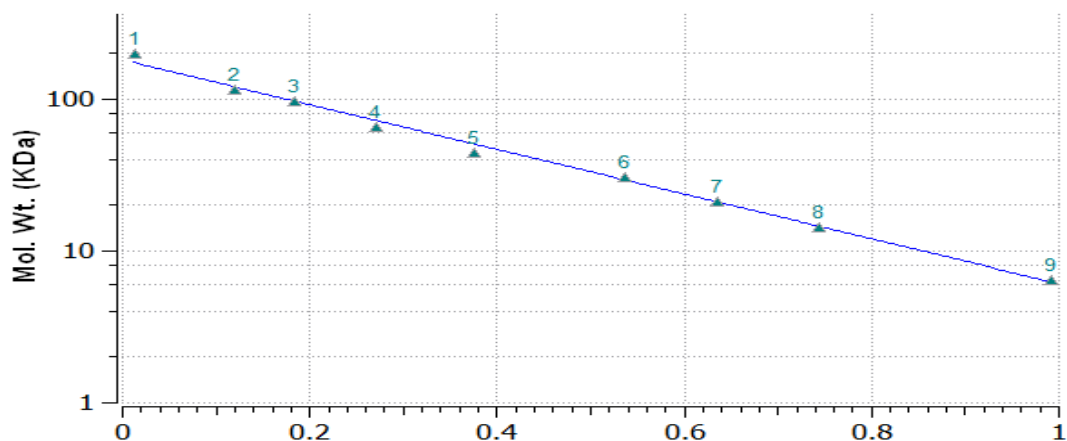


Figura 11. Curva estándar del gel de poliacrilamida representativo. La presente curva estándar se realizó con el marcador de peso molecular presente en el gel de la figura 10 mostrado previamente.

6.4 Metodología Western Blotting para observar de manera cualitativa a la proteína transportadora de membrana SLC6A4.

Las imágenes mostradas a continuación en la figura 12 fueron tomadas a diferentes membranas de Western Blott, tratadas con los mismo anticuerpos para el transportador de serotonina (SLC6A4), que tras someterse a quimio luminiscencia con el kit Clarity Western ECL Sustrate fueron teñidos con azul de Coomasie, esto con la finalidad de corroborar la transferencia, dichas membranas teñidas se aprecian en la figura 13.

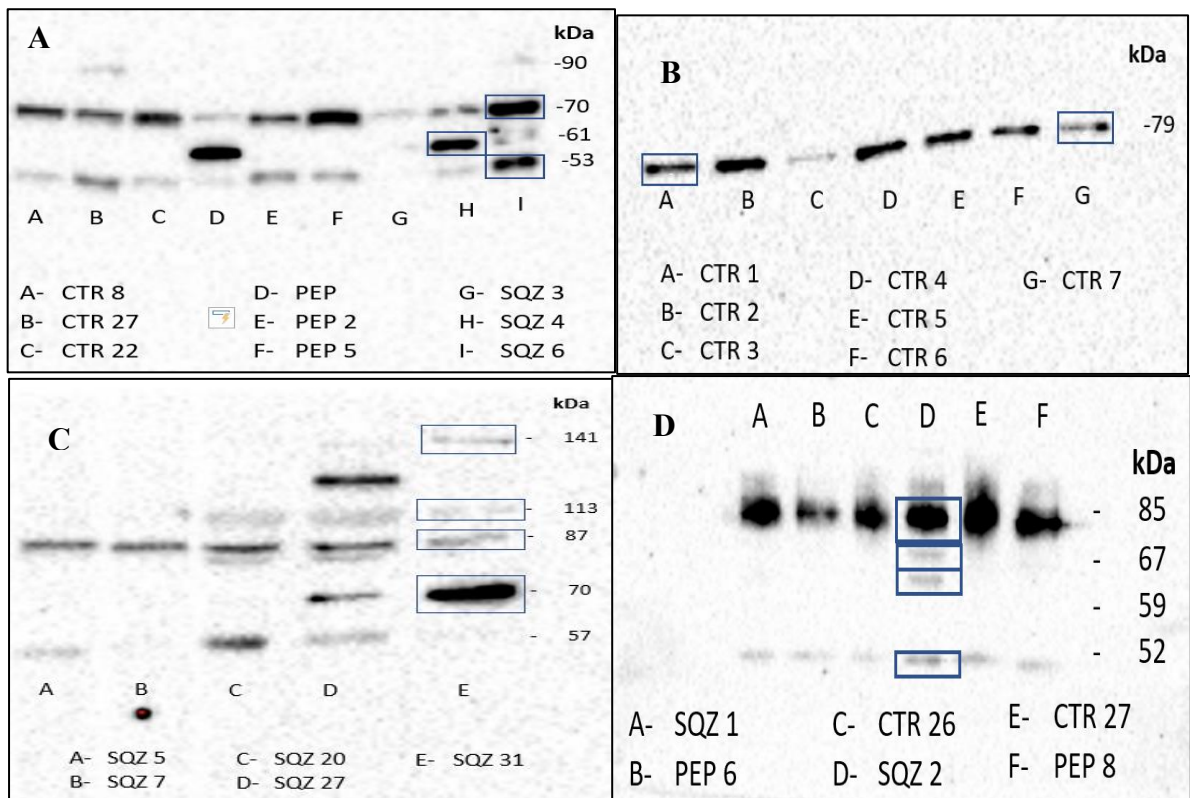


Figura 12. Imágenes obtenidas de la quimioluminiscencia a las membranas de WB . Las imágenes mostradas a continuación fueron tras exponer por 300 segundos (5 minutos) las membranas del western blott a los reactivos del kit de quimioluminiscencia A) La presente imagen fue tomada el día 06/07/2017, B) La presente imagen fue obtenida el día 17/08/2017, C) La presente imagen fue obtenida el día 17/08/2017, D) La presente imagen fue tomada el día 19/12/2017, en todas las imágenes la abreviatura CTR significa pacientes controles, la abreviatura PEP significa pacientes durante su primer episodio psicótico y la abreviatura SQZ es para referirse a los pacientes con esquizofrenia paranoide.

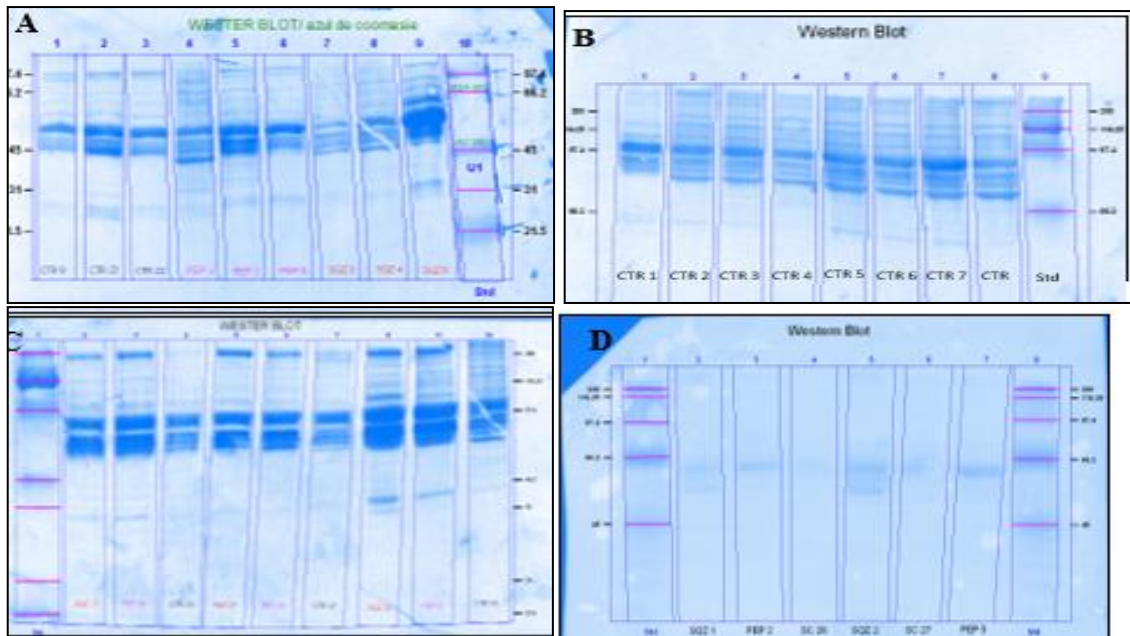


Figura 13. Imágenes obtenidas tras la tinción de las membrans de la figura 16 con azul de coomassie. . Las imágenes mostradas a continuación fueron tras exponer por 300 segundos (5 minutos) las membranas de los western blott a los reactivos del kit de quimioluminiscencia A) La presente imagen fue tomada el día 06/07/2017, B) La presente imagen fue obtenida el día 17/08/2017, C) La presente imagen fue obtenida el día 17/08/2017, D) La presente imagen fue tomas el día 19/12/2017

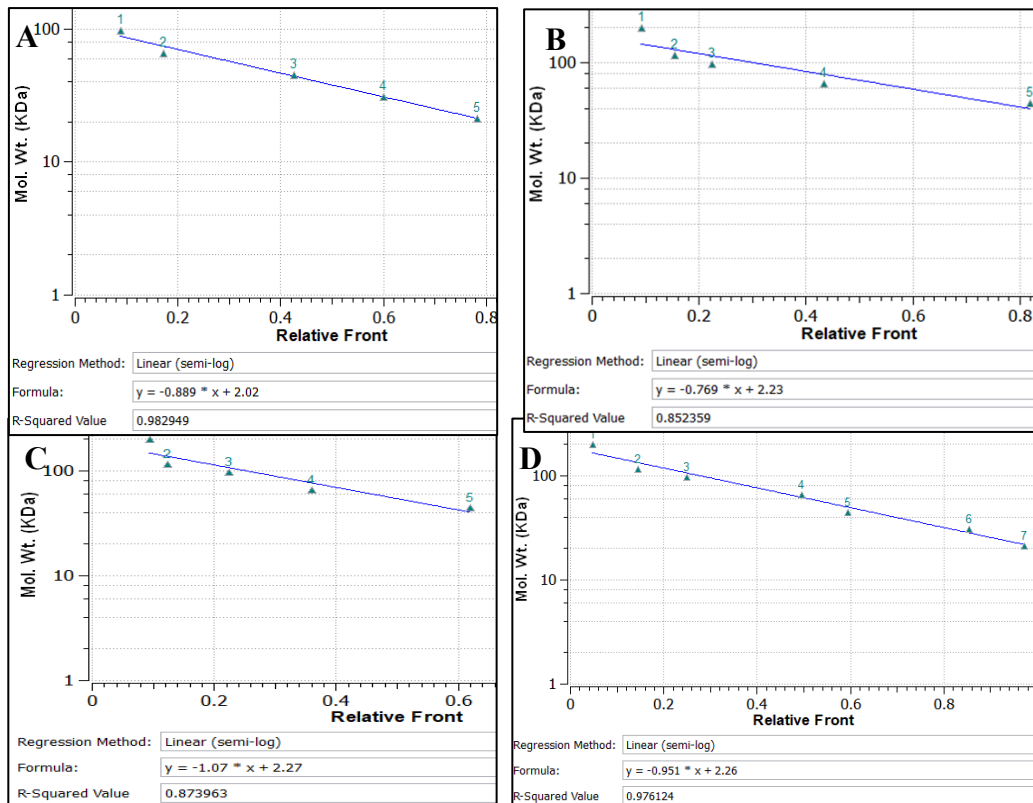


Figura 14. Curvas estándares obtenidos de las membranas expuestas en las figuras 12 y 13. Las imágenes mostradas a continuación fueron tras exponer por 300 segundos (5 minutos) las membranas del western blott a los reactivos del kit de quimioluminiscencia.

De las imágenes de la figura 12 y 13 se obtuvieron curvas para cada marcador de peso molecular transferido del gel a la membrana, dichas curvas se aprecian en la figura 14, con la ayuda de cada fórmula de pendiente a la ordenada y la medida de RF obtenida con la ayuda del programa Image Lab se calculó el peso molecular de cada banda, los pesos moleculares se aprecian en el lado derecho de cada imagen de membrana de la figura 12 y 13.

Tras obtener el RF de la señal que arrojó la quimioluminiscencia, con ayuda de la fórmula obtenida de la regresión lineal del marcador de pesos moleculares se obtuvo el valor aproximado del transportador de membrana 5HT2a. Para esto el RF con las medidas del gel en la membrana, para ver el frente y el fin de corrida, con el RF se aplicó la fórmula obtenida de la regresión, sustituyendo el valor de x por el RF de la banda, a dicho resultado se le aplicó un logaritmo inverso base 10 con lo cual se obtuvo el peso en KDa.

Posteriormente a realizar los cálculos para determinar los pesos moleculares de las bandas vistas por quimioluminiscencia de la figura 16 se realizó un análisis de comparación cualitativa de bandas con la información obtenida de la base de datos, dicha información se observa en la tabla 2, 3 y 4, presente a continuación.

6.5 Análisis

A continuación, se muestran los datos más representativos obtenidos en este trabajo. En la tabla 2 se muestra la información general de los pacientes con esquizofrenia paranoide, en la tabla 3 se muestra información de los pacientes con Primer Episodio Psicótico y en la tabla 4 de los individuos empleados como controles.

ID	Edad	Tratamiento actual		Escala de síntomas			
		Antipsicótico	Dosis	Total +	Total -	Total G	TOTAL
SQZ 1	38	Risperidona	1mg/día	10	14	29	53
SQZ 2	47	Aripiprazol	15mg/día	44	26	99	
SQZ 3	39	Haloperidol, Levomepromazina	10/12mg/día	11	15	31	57
SQZ 4	45	Haloperidol, Levomepromazina	10/25 mg/día	25	26	46	97
SQZ 5	62	Risperidona	4mg/día	27	31	37	95
SQZ 6	40	Risperidona	4mg/día	12	20	41	73
SQZ 7	37	Risperidona	4mg/día	23	26	34	83
SQZ 20	32	Risperidona	14 mg/día	19	21	40	80
SQZ 27	43	Trifluoperazina	2 mg/día	9	19	28	56
SQZ 31	38	Zuclopentixol	4 mg/día	12	16	45	73

Tabla 2. Información de la base de datos de pacientes diagnosticados con esquizofrenia tipo paranoide Valores obtenidos de la base de datos, la ID= clave con la cual se etiquetó a las muestras, E.I.= Edad de Inicio, H= Hospitalización, T.H.= Tiempo de Hospitalización, S.T.= Sin tratamiento, Todos los pacientes pertenecían al sexo masculino.

ID	Sexo	Edad	DUP	E.I.	H.	S.T.	Registro del tratamiento actual			S+	S-
							ALCOHOL	Mariguana	Tabaquismo		
PEP 2	H	38	104	19	0	104	16(SI)	16(NO)	32(SI)	24	28
PEP 5	M	22	104	20	0	104	15(SI)	15(SI)	15(SI)	27	25
PEP 6	H	27	20	27	1	20	NO	18(NO)	18(NO)	32	23
PEP 8	H	27	20	27	1	208	NO	NO	NO	21	19

Tabla 3. Información de la base de datos de pacientes durante su primer episodio psicótico
Valores obtenidos de la base de datos, la DUP significa tiempo de psicosis no tratada, ID= clave con la cual se etiqueta a las muestras, E.I.= Edad de Inicio, H= Hospitalización, S.T.= Sin tratamiento, S+= Síntomas positivos de esquizofrenia, S-= Síntomas negativos de esquizofrenia, H= género masculino y M= género femenino.

ID	Sexo	Edad	Enfermedades	Medicinas
CTR 1	H	38	-	-
CTR 2	H	47	-	-
CTR 3	H	62	-	-
CTR 4	H	40	-	-
CTR 5	H	37	-	-
CTR 6	H	32	-	-
CTR 7	H	43	-	-
CTR 8	H	38	-	-
CTR 22	H	38	-	-
CTR 26	M	22	-	-
CTR 27	H	27	-	-

Tabla 4. Información de la base de datos de los individuos considerados controles, es decir que no presentan síntomas de esquizofrenia ID= clave con la cual se etiqueta a las muestras.

Con los datos obtenidos en la tabla 2, 3, 4 y los resultados vistos en la figura 16 se prosiguió a formar la tabla 5, que contiene la información de la medicación de los pacientes más el número de bandas por muestra visto en la figura 12.

ID	Registro del tratamiento actual		Escala de síntomas				Bandeo
	Antipsicótico	Dosis	Total +	Total -	Total G	TOTAL	
SQZ 1	Risperidona	4mg/día	10	14	29	53	2
SQZ 2	Aripiprazol	15mg/día	44	26	99	169	4
SQZ 3	Haloperidol, Levomepromazina	10/12mg/día	11	15	31	57	2
SQZ 4	Haloperidol, Levomepromazina	10/25 mg/día	25	26	46	97	3
SQZ 5	Risperidona	4mg/día	27	31	37	95	2
SQZ 6	Risperidona	14mg/día	12	20	41	73	3
SQZ 7	Risperidona	4mg/día	23	26	34	83	2
SQZ 20	Risperidona	14 mg/día	19	21	40	80	3
SQZ 27	Trifluoperazina	2 mg/día	9	19	28	56	5
SQZ 31	Zuclopentixol	4 mg/día	12	16	45	73	3
PEP 2	--	-	0	24	28	52	2
PEP 5	--	-	0	27	25	52	2
PEP 6	--	-	0	32	23	55	2
PEP 8	--	-	0	21	19	40	2
CTR 1	--	-	0	0	0	0	1
CTR 2	--	-	0	0	0	0	1
CTR 3	--	-	0	0	0	0	1
CTR 4	--	-	0	0	0	0	1
CTR 5	--	-	0	0	0	0	1
CTR 6	--	-	0	0	0	0	1
CTR 7	--	-	0	0	0	0	1
CTR 8	--	-	0	0	0	0	1
CTR 22	--	-	0	0	0	0	1
CTR 26	--	-	0	0	0	0	1
CTR 27	--	-	0	0	0	0	1

Tabla 5. Tabla de recopilación, Recopilación de la información de base de datos, referente a la medicación, junto con la información resultante de los experimentos de la metodología de western blott es decir número de bandas obtenidas tras la quimio luminiscencia. ID= clave con la cual se etiqueto a las muestras, Total + = total de síntomas positivos obtenidos de la escala, Total -= total de síntomas negativos obtenidos de la escala, Total G= Total de síntomas generales obtenidos de las escalas.

7. DISCUSIÓN

La ausencia de marcadores objetivo en el entendimiento de la esquizofrenia como trastorno a nivel sistémico ha conducido a la búsqueda de biomarcadores periféricos que reflejen en cierta medida los mecanismos producidos como consecuencia de la respuesta al tratamiento de uno o varios fármacos suministrados³.

La finalidad del presente estudio fue proponer un protocolo estandarizado, con base a las características del plasma enriquecido en plaquetas, ya que como se mencionó anteriormente las plaquetas gracias a sus cualidades fisicoquímicas son excelentes biomarcadores para el estudio de la reacción de la proteína de transporte de serotonina bajo un tratamiento psiquiátrico específico.

La principal razón de centrarnos en esta proteína, es su relación con los trastornos psiquiátricos, que ya ha sido ampliamente probada en otros artículos y líneas de investigación, además de su origen genético.

Además como también se mencionó con la hipótesis serotoninérgica¹⁷, la serotonina y por ende las moléculas relacionadas a la misma tienen un estrecho vínculo con la sintomatología negativa de los pacientes con esquizofrenia.

La observación de plasma rico en plaquetas en cámara de Neubauer en microscopio óptico no mostró a simple vista diferencias significativas entre las muestras de los diferentes grupos, esto posiblemente a que el enfoque se podían apreciar más o menos plaquetas², sin embargo algo bastante notable fue el hecho de que no se encontró contaminación de otro tipo celular dentro de las muestras, y se logró apreciar las características físicas de las plaquetas (su forma ovalada y color verde)¹⁴, como se puede observar en la figura 7, sobre todo en la imagen A, donde se realizó un

acercamiento computacional a la imagen obtenida del microscopio óptico con un objetivo de 40x. Es importante señalar que no se realizó un acercamiento con otro objetivo más grande ya que al encontrarse embebidas en una solución las plaquetas se encontraban en constante movimiento y al intentar observarlas con un objetivo diferente se desenfocaban demasiado para observarlas.

En tanto, el conteo de plaquetas por absorbancia en espectrofotómetro no se encontró ningún problema y para la determinación de la proteína total por muestra se emplearon dos técnicas, por el método de Lowry modificado por Peterson adaptado a un volumen de 300.1 microlitros en una placa de ELISA y el método de Bradford, sin embargo por la cantidad de proteínas y el tipo de muestra el primer protocolo fue el que resulto más eficaz, el protocolo de Bradford no fue tomado en cuenta al momento de reportar la metodología final, sin embargo se pueden encontrar los datos más relevantes de lo obtenido por este método en la sección de anexos.

La cuantificación de la cantidad de plaquetas mostró una notable diferencia entre los tres grupos, dicha diferencia se puede ver en la figura 9, ya que como se puede apreciar en la imagen B de la misma, el grupo de individuos durante su primer episodio psicótico son lo que más cantidad de plaquetas presentan en comparación a el grupo de pacientes con esquizofrenia, el cual tiene una cantidad similar al del grupo control, y en cuanto a la correlación de proteínas por plaquetas los pacientes con esquizofrenia presentaron una notable diferencia en comparación con los individuos durante el Primer Episodio Psicótico y grupo control que presentaron un menor conteo.

Desde este punto podemos intentar atribuir la diferencia vista en los individuos diagnosticados con esquizofrenia paranoide a los fármacos tomados por los pacientes, ya que en su mayoría los medicamentos antipsicóticos que se les administraron a estos pacientes provocan como efecto secundario depresión en la médula ósea, lo que se puede ver traducido como menor cantidad de megacariocitos disponibles para realizar la fragmentación que dará origen a las plaquetas que deben de ser recambiadas del flujo sanguíneo cada 8-12 días, sin embargo en los pacientes diagnosticados con PEP, a pesar de tener mayor número de plaquetas que los pacientes diagnosticados con esquizofrenia, presentaron menor número de bandas que los controles, a simple vista no se encuentra una causa de la disminución de plaquetas.

Otra medida cuantitativa obtenida de la cuantificación por absorbancia del protocolo planteado para este proyecto, fue la cantidad de proteína total por mililitro de muestra, en la figura 9 imagen A, se aprecia la gráfica de barras que muestra la cantidad de proteína total, mismas que no es muy divergente con la cantidad de plaquetas totales, ya que los controles son lo que tienen a simple vista mayor cantidad de proteína total, en tanto que los pacientes con esquizofrenia paranoide, en este caso presentan un ligero incremento de proteína total comparados con los pacientes de Primer Episodio Psicótico.

Al realizar la comparación entre las plaquetas y la proteína existente en un mililitro de muestra, para obtener la cantidad aproximada de proteína neta de una plaqueta, se consigue un resultado completamente opuesto al de las imágenes a y b de la figura 9. En este caso, los pacientes con esquizofrenia paranoide tienen una mayor cantidad de proteína total por plaquetas que los pacientes controles, los pacientes de primer episodio psicótico se mantienen en promedio, sin llegar a ser tan bajos sus niveles como los

controles pero sin llegar a la magnitud de los pacientes diagnosticados con esquizofrenia paranoide.

El registro de la integridad de las proteínas presentes para cada muestra por medio de la metodología de electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS resulto un patrón de bandeo específico y conservado en todas las muestras, dicho patrón se puede observar en la figura 10 e incluso en la figura 13, ya que el patrón de bandeo se conservó al momento de la transferencia y se logró visualizar una vez que se tiñeron las membranas con azul de coomassie².

En la metodología Western Blotting utilizada para observar de manera cualitativa a la proteína transportadora de membrana SLC6A4 se logró visualizar un espectro de bandas, en un principio se sospechó que dicho espectro se debía a la falta de bloqueo en la membrana o a inespecificidad del anticuerpo, por lo que se prosiguió a realizar una curva de bloqueo. Para elegir la concentración de solución de bloqueo y el tiempo de exposición. Con respecto a la posible inespecificidad del anticuerpo, se realizó una búsqueda bibliográfica, detectando que el anticuerpo empleado es parte de un nuevo anticuerpo promovido por la compañía Santa Cruz Biothecnology, como sustituto de un anticuerpo que antes producía la misma compañía pero que al ser un anticuerpo policlonal presentaba demasiada inespecificidad, es decir que el anticuerpo empleado para el presente protocolo es un anticuerpo monoclonal promovido por esta compañía por su alta especificidad, por lo que el multibandeo no es debido a una inespecificidad del anticuerpo¹⁶.

Adicionalmente, se realizaron pruebas con muestras de cerebro y controles de plasma enriquecido en plaquetas con las condiciones y se observó una sola banda por carril, en un peso molecular similar al mencionado en la hoja técnica del anticuerpo, por lo que se llegó a la conclusión de que el anticuerpo no es inespecífico, el bloqueo dado a la membrana es óptimo y no se debe a un error técnico, sino que es parte de la naturaleza neta de las muestras¹⁶. Por lo que se puede pensar que el multibandeo puede ser un efecto colateral del uso de fármacos antipsicóticos administrados a los pacientes con diagnóstico de esquizofrenia tipo paranoide, y ya que en los individuos diagnosticados con primer episodio psicótico se observó un bandeo doble se puede proponer que es una característica de la esquizofrenia; ya que dichos pacientes no se encontraban sometidos a ningún fármaco o situación que pudiese comprometer al transportador de serotonina, además a dichos pacientes se les llevo un seguimiento como parte de otro protocolo de investigación Psiquiátrica y se concluyó que su Primer Episodio Psicótico termino con un desenlace a largo plazo de esquizofrenia diagnosticada, en tanto los individuos controles únicamente presentaron una banda en el peso molecular esperado.

Una vez obtenidos y analizados los datos de los experimentos del Western Blott se prosiguió a la comparación con el análisis de la base de datos, donde se observó que todos los participantes fueron varones; esto puede ser debido a que los varones tienden a presentar a una edad más joven y en una mayor prevalencia esta enfermedad y por consiguiente las muestras empleadas eran las que se encontraban disponibles para el proyecto, por lo que no se pueden hacer inferencias si existen diferencias significativas entre hombres y mujeres en relación a la respuesta del fármaco empleado.^{7,11}

La edad promedio de los individuos con esquizofrenia fue de 38 años, estos pacientes mostraron mayor índice de síntomas negativos que positivos en general, en tanto los pacientes durante su primer episodio psicótico mostraron mayor prevalencia síntomas positivos. Esto se explica fácilmente, ya que la mayoría de los fármacos antipsicóticos típicos son empleados para neutralizar los síntomas positivos de la enfermedad al ser agonistas o antagonistas de la dopamina. Y ya que los pacientes con esquizofrenia se encontraban ya bajo el efecto de los fármacos su sintomatología positiva era menos marcada.

Con respecto a los diferentes tratamientos en los pacientes con esquizofrenia, el 50% fue tratado con risperidona; de los cuales el 80% fue tratado con una dosis de 4mg/día, en tanto el 20% restante fue tratado con 14 mg/día, el 20% fue tratado con haloperidol y levomepromazina, el haloperidol en una dosis de 10 mg/día y el levomepromazina en dosis de 12mg /día y 25 mg/día, 10% fue tratado con aripiprazol en una dosis de 15 mg/día, 10% con trifluoperazona en dosis de 2 mg/día y el último 10% con Zuclopentixol en dosis de 4 mg/día.

Es importante tomar en cuenta, que los fármacos empleados, tienen principios activos que actúan como antagonistas, agonistas parciales o completos a diferentes tipos de receptores, regulando de forma directa principalmente las vías dopaminérgicas y en menor medida las serotoninérgicas, por lo que son recetados para tratar la psicosis que comúnmente es inducida por la sobreexcitación celular de ciertas neuronas catecolaminérgicas¹¹.

Por otra parte la hipótesis de que se encontrarían diferencias en el bandeo del transportador de membrana SLC6A4, entre los grupos de pacientes e individuos del grupo control, dadas en función del tratamiento farmacológico individual, fue corroborada con la ayuda de las membranas de la figura 12.

Lo que nos mostró que, al menos para este estudio piloto, se puede apreciar una diferencia significativa en el bandeo obtenido del transportador de membrana *SLC6A4*. En las bandas obtenidas del plasma enriquecido en plaquetas, entre los grupos de pacientes diagnosticados con esquizofrenia tipo paranoide vs pacientes de primer episodio psicótico e individuos control, hay que recalcar que los individuos diagnosticados con primer episodio psicótico presentaron un conjunto de bandas diferente a los individuos empleados como controles. Esto debido posiblemente, a que el anticuerpo anti transportador de serotonina reacciona a la terminal carboxilo de la proteína diana, es decir de la proteína codificada por el gen *SLC6A4*, al reconocer la terminal carboxilo de esta proteína es posible que el anticuerpo haya reaccionado uniéndose a varios posibles oligómeros.⁶

Los pacientes con Primer Episodio Psicótico fueron empleados como comparativos con los pacientes con esquizofrenia por el hecho de ser pacientes con alto riesgo a desarrollar dicho trastorno, pero con la ventaja experimental de que no se encontraban bajo ningún tratamiento médico -al momento de la toma de la muestra, por ende se puede pensar en este grupo como un grupo comparable, con síntomas ya diagnosticados de la posible enfermedad subsiguiente pero sin alteración farmacológica.

El grupo de individuos sin síntomas de esquizofrenia aparentes solo presentaron una banda, es decir una forma del transportador, esto se puede explicar ya que no poseen ningún tratamiento o patología que comprometa a sus plaquetas.

A continuación, se agruparán a los pacientes con base al tratamiento farmacológico.

7.1 Risperidona

Los pacientes referidos en las tablas como SQZ 1, SQZ 5, SQZ 6, SQZ 7 y SQZ 20 fueron tratados con risperidona, como se mencionó en el apartado de farmacología la risperidona es un medicamento antipsicótico atípico, es decir que es principalmente un antagonista de los receptores D2 de dopamina, pero que también bloquea receptores de serotonina como los receptores 5-HT₂.

Hay que recordar que como lo mencionan la mayoría de las hipótesis de los neurotransmisores¹¹, lo que altera a una proteína ya sea de transportadora, receptora o incluso de segregación, altera todo el complejo y delicado equilibrio celular.

Basandonos en dicha premisa la risperidona al fungir como antagonista de los receptores tanto de D2 como 5-HT, propiciando que haya menos sitios de unión para la misma, por lo cual los autoreceptores deben de capturar más serotonina en el mismo tiempo que si esta fuese empleada de la forma habitual por lo cual es viable pensar que para compensar, la celular sobreexpresa el gen SLC6A4 del transportador de serotonina, incrementando la concentración en la membrana, llegando incluso a ver varios oligómeros del autoreceptor, siendo esto visible como un multibandeo en el Western Blot¹⁶, las proteínas al estar tan unidas en la misma zona de la membrana no se separan por el proceso de zonificación al que fueron expuestas y durante la electroforesis son detenidas en pesos superiores a los estándares, pero al ser oligómeros de la proteína los anticuerpos las reconocen y se reflejan como un multibandeo, visible en las imágenes de la figura 12, donde se observa dicho multibandeo y cuyos pesos en su mayoría están por encima del peso molecular estándar del transportador.

También hay que tomar en cuenta el nivel de la membrana celular, la cantidad de fármaco en un intervalo de tiempo por paciente; aunado con la sintomatología y el estado de gravedad o severidad de la esquizofrenia.

En el caso de los pacientes, codificados como SQZ 1, SQZ5, SQZ7, que recibieron una dosis de 4 mg de risperidona al día, se observan dos bandas, que bien pueden ser producto de dos tipos de conjuntos formados por un número característico de oligómeros⁶, estas bandas también parecen estarse apreciando en los pacientes de Primer Episodio Psicótico, es decir, el fármaco en estas dosis puede que no esté afectando a la proteína de transporte., Sin embargo en los pacientes SQZ 3 y SQZ 20 la dosis de risperidona es de 14 mg/día (3.5 veces más dosis) y se pueden apreciar tres bandas.

Lo que nos lleva a pensar que esta cantidad de dosis haya comenzado a desencadenar los efectos secundarios mencionados anteriormente, y estos efectos puedan ser los causantes de que en esta muestra el anticuerpo monoclonal del transportador haya reconocido a tres epítomos de diferente peso molecular como se puede apreciar en la figura 12 imágenes A y C, especialmente en la banda C, de la imagen C, donde se aprecia que el multibandeo se encuentra en los pesos marcados como oligómeros del transportador⁶ también se observan bandas con un peso superior al esperado.

7.2 Aripiprazol

El único paciente tratado para aripiprazol fue el paciente mostrado bajo la clave de SQZ 2, el bandedo de dicho paciente se puede apreciar en la figura 12 imagen D banda D; este paciente fue el único en obtener más de dos bandas dentro de esa membrana, ya que en el carril correspondiente a esta muestra el anticuerpo reacciona a 4 epítomos de diferente peso molecular se sabe que es el transportador de serotonina es altamente específico, se puede considerar que el aripiprazol puede ser el causante de dicho efecto¹¹.

El aripiprazol como ya se mencionó es un antipsicótico atípico, su mecanismo de acción es un agonismo parcial sobre los receptores de dopamina D2 y de los receptores 5-HT1a de serotonina y un antagonista del receptor de serotonina 5-HT2a. Algo importante de recordar es que el aripiprazol se distribuye de manera intra y extravascular por lo cual es lógico pensar que al igual que la risperidona, el aripiprazol puede llegar de manera abundante a la médula ósea que es donde se producen las plaquetas y sobre que este fármaco afecte de forma tan insidiosa a los receptores de serotonina. Algo similar a lo mencionado con la risperidona puede estar ocurriendo con el aripiprazol ya que la interacción del aripiprazol va más enfocada a dos tipos de receptores de la serotonina, podría pensarse que genere un efecto secundario sobre el transportador de la serotonina¹¹, ya que los diferentes tipos de receptores de serotonina tienden a estar muy ligados a los transportadores de la misma, para mantener una baja concentración de la serotonina en el espacio sináptico y evitar una sobre estimulación de las neuronas con la ayuda de la captura por el transportador y en el torrente sanguíneo, donde la serotonina se encuentra suspendida en el plasma, es recapturada por el transportador en plaquetas.

7.3 Haloperidol y Levomepromazina.

Las muestras de los pacientes tratados con estos fármacos son los nombrados como SQZ 3 y SQZ 4, el haloperidol es un neuroléptico que bloquea los receptores postsinápticos de la dopamina en el cerebro¹¹ denominado como, un antipsicótico típico, que se enfoca en la sintomatología positiva del padecimiento. En tanto la levomepromazina es un antagonista competitivo de los receptores dopaminérgicos del sistema límbico, cuya cantidad máxima recomendada es de 12.5-25 mg/día o dividida cada 8 horas¹¹, también considerado un antipsicótico típico.

En tanto al tipo de bandeo observado dentro de estas dos muestras se aprecia que la muestra de SQZ 3, cuya dosis fue de 10mg de haloperidol por día y 12mg por día de levomepromazina, solo presentó dos bandas, con pesos cercanos a los característicos de los oligómeros mencionados previamente del transportador en las muestras de Primer Episodio Psicótico.

Por otro lado la muestra SQZ4 presentó tres bandas, esto puede ser debido a la dosis de los medicamentos, la cantidad de haloperidol fue equivalente en ambos pacientes (10 mg/día), sin embargo, en el paciente de SQZ 4 la dosis de levomepromazina se incrementó a 25 mg por día, es decir que al paciente SQZ 4 se le administró la dosis máxima (el doble de levomepromazina que al paciente 3). Lo que puede ser la posible causa de las tres formas mostradas del transportador con diferentes pesos moleculares, basándonos en la premisa de que este antipsicótico al ser un antagonista y bloquear los receptores postsinápticos de la dopamina, puede desestabilizar no solo el sistema dopaminérgico si no también alterar el serotoninérgico¹¹.

7.4 Trifluoperazina

La única muestra tratada con este fármaco fue la de SQZ 27 en una dosis de 2 mg por día, que pese a la baja dosis dada a este paciente, la imagen de la banda C en la membrana de la imagen C de la figura 12; fue con la que el anticuerpo reacciono en más bandas o epítomos de diferente peso molecular, dando como resultado 5 bandas de diferente peso molecular, la dosis máxima recomendada es de 40 mg/día. Sus mecanismos actúan inhibiendo a los receptores dopaminérgicos, produciendo depresión del sistema nervioso central¹¹.

La concentración de tantos oligómeros en esta muestra posiblemente es debida a este fármaco, como una respuesta hipersensible al mismo por parte del paciente, ya que se analizó escrupulosamente la información sociodemográfica del mismo, encontrándose que se trataba de un joven de 27 años, cuya toma de muestra se dio en su primera hospitalización, que tuvo una duración de 24 semanas, mismas que recibió el tratamiento.

7.5 Zuclopentxol

El Zuclopentxol es un antipsicótico típico de naturaleza neuroléptica perteneciente a la familia de los tioxantenos, actúa bloqueando los dos tipos de receptores dopaminérgicos, D1 y D2¹¹. La muestra del único paciente tratado con este tratamiento dentro de este trabajo es la muestra de esquizofrenia (SQZ) 31, en una dosis de 4mg por día, con este fármaco se obtuvo un bandeo de 4 epítomos de diferente peso molecular, similares a las de la muestra 27, observable en la figura 12^a. Lo que conduce a pensar en otra posible reacción de hipersensibilidad al fármaco, ya que la dosis y la farmacodinamia estándar no parece ameritar la posible modificación del transportador de una manera tan radical, aun que es importante señalar que tanto en este caso como en los pasados mencionados previamente es posible una interacción directa con plaquetas, ya que las plaquetas cuentan con receptores para dopamina también, y el transportador de serotonina se vea afectado de manera indirecta por la reacción con los receptores de dopamina.

7.6 Limitaciones de la investigación

Es importante recordar que cada individuo es diferente a otro. Es decir, que lo que en un individuo funciona, puede que en otro individuo no tenga la misma respuesta ¹⁸. Esto varía con respecto a la información genética y los cambios epigenéticos sufridos a lo largo de la vida con base al entorno natural y social de cada individuo. Los resultados del presente protocolo, son los de un ensayo piloto y se requiere realizar un estudio más grande (más pacientes) de naturaleza longitudinal (con un seguimiento de los mismos pacientes).

El prototipo de estudio mostrado en este trabajo cuenta con una baja tasa de pacientes, y de repeticiones de Western blott con las mismas muestras y con una ausencia de métodos de normalización que permitan volverlo no solo cualitativo sino también cuantitativo.

Las limitantes mencionadas se deben a la falta de muestras, esto debido a que la participación de pacientes en investigación es limitada, se deben de reunir varios requisitos para que el paciente pueda y quiera participar, además de que su psicosis este controlada. Haciendo mucho más difícil la obtención de las muestras.

Otro punto importante que tratar es la falta de más individuos sometidos a un mismo tratamiento, y aun así sería favorable realizar un análisis, aparte de cuantitativo, fármaco genético y posiblemente de señalización celular, para darnos una idea de los mecanismos de las modificaciones que en el presente trabajo se manejan como la posible causa de las agrupaciones de oligómeros que dan como resultado múltiples bandas con diferentes pesos moleculares en las membranas de los Western Blott.

7.7 Recomendaciones para investigación futuras

Como se mencionó en la sección de limitaciones de investigación no se realizó el análisis de la proteína con la cantidad apropiada para realizar un estudio cuantitativo, sin embargo, en presencia de un mayor volumen de muestra se recomienda repetir al menos dos veces más el protocolo de western blott para cada muestra, además de realizar al menos un stripping out con un anticuerpo endógeno como la anti b-actina que se encuentra presente dentro de plaquetas y que en instancias del presente proyecto en teoría no debería de verse afectada por los fármacos administrados.

Al implementar las repeticiones y el uso de otro anticuerpo en la misma membrana se podrían normalizar los datos obtenidos, volviendo como ya mencioné a este estudio un estudio cuantitativo y cualitativo.

En el anexo VI se puede apreciar datos de este trabajo que se intentaron normalizar con base al gel de proteína total, teñido con azul de coomassie que fue realizado a la par y en la misma cámara de electroforesis que el gel empleado para la transferencia de cada western blott, sin embargo, al no poderse realizar la corroboración de dicha normalización se realizó un stripping out. Es necesario señalar que se prefirió no reportar estos resultados cuantitativos y solo reportar los resultados cualitativos del presente protocolo.

Otra recomendación para futuros estudios es el uso del kit ELISA Bioassay¹⁹ específico para serotonina humana, ya que al conocer la concentración de la serotonina presente en plasma enriquecido en plaquetas y en plasma libre de plaquetas (que puede ser obtenido durante la concentración del plasma enriquecido en plaquetas), junto con la información

obtenida de los western blott se podría buscar una posible correlación entre la posible modificación de la forma del transportador en relación a la absorción de serotonina dentro de las plaquetas.

Y con esto estudiar si las posibles modificaciones dadas por los fármacos que afectan de forma significativa el funcionamiento del transportador de serotonina *SLC6A4* dentro de las plaquetas, lo que podría llegar a ser un reflejo de lo que ocurre en las neuronas serotoninérgicas.

8. CONCLUSIÓN

Se estandarizo un protocolo, con base a las características del plasma enriquecido en plaquetas, con la finalidad de identificar de manera cualitativa los posibles efectos secundarios sobre el transportador de serotonina *SLC6A4*.

Se demostró que, si bien no sabemos de forma exacta si se realizó una modificación en la estructura de la proteína de transporte de serotonina (*SLC6A4*), podemos deducir que se formaron agrupaciones de varios oligómeros en la membrana y bajo el método de homogenización ofrecido por este protocolo se obtuvieron grandes fragmentos de membranas de diferentes pesos moleculares; que fueron visibles en las membranas de los Western Blott., diferenciadas por el tipo de fármaco empleado en los diferentes individuos diagnosticados con esquizofrenia .

Los pacientes que sufrieron una modificación posiblemente inducida por el antipsicótico, fueron los tratados con risperidona 14 mg/día y con trifluoperazina, zuclopentxol y leomepromazina.

Por lo que se deduce que la expresión del transportador de serotonina puede estar regulada por la estimulación producida por los antipsicóticos sobre los receptores de serotonina y los receptores de Dopamina en plasma enriquecido en plaquetas de los individuos diagnosticados con esquizofrenia.

Se recomienda la continuación de este tipo de estudios en biomarcadores periféricos para buscar un modelo que refleje el efecto de medicamentos antipsicóticos en las neuronas serotoninérgicas y que ayude a expandir la comprensión de la esquizofrenia en todas sus facetas.

9. REFERENCIAS

- 1- ORGANIZACIÓN DE LOS ESTADOS AMERICANOS, COMISIÓN INTERAMERICANA PARA EL CONTROL DEL ABUSO DE DROGAS CICAD, Oficina Regional de la OMS, & ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2005). Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas (2ª ed.). Recuperado de http://www.who.int/substance_abuse/publications/neuroscience_spanish.pdf
- 2- Moreno J, Campos MG, Lara C, Torner C. La plaqueta como marcador biológico periférico de la función serotoninérgica neuronal. Salud Mental 2005; 28 (3), Recuperado en 20 de junio de 2016, de <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=677>
- 3- Meltzer HY, Fatemi SH. Schizophrenia. In: Ebert MH, Loosen PT, Nurcombe B, eds. Current Diagnosis and Treatment in Psychiatry. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill, 2000:260–277. 6. Schizophrenia 103
- 4- Saiz Ruiz, Jerónimo, Vega Sánchez, Diego C. de la, & Sánchez Páez, Patricia. (2010). Bases Neurobiológicas de la Esquizofrenia. Clínica y Salud, 21(3), 235-254. Recuperado en 22 de noviembre de 2018, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-52742010000300004&lng=es&tlng=es.
- 5- Organización Mundial de la Salud, citado el 20/06/2017 Recuperado en 10 junio de 2018: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs397/es/>
- 6- Zoe Robaina Jiménez, Inés V. Noa Hechavarría,(2013), Bases genéticas de las principales hipótesis etiológicas en la esquizofrenia Genetics Bases on Main Etiologic Hypothesis on Schizophrenia, Rev. Hosp. Psiquiátrico de la Habana,

- 10(3), Recuperado en 22 de noviembre de 2018, de <http://docplayer.es/78822708-Bases-geneticas-de-las-principales-hipotesis-etilogicas-en-la-esquizofrenia.html>
- 7- Programa Específico de Esquizofrenia 2001-2006, SSA, SERSAME (Servicios de Salud Mental), Consejo Nacional Contra las Adicciones, Recuperado el 11 de Enero de 2018;de http://www.ssm.gob.mx/portal/page/programas_salud/salud_mental/guias_tecnicas/esquizofrenia.pdf
- 8- Vicente Pardo, Esquizofrenia. Impacto del no tratamiento en la evolución y su vinculación con las intervenciones terapéuticas tempranas, Rev Psiquiatr Urug 2007;71(1):83-98, Recuperado el 21 de Noviembre de 2018
- 9- Leticia García Álvarez, “Biomarcadores diferenciales de la esquizofrenia” Universidad de Oviedo, programa de Doctorado en ciencias de la salud, citado el 26 de febrero de 2018.
- 10- Hayashi-Takagi, A., Vawter, MP, y Iwamoto, K. (2013). Revisados biomarcadores periféricos: perfiles integradores de muestras periféricas para la investigación psiquiátrica. Psiquiatría biológica , 75 (12), 920-8.
- 11- Sergio Alberto Viruete Cisneros,Manual de conocimientos básicos de Farmacoogía, Universidad de Guadaajara 2015, Recuperado el 35 de Enero 2018 de <file:///C:/Users/Brittany%20Pereo/Desktop/INMEGEN/NUEVO%20PROYECTO/Farmacologia/2015%20-%20Manual%20de%20conocimientos%20b%C3%A1sicos%20de%20farmacolog%C3%ADa.pdf>
- 12- Esperanza Sañudo Vallejo, Hemoglobina, eritropoyesis, leucopoyesis, trombopoyesis, 2014, Recuperado el 18/02/2018 de

<http://speranzasavallejo.blogspot.mx/2014/02/la-hemoglobina-hb-es-unaproteina.html>

- 13- Revista Española de Cardiología Supl. 2013; 13 (B):2 recuperado el 3 de marzo del 2018 de <http://www.revespcardiol.org/es/plaqueta-fisiologia-activacion-inhibicion/articulo/90200688/>
- 14- Manual platelet count”, exercise 7: Manual Platelet Count, MLAB 1415:Hematology.
- 15- Bastidas, O. B. Oscar. (s.f.). Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting (CELEROMICS). Recuperado el 25 de agosto de 2017 de <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
- 16- AbYntek, Guía para solucionar problemas en Western Blot, jun 7, 2016 Recuperado 11/01/2018 de <http://www.abyntek.com/guia-para-solucionar-problemas-en-western-blot/>
- 17- IEMS-OMS, Informe de la evaluación del sistema de salud mental en México utilizando el Instrumento de Evaluación para Sistemas de Salud Mental de la Organización Mundial de la Salud (IESM-OMS) Informe sobre sistema de Salud Mental en México, 2011;citado el 11 de Enero 2018; de http://www.who.int/mental_health/who_aims_country_reports/who_aims_report_mexico_es.pdf
- 18- Sistemas de neurotransmisión indolaminérgica., Serotonina (5-HT), citado el 20/junio/2016, de: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/serotonina.html>

- 19- Probiotek, productos y equipos biotecnológicos S.A. de C.V. USBiological Life Sciences, Kit de ELISA BioAssay™ para Serotonina Humana, citado el 19/Mayo/2016, de <http://www.probiotek.com/producto/kit-de-elisa-bioassay-para-serotonina-humana/>
- 20- DSM-IV, citado el 20/06/2017 de:
<https://www.psicocode.com/resumenes/DSMIV.pdf>
- 21- Irene Riveros Barrer, Caracterización del Polimorfismo en el Promotor del Gen SLC6A4 (5HTTLPR) en una Muestra de Población Colombiana con Trastorno Depresivo Mayor: Estudio Piloto, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias Bogotá, Colombia 201, 2015 citado de <file:///C:/Users/Brittany%20Pereo/Desktop/INMEGEN/NUEVO%20PROYECTO/5HTTLPR.pdf>
- 22- National Institute of Mental Health DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS DE LOS ESTADOS UNIDOS Institutos Nacionales de la Salud Publicación de NIH Núm. SP 15-3517 Traducida en el 2011 Modificada en octubre del 2015

ANEXOS

I. Clasificación de los trastornos mentales y del comportamiento (CIE-10), capítulo de Esquizofrenia²⁰.

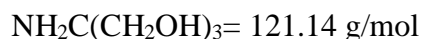
Los trastornos esquizofrénicos se caracterizan en general por distorsiones fundamentales y características del pensamiento y de la percepción, y por los afectos embotados o inapropiados. La claridad de la conciencia y la capacidad intelectual están conservadas por lo general, aunque con el paso del tiempo pueden presentarse déficits cognoscitivos. Los fenómenos psicopatológicos más importantes incluyen eco, inserción, robo o difusión del pensamiento; percepciones delirantes o ideas delirantes de ser controlado, de influencia o de pasividad; voces alucinatorias comentando o discutiendo sobre el paciente en tercera persona; trastornos del pensamiento y síntomas negativos.

El curso de los trastornos esquizofrénicos puede ser continuo o episódico, con un defecto estable o progresivo, o puede haber uno o más episodios con remisión completa o incompleta. El diagnóstico de esquizofrenia no debe hacerse ante la presencia de síntomas prominentes de depresión o manía a menos que los síntomas esquizofrénicos antecedan de forma clara al trastorno del humor. Tampoco debe diagnosticarse esquizofrenia ante la presencia de una enfermedad cerebral manifiesta o durante el estado de intoxicación o abstinencia por alguna droga. Trastornos similares a la esquizofrenia que se desarrollan ante la presencia de una epilepsia u otra enfermedad cerebral deben clasificarse bajo la categoría F06.2, y los inducidos por sustancias psicoactivas en F10-F19, con el cuarto dígito común 5.

II. Formula de Buffer de citratos

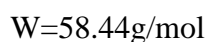
Para preparar el buffer de citratos únicamente se requiere poner las siguientes sustancias en las proporciones indicadas, a continuación, se dará la formula con cantidades dada para aforar a un volumen de 100 mililitros con agua mili Q.

Tris 50 mM



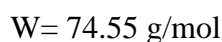
En el caso del Tris disponible en el laboratorio tenía una concentración de 50 milimolar por litro, por lo que había 5 milimoles en cien mililitros, así que empleando una regla de tres simples con la cantidad de gramos por mol, llegamos a la conclusión de que se requerían 0.6057 gramos.

NaCl 120 mM



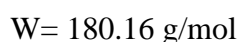
Aplicando el mismo raciocinio que con el Tris, pero con los pesos y concentraciones del NaCl llegamos a que se necesitan 0.701 gramos

KCl 145 mM



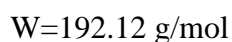
Se requieren 1.081 gramos

Glucosa 11 mM = $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$



Se requieren 0.1986 gramos

Ácido Cítrico 7 mM = $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$



Se requieren 0.1345 gramos

Citrato de sodio 8 mM = $\text{C}_6\text{H}_3\text{Na}_3\text{O}_7, 2\text{H}_2\text{O}$

$W = 294.10 \text{ g/mol}$, Se requieren 0.237 gramos.

III. Cálculos para las soluciones de Lowry modificado por Peterson en placas de ELISA.

Soluciones en cantidades para una placa de 96 pozos

El reactivo de Cu está compuesto por Solución A ó carbonato de sodio; Solución B ó tartrato de sodio y potasio; Solución C ó sulfato-cúprico.

Solución A: Carbonato de sodio

Para preparar 23.08 ml del reactivo de Cu

50 ml de Sol. A.....51 ml totales

22.62 de Sol A.....23.08 ml

Solución B: Tartrato de sodio y potasio

0.500 ml.....51 ml totales

0.226 ml de Sol. B.....23.08 ML

Solución C: Sulfato cúprico

0.500 ml.....51 ml totales

0.226 ml de Sol. B.....23.08 ML

Dando un total de 23.08 ml totales, mezclando las tres soluciones

Para hacer el reactivo follin se emplea una dilución 1:1

1.154 ml de agua miliQ

1.154 de follin

2.308 ml de reactivo follin.

IV. Orden de cada caja, absorbancias y curvas estándares.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA 0	BSA 5	BSA 10	BSA 15	BSA 20	BSA 40	BSA 60	BSA 80	BSA 100	CTR 38	CTR 40	CTR 41
B	BSA 0	BSA 5	BSA 10	BSA 15	BSA 20	BSA 40	BSA 60	BSA 80	BSA 100	CTR 38	CTR 40	CTR 41
C	SQZ 1	SQZ 1	SQZ 12	SQZ 12					CTR 35	CTR 37	CTR 45	CTR 46
D	SQZ 2	SQZ 2	SQZ 13	SQZ 13					CTR 35	CTR 37	CTR 45	CTR 46
E	SQZ 5	SQZ 5	SQZ 14	SQZ 14					CTR 33	CTR 57	CTR 60	CTR 73
F	SQZ 7	SQZ 7	SQZ 18	SQZ 18					CTR 33	CTR 57	CTR 60	CTR 73
G	SQZ 10	SQZ 10	SQZ 21	SQZ 21					CTR 26	CTR 90	CTR 50	CTR 52
H	SQZ 11	SQZ 11	SQZ 26	SQZ 26					CTR 26	CTR90	CTR 50	CTR 52

Figura 19. Orden muestras del primer experimento—procesada por Lowry modificado por Peterson en placas de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.075	0.066	0.088	0.119	0.164	0.179	0.282	0.268	0.278	0.126	0.115	0.127
B	0.092	0.050	0.094	0.142	0.110	0.233	0.231	0.284	0.316	0.101	0.087	0.108
C	0.202	0.169	0.160	0.204					0.088	0.075	0.103	0.184
D	0.245	0.227	0.165	0.216					0.165	0.116	0.075	0.148
E	0.243	0.223	0.212	0.227					0.073	0.119	0.110	0.084
F	0.145	0.170	0.110	0.161					0.054	0.099	0.099	0.109
G	0.240	0.280	0.176	0.158					0.102	0.108	0.076	0.063
H	0.178	0.200	0.089	0.095					0.093	0.109	0.090	0.088

Figura 20. Absorbancias obtenidas de la primera caja de muestras

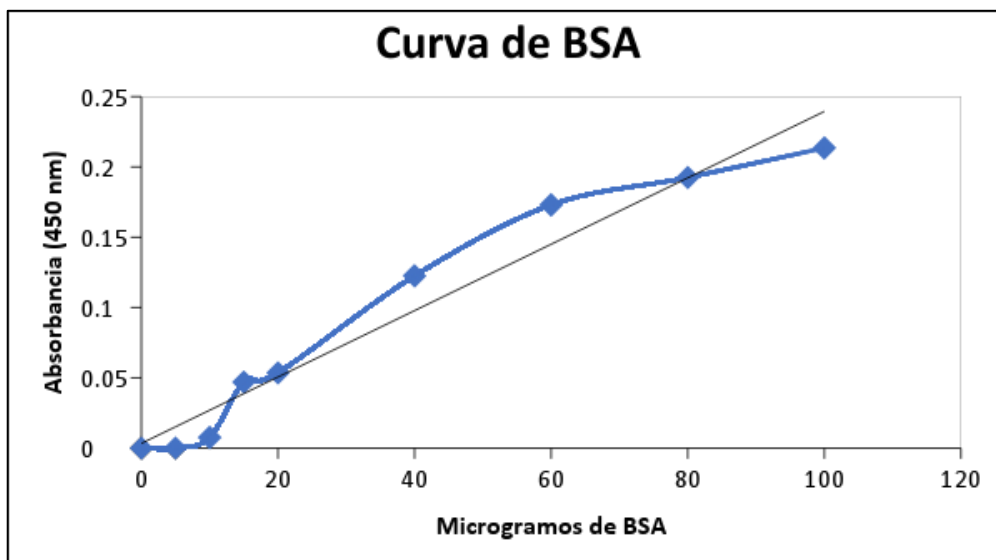


Figura 21. Curva estándar de la primera caja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA 0	BSA 5	BSA 10	BSA 15	BSA 20	BSA 40	BSA 60	BSA 80	BSA 100		SQZ 37	SQZ 37
B	BSA 0	BSA 5	BSA 10	BSA 15	BSA 20	BSA 40	BSA 60	BSA 80	BSA 100		SQZ 30	SQZ 30
C											SQZ 35	SQZ 35
D	PEP 5	PEP 5	PEP 12	PEP 12	PEP 2	PEP 2		CTR 53	CTR 53		SQZ 36	SQZ 36
E	PEP 6	PEP 6	PEP 13	0.339				CTR 55	CTR 55			
F	PEP 8	PEP 8	PEP 14	PEP 14			CTR 56	CTR 56	CTR 59	CTR 59	CTR 63	CTR 63
G	PEP 10	PEP 10	PEP 15	PEP 15			CTR 64	CTR 64	CTR 74	CTR 74	CTR 84	CTR 84
H	PEP 11	PEP 11	PEP 16	PEP 16			CTR 87	CTR 87	CTR 89	CTR 89	CTR 100	CTR 100

Figura 22. Orden de muestras de la segunda caja procesada por Lowry modificado por Peterson en placas de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.110	0.140	0.122	0.139	0.191	0.198	0.317	0.340	0.462		0.150	0.179
B	0.070	0.112	0.131	0.178	0.176	0.222	0.282	0.401	0.539		0.179	0.193
C											0.239	0.207
D	0.292	0.302	0.230	0.196	0.183	0.216		0.186	0.187		0.217	0.154
E	0.438	0.433	0.308	0.339				0.237	0.224			
F	0.349	0.285	0.364	0.352			0.188	0.198	0.179	0.178	0.190	0.199
G	0.239	0.278	0.732	0.593			0.188	0.169	0.183	0.144	0.162	0.157
H	0.373	0.374	0.215	0.225			0.195	0.204	0.222	0.173	0.195	0.199

Figura 23. Absorbancias obtenidas de la segunda caja de muestras

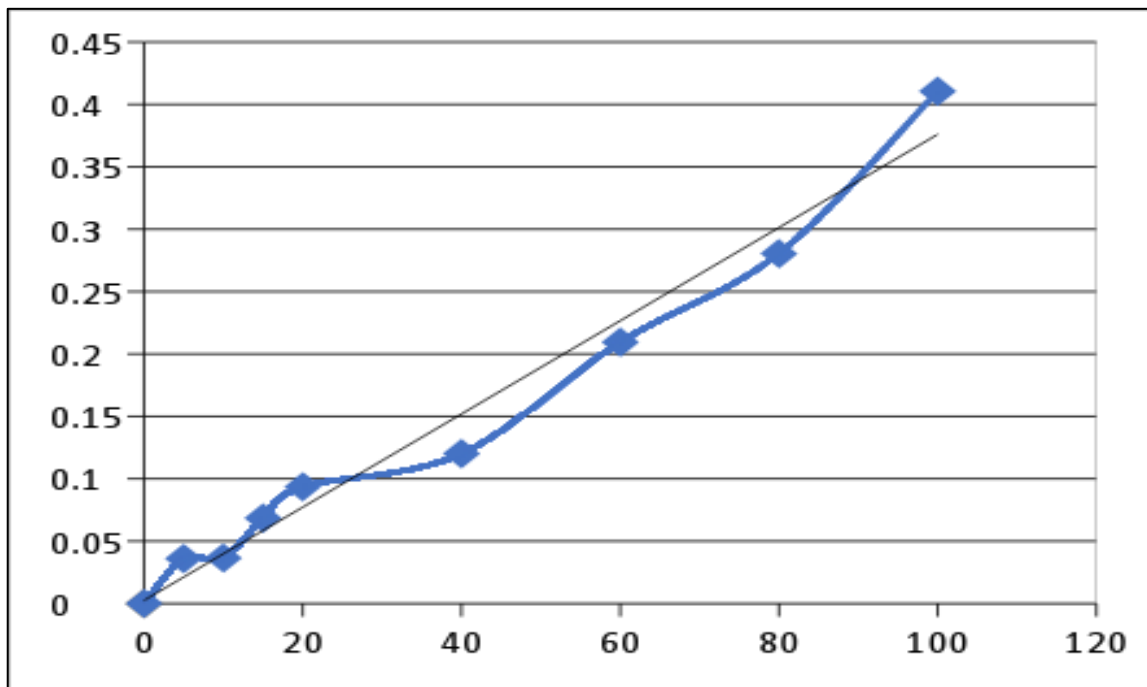


Figura 24 Curva estándar de la segunda caja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA 0	BSA 5	BSA 10	BSA 15	BSA 20	BSA 40	BSA 60	BSA 80	BSA 100		SQZ 29	SQZ 29
B				BSA 15	BSA 20	BSA 40	BSA 60	BSA 80	BSA 100		SQZ 40	SQZ 40
C	BSA 0	BSA 5	BSA 10								SQZ 43	SQZ 43
D											SQZ 44	SQZ 44
E	PEP 18	PEP 19	PEP 27	PEP 31	PEP 20	PEP 34		CTR 27	CTR 27			
F	PEP 18	PEP 19	PEP 27	PEP 31	PEP 20	PEP 34		CTR 75	CTR 75	CTR 30	CTR 30	
G	PEP 17	PEP 26	PEP 30	PEP 32	PEP J			CTR 82	CTR 82	CTR 47	CTR 47	
H	PEP 17	PEP 26	PEP 30	PEP 32	PEP J			CTR 85	CTR 85	CTR 86	CTR 86	CTR 46

Figura 25 Orden de muestras de la tercera caja procesada por Lowry modificado por Peterson en placas de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.026	0.062	0.090	0.091	0.172	0.244	0.269	0.267	0.420		0.189	0.197
B				0.080	0.088	0.282	0.328	0.458	0.385		0.143	0.117
C	0.027	0.064	0.075								0.127	0.114
D											0.086	0.118
E	0.252	0.189	0.209	0.282	0.372	0.152		0.091	0.115			
F	0.165	0.160	0.206	0.257	0.463	0.128		0.112	0.116	0.136	0.182	
G	0.374	0.493	0.380	0.198	0.222			0.091	0.082	0.215	0.274	
H	0.251	0.441	0.348	0.212	0.184		0.145	0.134	0.100	0.098	0.093	0.138

Figura 26. Absorbancias obtenidas de la tercera caja de muestras

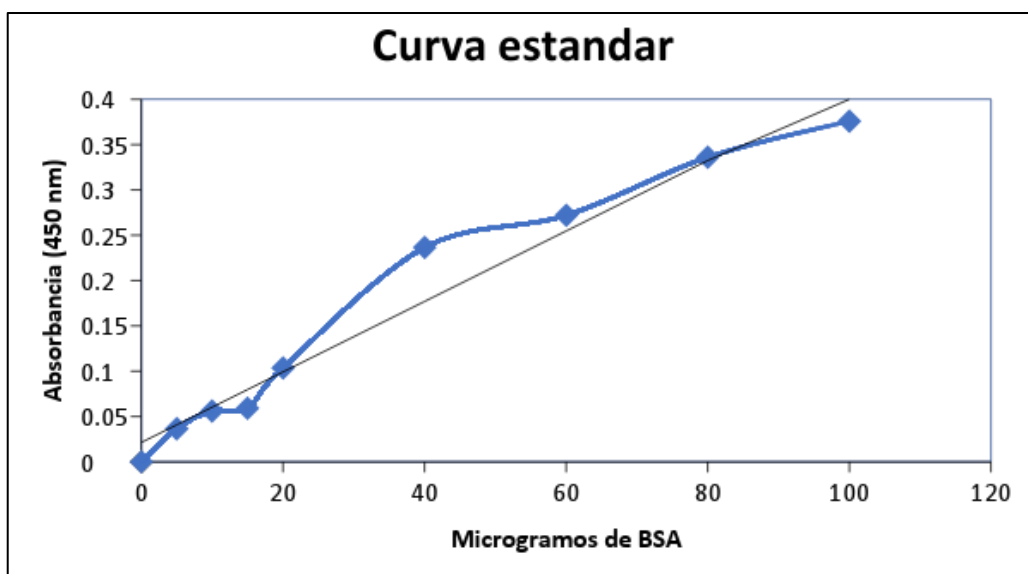


Figura 27. Curva estándar de la tercera caja

V. Análisis cuantitativo de las muestras expuestas.

Empleando el programa Image Lab se analizaron las imágenes escaneadas de las membranas del western blott mostradas en la figura 16 y con la ayuda de los geles de proteína total, corridos de forma paralela con los geles empleados para la transferencia, se pueden normalizar los valores obtenidos por la densitometría realizada en el software mencionado previamente.

A continuación, en la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la densitometría aplicada a las membranas expuestas con quimioluminiscencia en el escáner.

Proteína Total			
Muestra	Mean Value	Higest Signal	LNF
SQZ 1	2,998.50	4,021.62	0.745593371
SQZ 1	650.54902	790.27451	0.823193728
SQZ 2	351.490196	790.27451	0.44476975
SQZ 2	309.764706	790.27451	0.39197102
SQZ 2	790.27451	790.27451	1
SQZ 2	3,839.47	4,021.62	0.954705514
SQZ 5	19845.3	33250.5	0.596842153
SQZ 7	17764.8	33250.5	0.534271665
PEP 2	1,594.86	4,021.62	0.396570975
PEP 2	668.27451	790.27451	0.845623263
PEP 5	3,098.21	4,021.62	0.770387903
PEP 5	475.568627	790.27451	0.601776498
CTR 26	2,317.62	4,021.62	0.576290579
CTR 26	455.45098	790.27451	0.576319968
CTR 27	4,021.62	4,021.62	1
CTR 27	607.843137	790.27451	0.769154426
CTR 35	30951.8	33250.5	0.930867205
CRT 38	29814.3	33250.5	0.896657193
CTR 45	33250.5	33250.5	1
CTR 75	20827.2	33250.5	0.626372536

Tabla 7. Proteína total presente en la primera banda del gel de poliacrilamida-SDS de proteína total teñido con azul de coomassie.

5-HT 2a						
Muestra	Mean Value	LNF	Normal-Target	Promedio	STD	%CV
SQZ 1	20,023.66	0.78096686	15637.81609	16936.23	1836.2318	10.84204
SQZ 2	18,234.64	1	18234.64			
SQZ 5	3808.5	1	3808.5	4492.246	966.963518	21.52517
SQZ 7	5339.5	0.96937783	5175.992922			

Tabla 8. Valores estadísticos obtenidos de la densitometría de las muestras de los pacientes con esquizofrenia paranoide.

5-HT 2a						
Muestra	Mean Value	LNF	Normal-Target	Promedio	STD	%CV
PEP 2	1,594.86	1	1594.86	2113.43785	733.37983	34.7007994
PEP 5	3,098.21	0.84952786	2632.0157			

Tabla 9. Valores estadísticos obtenidos de la densitometría de las muestras de los pacientes durante su primer episodio psicótico.

5-HT 2a						
Muestra	Mean Value	LNF	Normal-Target	Promedio	STD	%CV
CTR 26	2,317.62	1	2317.62	2912.63128	841.47302	28.8904753
CTR 27	4,021.62	0.87219642	3507.64256			
CTR 45	1,717.08	1	1717.08	1919.03961	285.614016	14.8831746
CTR 33	2,281.58	0.9296186	2120.99922			

Tabla 10. Valores estadísticos obtenidos de la densitometría de las muestras de los pacientes tratados como controles.

5-HT2a				
Muestra	Normal-Target	Promedio	STD	%CV
SQZ 1	15637.8161	16936.228	1836.2318	10.8420352
SQZ 2	18234.64			
SQZ 5	3808.5	4492.24646	966.963518	21.5251662
SQZ 7	5175.99292			
PEP2	351.49	377.745734	37.1312149	9.82968477
PEP 5	404.001468			
CTR 26	2317.62	2912.63128	841.47302	28.8904753
CTR 27	3507.64256			
CTR 45	1717.08	1919.03961	285.614016	14.8831746
CTR 33	2120.99922			

Tabla 11. Valores estadísticos obtenidos de la densitometría de las muestras de los tres grupos previamente mencionados.

5-HT2a				
Muestra	Intensidad	STD	%CV	Error estandar
Esquizofrenia	16936	8799	10	6222
PEP	378	37	9	26
Controles	1919	770	14	544

Tabla 12. Promedio de los valores estadísticos obtenidos para los pacientes con esquizofrenia paranoide, los pacientes durante su primer episodio psicótico y los pacientes controles.