



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Variantes del gen *GCLC* en pacientes
con trastornos psicóticos bajo
tratamiento de clozapina.”**

TESIS

Que para obtener el título de

LIC. EN BIQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

Mayumi Yajaira García Manteca

DIRECTOR(A) DE TESIS

Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

UNAM
CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO
DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Variantes del gen GCLC en pacientes con trastornos psicóticos bajo tratamiento de clozapina.

Que presenta la pasante: **Mayumi Yajaira García Manteca**

Con número de cuenta: **310241126** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 110 de Agosto de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.F.C. Cecilia Hernández Barba	
VOCAL	M. F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy	
SECRETARIO	Dra. Nancy Monroy Jaramillo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
2do. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

Agradecimientos

A mis padres por siempre apoyar mis decisiones, por su presencia, su cariño y acompañarme en cada parte del camino. Todo lo que soy es por ustedes y lo que quiero ser, para ustedes.

A la Dra Nancy por darme la oportunidad de pertenecer a este proyecto, creer en mí, por toda la ayuda, la comprensión y sobre todo la paciencia, es un gran ser humano.

A mis compañeros de Laboratorio en especial Isabel y Yerye por integrarme desde el comienzo, por su ayuda incondicional, por los buenos momentos y sobre todo por su amistad

A mis abuelos agradezco su amor y deseo se sientan orgullosos de mí, gracias por siempre cuidarme.

A la UNAM y cada uno de mis profesores por formar en mí un pensamiento más crítico, darme las bases para crecer académicamente y fomentar mi amor por la ciencia.

Índice de tablas y figuras

Figura 1.- Esquema de un corte sagital de cerebro de rata en el que se indican las principales vías de neurotransmisión involucradas en la psicosis	7
Figura 2.- Lugares de acción de los antipsicóticos	10
Figura 3.- Transporte, metabolismo y señalización de CLZ	12
Figura 4.- Síntesis y metabolismo del glutatión	16
Figura 5.- Análisis de Fragmentos para repetidos GAG de GCLC	27
Figura 6.- Gráfica polar para discriminación alélica de la variante rs761142 por PCR en tiempo real	29
Figura 7.- Niveles plasmáticos de GSH en pacientes con TP y controles	30
Figura 8.- Correlación entre los niveles plasmáticos de GSH y la edad de los pacientes	31
Figura 9.- Niveles plasmáticos de GPx en pacientes con TP y controles	32
Figura 10.- Niveles de GSH según el genotipo de los repetidos GAG de GCLC	34
Tabla 1.- Preparación de curva de GSH	23
Tabla 2.- Preparación de la curva de GPx	24
Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados para análisis de repetidos GAG de GCLC .	26
Tabla 4.- Reactivo y volúmenes para PCR fluorescente de GCLC	26
Tabla 5.- Condiciones para PCR fluorescente de GCLC	27
Tabla 6.- Reacción de PCR en tiempo real	28
Tabla 7.- Distribución de número de repetidos GAG del gen GCLC	33
Tabla 8.- Comparación entre los niveles de GSH y los genotipos de los repetidos GAG del gen GCLC en pacientes	35
Tabla 9.- Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs761142 de pacientes	36
Tabla 10.- Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs761142 de controles	36
Tabla 11.- Porcentaje de pacientes con TP que presentan RAM para clozapina y su asociación con la variante genética rs761142 de GCLC	37
Tabla 12.- Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs17883901 de pacientes	38
Tabla 13.- Frecuencia génica y genotípica para la variante rs17883901 de controles	38

INDICE

1.0 Marco Teórico	3
1.1 Trastornos psicóticos	3
1.2 Esquizofrenia	4
1.2.1 Etiología de la esquizofrenia	4
1.2.2 Fisiopatología de la esquizofrenia	5
1.3 Trastorno bipolar	7
1.3.1 Síntomas del trastorno bipolar (TB)	7
1.4 Trastorno esquizoafectivo (TEA)	8
1.5 Psicosis interictal	8
1.6 Tratamiento antipsicótico	9
1.6.1 Clozapina	11
1.7 Estrés oxidativo	13
1.7.1 El estrés oxidativo y los trastornos psicóticos	14
1.8 Glutación	15
1.8.1 Glutación en el Cerebro	17
1.8.2 GCLC	17
2.0 Objetivos	19
2.1 Objetivo General	19
2.2 Objetivos particulares	19
3.0 Hipótesis	19
4.0 Metodología	20
4.1 Sujetos y métodos	20
4.2 Pacientes	20
4.2.1 Criterios de Inclusión	20
4.2.3 Criterios de exclusión	20
4.3 Controles	20
4.4 Toma de muestra biológica	21
4.5 Tratamiento de la muestra	21
4.5.1 Muestra Sanguínea	21
4.5.2 Extracción de DNA por metodología de sales modificada	21
4.5.2 Precipitación de proteínas en plasma para cuantificación de glutación reducido	22
4.6 Cuantificación de glutación reducido (GSH)	23

4.7 Cuantificación de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en plasma	24
4.8 Análisis de Fragmentos para repetidos GAG del gen GCLC mediante PCR fluorescente	25
4.8.1 Electroforesis capilar	27
4.9 Genotipificación de las variantes rs761142 y rs17883901 de GCLC por PCR en tiempo real	28
5.0 Resultados	29
5.1 Niveles plasmáticos de glutatión (GSH)	29
5.3 Resultados de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)	31
5.4 Número de repetidos GAG en la unidad catalítica del gen GCLC de la enzima glutamato cisteín-ligasa	33
5.5 Resultados de la variante genética del gen GCLC	36
5.6 Resultados de la variante rs17883901 del gen GCLC	38
6.0 Discusión de resultados	39
7.0 Conclusiones	44
8.0 Referencias bibliográficas	46

Resumen

Según la OMS los trastornos psicóticos (TP) afectan a más de 21 millones de personas en el mundo, se dice que el origen de estos trastornos es multifactorial. En diversos estudios se ha demostrado asociaciones entre el estrés oxidativo y los TP y se ha propuesto que la presencia de variantes alélicas de riesgo en genes que codifican para enzimas involucradas en el sistema antioxidante favorecen el desarrollo de los TP.

Se sabe que el Glutati6n (GSH) es de los antioxidantes end6genos m1s importantes. La enzima glutamato cistein ligasa es la primer enzima limitante en la sntesis de GSH, en estudios anteriores se ha observado que la subunidad catal1tica de esta enzima, codificada por el gen **GCLC** llega a presentar variantes en el gen, que pueden tener diversas consecuencias funcionales. Este estudio se realiz6 con la finalidad de determinar si existe una correlaci6n entre las variantes del gen **GCLC** con niveles de GSH plasm1ticos as1 como identificar genotipos de riesgo. Para esto se midieron los niveles de GSH plasm1ticos, la actividad enzim1tica de la Glutati6n peroxidasa (GPx) y se genotiparon variantes implicadas en el metabolismo de GSH en 75 muestras de pacientes diagnosticados con TP en tratamiento con clozapina (CLZ). Como controles se utilizaron muestras de personas sin diagn6stico de TP; ni antecedentes de ellos en su familia.

Los niveles de GSH obtenidos en pacientes fueron de 4.2 uM y de 5.7 uM en controles mostrando una diferencia estad1sticamente significativa. Por otro lado se encontr6 un aumento en la actividad enzim1tica de (GPx) en pacientes con respecto a los controles (189.4 ± 98.2 uM/ml, 151.8 ± 44.5 uM/ml) respectivamente.

Las variantes de numero de repetidos en t1ndem de GCLC, fue genotipada mediante an1lisis de fragmentos por PCR fluorescente fue realizada una prueba de ANOVA y se encontr6 que el genotipo 7/8 repetidos present6 una disminuci6n en los niveles de GSH.

En relaci6n a la variante **GCLC_rs761142** no mostr6 diferencias estad1sticamente significativas entre los niveles plasm1ticos de GSH y los genotipos, sin embargo se

observó que el genotipo CC tenía una mayor incidencia en pacientes que presentaron reacciones adversas a medicamento (RAM) en este caso a CLZ. A diferencia de la variante **GCLC_ rs17883901** la cual no mostró diferencias significativas en niveles de GSH ni en RAM.

Después de analizar los resultados obtenidos se logró entender de una mejor manera la desregulación redox que se da en los TP, aunque sería importante complementar la información estudiando otras enzimas como lo son *GGT*, *CAT*, *GSSG*, por mencionar algunas.

De igual manera podría considerarse utilizar el GSH como un *biomarcador* para el diagnóstico y tratamiento de los TP. Así mismo las variantes de **GCLC** podrían ser útiles para determinar el origen del déficit de GSH e individuos en riesgo.

1.0 Marco Teórico

1.1 Trastornos psicóticos

Los trastornos se consideran alteraciones en el funcionamiento de un organismo o alguna parte de él. El término psicosis hace referencia a un trastorno mental, el cual se caracteriza por delirios, alucinaciones, pensamiento y comportamiento motor desorganizado donde se incluye la catatonia (APA, 2014).

Los delirios son definidos como una falsa idea, originada de una interpretación errónea de la situación, en cambio las alucinaciones se consideran una falsa percepción de los objetos o acontecimientos y son de naturaleza sensorial. El pensamiento desorganizado provoca que el sujeto cambie de un tema a otro sin explicación. En el caso del movimiento motor se pueden evidenciar problemas para llevar a cabo cualquier tipo de comportamiento dirigido a un objetivo, la catatonia se refiere a anormalidades motoras que se presentan en asociación con alteraciones en la conciencia, el pensamiento y el afecto, tiene como síntomas comunes el mutismo, negativismo extremo, adopción de posturas extrañas y perturbación del lenguaje (Crespo & Pérez, 2005).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) existe una gran variedad de trastornos psicóticos (TP), en la clasificación de los trastornos psicóticos primarios se encuentran la esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno de ideas delirantes, depresión y el trastorno bipolar ya que estos dos últimos también llegan a presentar síntomas psicóticos (Ortuño, 2011). Los TP primarios son asociados a causas orgánicas, mientras que los trastornos psicóticos secundarios se producen a partir del efecto de sustancias tóxicas, alcohol y fármacos, principalmente.

1.2 Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno mental que afecta a más de 21 millones de personas en el mundo (OMS, 2019). Su sintomatología suele variar entre cada paciente, es una enfermedad muy compleja ya que tiene un origen multifactorial donde destacan factores ambientales y genéticos, involucrando variantes de riesgo y de protección en cientos de genes (Aguilar-Valles, 2011).

Los síntomas de la esquizofrenia son clasificados como positivos, negativos y cognitivos. Los síntomas positivos involucran exceso de experiencias sensoriales o de comportamiento e incluyen las alucinaciones, delirios y comportamientos atípicos (Gejman et al., 2010). Síntomas negativos: disminución de comportamientos de afectividad, pérdida de interés y falta de motivación. Por último, en estos pacientes, se presenta un deterioro de los síntomas cognitivos, que van desde tareas simples como procesamiento de información sensorial hasta tareas mentales más complejas (Aguilar-Valles, 2011). El manual de diagnóstico y estadística de los trastornos mentales (DSM-5) establece que para diagnosticar la esquizofrenia, los síntomas positivos y negativos deben estar presentes por lo menos un mes, pero si las ideas delirantes son extrañas o consisten en una voz que relata los pensamientos o comportamientos del sujeto, o si dos voces conversan entre ellas, el diagnóstico es inmediato (APA, 2014).

1.2.1 Etiología de la esquizofrenia

Como se mencionó anteriormente la esquizofrenia tiene un origen multifactorial, entre los factores ambientales que incrementan el riesgo para padecer el trastorno se encuentra la exposición materna prenatal a ciertas condiciones infecciosas, como el virus de la influenza, toxoplasmosis, virus del herpes simple tipo 2 (Stephen et al., 2001), infecciones virales que afectan al sistema nervioso central e infecciones por citomegalovirus (Dalman, 2008) desnutrición durante el embarazo, consumo de tabaco, entre otras.

Respecto a los factores genéticos, se ha calculado que la heredabilidad de esta enfermedad es del 80%, esto, resultado de la combinación entre varios genes, cada uno con distinto nivel de efecto que actúan junto a procesos epigenéticos durante el desarrollo del sistema nervioso (*Harrison & Owen, 2003*) por lo que es considerada una enfermedad genéticamente heterogénea.

Actualmente los genes que tienen mayor importancia en la esquizofrenia son *DTNBP1*, *NRG1*, *DAAO*, *G72*, los cuales tienen un papel considerable en el desarrollo y correcto funcionamiento del sistema nervioso (*Pacheco & Raventós, 2004*).

1.2.2 Fisiopatología de la esquizofrenia

Los factores ambientales y genéticos no se encuentran de manera aislada, muchos de estos factores se suman entre sí y en algunos casos, los efectos que muestran son sinérgicos sobre el riesgo a padecer la enfermedad. Desde hace algún tiempo ya, los estudios en modelos animales han indicado que al menos alguno de estos factores y sus interacciones tienen efectos sobre el sistema dopaminérgico (*Oliver et al., 2009*).

La evidencia acumulada ha demostrado que la fisiología central de la esquizofrenia puede implicar disfunción en diferentes sistemas de neurotransmisión: dopaminérgico, glutamatérgico, serotoninérgico y gabaérgico, lo que conduce a un funcionamiento anormal de las interneuronas que se manifiesta como disfunción cognitiva, conductual y social a través del funcionamiento alterado de una amplia gama de macro- y microcircuitos.

La hipótesis dopaminérgica menciona que los síntomas negativos de la enfermedad se deben a una hipoactividad de la vía mesocortical, mientras que los síntomas positivos se relacionan con una hiperactividad dopaminérgica mesolímbica, consecuencia de la desregulación del mecanismo compensatorio de retroalimentación.

Uno de los neurotransmisores con acción excitadora con mayor presencia en el cerebro es el glutamato, el cual está mediado por los receptores ionotrópicos NMDA, ligados a canales iónicos, sus vías tienen unión a la corteza, sistema límbico y regiones del tálamo (*Yang & Tsai, 2017*). La hipofunción de estos receptores ha sido asociada con la neurotoxicidad, así como con génesis de los TP (*Gimenez, 2012*). Existe evidencia clínica de que al administrar co-agonistas de estos receptores a pacientes con esquizofrenia, estos mejoran en sus síntomas positivos, negativos y cognitivos.

La hipótesis dopaminérgica está relacionada con la glutamatérgica, ya que la liberación del glutamato se regula por receptores presinápticos tipo D2 de las vías corticoestriatales y corticolímbicas, por lo que las interacciones entre las vías dopaminérgica y glutamatérgica causa la elevación de los niveles de glutamato. Actualmente, se ha relacionado que la hipofunción de la actividad de los receptores NMDA puede ser la causa responsable de una situación hiperdopaminérgica, ya que se ha observado que el flujo de dopamina aumenta tras el tratamiento con agentes antagonistas NMDA (*Giménez, - 2012*).

En condiciones normales, la serotonina inhibe la liberación de dopamina a través de la hiperpolarización de los somas dopaminérgicos en la sustancia nigra con lo que bloquea la liberación dopaminérgica en el estriado y la corteza (*Graff-Guerrero, 2001*).

La hipótesis serotoninérgica menciona que al activarse los receptores 5HT_{2A} o al haber una hiperfunción de la serotonina, se libera glutamato y éste se proyecta al área tegmental ventral y se activa. Esto a su vez, puede activar la vía dopaminérgica mesolímbica como parte de una reacción en cadena que conduce a la psicosis causando alucinaciones auditivas y delirios paranoides (*Stahl, 2018*).

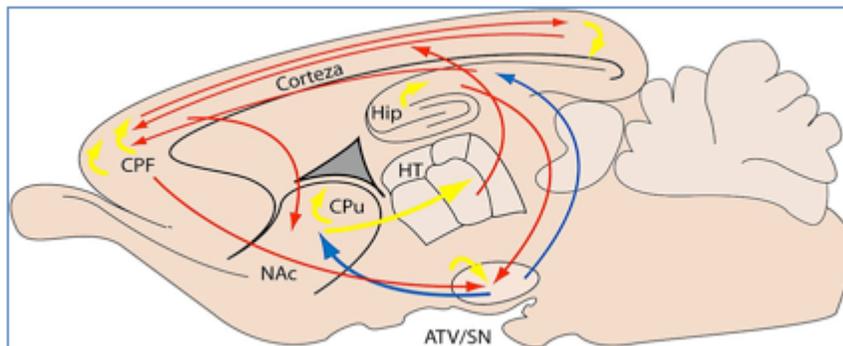


Figura 1. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata en el que se indican las principales vías de neurotransmisión involucradas en la psicosis. Líneas rojas, glutamatergicas; azules, dopaminérgicas; amarillas, gabaérgicas. ATV, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra; HT, hipotálamo; NAc, núcleo acumbens; Cpu, caudado putamen; CPF, corteza prefrontal; Hp, hipocampo. Recuperada de: Gimenez, 2012.

1.2 Trastorno bipolar

Este trastorno puede ser crónico, ocasional o con intervalos irregulares, generalmente ocasiona cambios extremos y fluctuantes en el estado de ánimo, niveles de energía, de actividad y de concentración. La mayoría de las ocasiones, el trastorno bipolar se presenta en los últimos años de la adolescencia o al iniciar la edad adulta (NIMH, 2018).

1.3.1 Síntomas del trastorno bipolar (TB)

Por lo regular los síntomas del TB, se dividen en episodios maniacos y episodios depresivos o hipomaniacos, también existen los episodios mixtos, donde se presentan ambos tipos de episodios. Regularmente estos episodios llegan a durar una o dos semanas, aunque pueden durar más tiempo.

En el DSM-5 se divide al trastorno bipolar en dos tipos: TBI y TBII, estos se diferencian por la gravedad de los episodios maniacos, en el caso del TBI son de una intensidad mayor, al mismo tiempo se puede presentar episodios hipomaniacos. En el caso del TBII, únicamente se presentan episodios hipomaniacos (*APA, 2014*)

1.4 Trastorno esquizoafectivo (TEA)

El trastorno esquizoafectivo (TEA) se ha considerado como una variante de la esquizofrenia y como un subtipo del trastorno bipolar, incluye alucinaciones o delirios y síntomas del trastorno del estado de ánimo como depresión o manía (*Miller, 2019*).

1.5 Psicosis interictal

La epilepsia se ha asociado con alteraciones de la conducta, del pensamiento y del humor. En diversos estudios, se ha notado una mayor prevalencia de trastornos psiquiátricos en pacientes con epilepsia en comparación con la población general, principalmente en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (*Krauskopf, 2013*). La presencia de episodios psicóticos en estos pacientes no es homogénea, por lo que es difícil establecer una explicación fisiopatológica única. En la práctica clínica se mencionan las psicosis postictales, periictales e interictales.

La psicosis interictal, se presenta como un estado psicótico crónico y aparece en los intervalos de tiempo comprendidos entre dos crisis epilépticas (*Rosello, 2018*).

1.6 Tratamiento antipsicótico

La presencia de los TP incluye alucinaciones, descontrol de conducta y alteraciones en el pensamiento. En un principio, la finalidad del tratamiento antipsicótico, era maximizar el restablecimiento funcional mediante la disminución de los síntomas positivos, es por eso que el primer grupo de antipsicóticos se desarrolló a partir de la hipótesis de la hiperactividad de la dopamina. Estos fármacos son conocidos como de primera generación o típicos y su mecanismo se basa en el antagonismo del receptor D2 a nivel límbico, aunque también tiene efectos a nivel estriatal, lo que produce disfunción extrapiramidal. Los antipsicóticos típicos no son tan eficaces en el tratamiento de los síntomas negativos. Además de que producen una gran cantidad de efectos secundarios como sedación, efectos anticolinérgicos, hipotensión ortostática y las de mayor importancia, son los efectos extrapiramidales, incluyendo reacciones distónicas, parkinsonismo, acatisia y discinesia tardía (*Flores-Rojas, 2019*). Entre los antipsicóticos típicos más comunes se encuentra el haloperidol, la clorpromazina, la flufenazina, la tioproperazina, la sulpirida, entre otros.

Los antipsicóticos atípicos o de segunda generación se diferencian del grupo anterior por no presentar efectos extrapiramidales, al parecer son más eficaces en el tratamiento de los síntomas negativos y generalmente se emplean en pacientes resistentes a los antipsicóticos típicos. Estas diferencias se deben a que existe un menor efecto dopaminérgico por los antipsicóticos de segunda generación. (*Ceruelo, García 2007*). Su mecanismo de acción también consiste en el antagonismo de los receptores D2, pero estos también son antagonistas de los receptores de serotonina 5-HT₂ (*Goodman & Gilman, 2011*).

A pesar de que los antipsicóticos atípicos presentan menores o casi nulos efectos extrapiramidales, estos causan otro tipo de efectos adversos como: efectos cardiovasculares, hiperprolactinemia y aumento de peso, que a su vez se relaciona con otras enfermedades como diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades coronarias, dislipidemias, entre otras (Garcia-Anaya, Apiquian, Fresán 2001).

Algunos antipsicóticos atípicos son: clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, sertindol y aripiprazol; la diferencia entre ellos, se basa en su afinidad por los receptores.

Es importante recordar que el antipsicótico, la dosis y la vía de administración van a depender del estado patológico, las interacciones farmacológicas con medicamentos concomitantes y la sensibilidad del paciente a los efectos adversos.

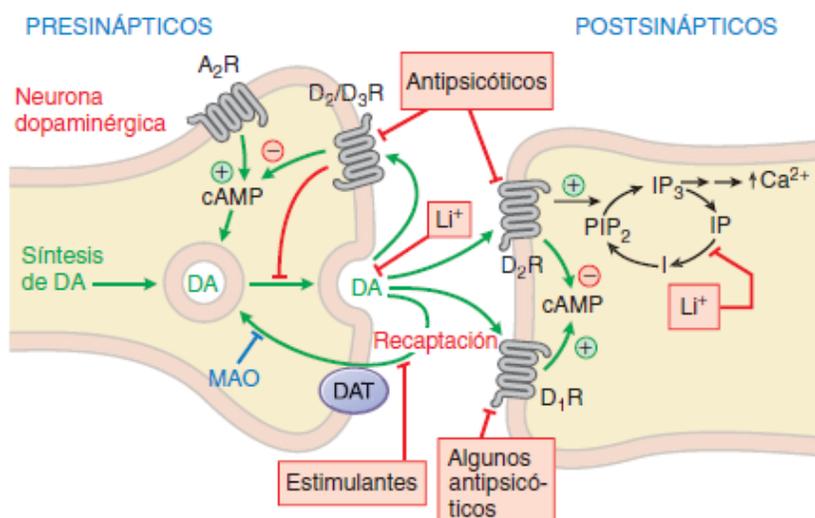


Figura 2.- Lugares de acción de los antipsicóticos. Recuperado de Goodman & Gilman, 2012.

1.6.1 Clozapina

Este fármaco fue sintetizado en 1958, es una dibenzodiazepina tricíclica. Su mecanismo de acción se basa en el antagonismo de los receptores D2 en la vía mesolímbica y los receptores 5-HT2A en la corteza frontal. Se ha observado que el antagonismo D2 alivia los síntomas positivos mientras que el antagonismo 5-HT2A alivia los síntomas negativos (*Arinhieri, 2018*).

La CLZ se absorbe después de una administración oral, sufre metabolismo de primer paso, por lo que solo del 25 al 50% alcanza la circulación sistémica, las concentraciones plasmáticas de este fármaco varían ya que son dependientes de factores como el tabaquismo, absorción gástrica, edad, género y metabolismo hepático (*Jamm et al., 1993*). Se metaboliza a través de las enzimas microsomales hepáticas CYP1A2 y CYP3A4 (Fig. 3); tiene dos principales metabolitos: N-óxido de clozapina y N-desmetil-clozapina (norclozapina) que es farmacológicamente activo (*García et al., 2017*). Tiene una vida media de 4 - 12 horas y la ruta de eliminación de este fármaco es principalmente por orina (50%), el resto se elimina por hece.

A pesar de que la CLZ tiene una gran eficacia, este fármaco no es utilizado como primera opción, ya que se han presentado reacciones adversas como agranulocitosis y granulocitopenia, que pueden llegar a ser letales (*Saito et al. 2016*), otras reacciones adversas asociadas al uso de la CLZ, son: ganancia de peso, enfermedades cardiovasculares, eosinofilia, convulsiones, miocarditis, hipotensión ortostática, taquicardia, obstrucción intestinal, náuseas, pancreatitis, enuresis, entre otros. Por esta razón la CLZ se utiliza como tratamiento en pacientes que no han respondido a dos antipsicóticos diferentes previos, además de esto los pacientes requieren de un monitoreo estrecho de su cuenta de neutrófilos y en caso de ser necesario, suspender el tratamiento.

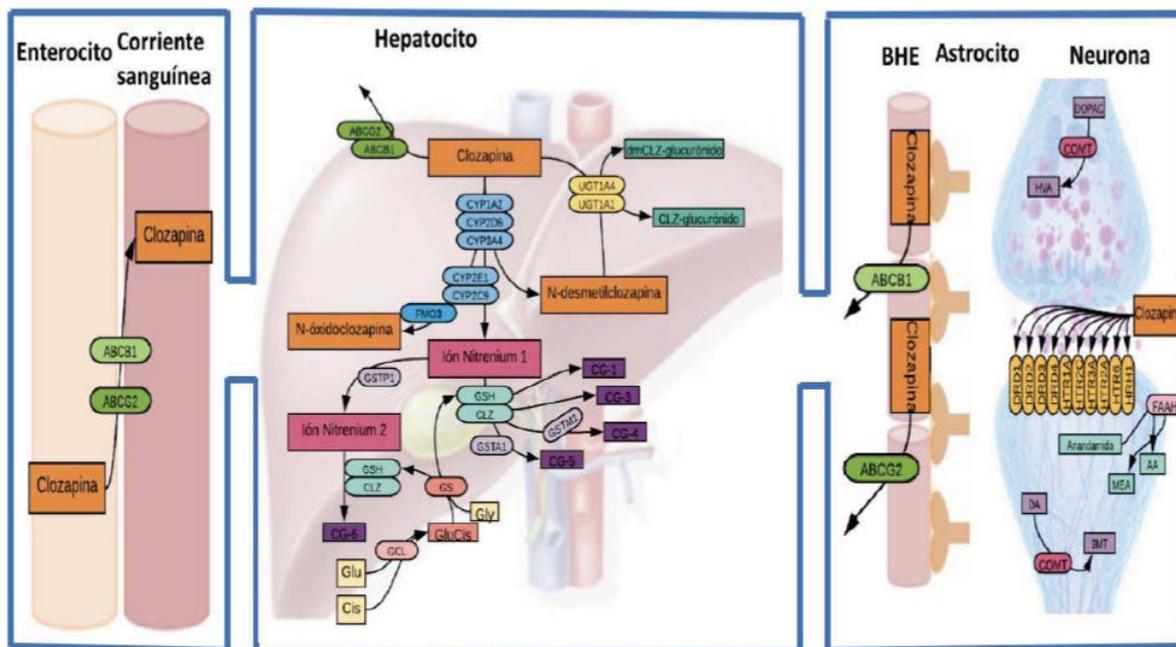


Figura 3. Transporte, metabolismo y señalización de CLZ. Glu=Glutamato; Cis=Cisteína; Gly=Glicina; GCL=Cisteína-glutamato-ligasa; GluCis=gamma-glutamil cisteína; GS= Glutación sintetasa; GSH=Glutati6n; CG= conjugados de clozapina; GST= Glutati6n S-transferasa; FMO=Monooxigenasa que contiene flavina; CYP= citocromo p450; ABC=subfamilia de *cassettes* de uni6n a ATP; UGT= Uridi6n-difosfato-glucuronosiltransferasa; dmCLZ= N-desmetilclozapina ; CLZ=Clozapina; COMT= Catecol-O-metiltransferasa; DOPAC= Acido 3,4-dihidroxi6nifenilac6tico; HVA= 6cido homovanilico; DA= Dopamina; 3MT= 3-Metoxitiramina; FAAH= 6cido graso amida hidrolasa; AA=6cido araquid6nico; MEA= etanol amida; DRD= Receptor de dopamina; HTR= receptor de serotonina; HRH= receptor de histamina; BHE= barrera hemato-encef6lica. Manuscrito en preparaci6n, (Motilla-Frías,2019).

1.7 Estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas inestables y altamente reactivas que tienen un electrón libre, suelen combinarse inespecíficamente y tienen un tiempo de vida corta. Se forman principalmente por la unión de un electrón a una molécula más estable (*Avello, 2005*).

Los radicales libres forman parte de las llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO); las cuales son moléculas derivadas del O_2 como el H_2O_2 , ión OH, los superóxidos, entre otros. Estos se producen cuando el O_2 se reduce con dos electrones, y esto ocurre por dos vías: de forma endógena, a consecuencia del metabolismo principalmente del oxígeno, o de forma exógena, por contaminantes ambientales, radiaciones, consumo o uso de tóxicos como alcohol, tabaco y drogas, o por una alimentación inadecuada (*Carrillo, 2015*). Las ERO tienen diferentes funciones fisiológicas, son necesarias para la producción de energía, síntesis de compuestos, fagocitosis, transducción de señales, sin embargo, al mismo tiempo pueden llegar a ser tóxicos y desencadenar apoptosis o necrosis (*Carrillo, 2015*).

Por otro lado, los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de contrarrestar la acción oxidante de los radicales libres, mediante la liberación de electrones. En el organismo, existen antioxidantes endógenos y exógenos que se encargan de limitar la producción y la actividad de ERO. Los antioxidantes endógenos más importantes son: enzimas super-óxido dismutasas, SOD, encargadas de transformar el radical superóxido en peróxido de hidrógeno; enzima catalasa, CAT, la cual descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; y por último la enzima glutatión peroxidasa (Gpx) que oxida el glutatión y el peróxido de hidrógeno (*Pupo, 2017*). Como antioxidantes exógenos se encuentran: las vitaminas A, C y E; los polifenoles, la melatonina, carotenoides y metales como el zinc, el cobre y el selenio.

Cuando hay una disminución de los niveles de las defensas antioxidantes celulares o un aumento de la velocidad de producción de las ERO, se rompe el equilibrio, se genera el estrés oxidativo, que daña ácidos nucleicos, lípidos y

proteínas. El estrés oxidativo se encuentra presente en estados patológicos donde hay alteración de funcionalidad celular, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas como cáncer, aterosclerosis, cardiomiopatías y enfermedades neurológicas (Avello, 2006).

1.7.1 El estrés oxidativo y los trastornos psicóticos

El sistema nervioso central (SNC) consume grandes cantidades de oxígeno para llevar a cabo los procesos fisiológicos, esto conduce a una elevada producción de radicales libres. Existen distintos factores que hacen que el SNC sea susceptible a un aumento de radicales libres como lo es: la alta composición de ácidos grasos poliinsaturados, el déficit de mecanismos antioxidantes y la selectividad de la barrera hematoencefálica que reduce la difusión de algunos antioxidantes como la vitamina E (Serra, 2016).

En diversos estudios se han demostrado asociaciones entre el estrés oxidativo y los TP, y se ha propuesto que la presencia de variantes alélicas de riesgo en genes que codifican para enzimas involucradas en el sistema antioxidante favorece el desarrollo de los TP. Por ejemplo, existen estudios donde se demuestra la asociación de variantes genéticas de riesgo de la enzima glutatión cisteína ligasa (GCL) y de las glutatión-S-transferasas, estas proteínas están involucradas en la síntesis del glutatión.

Tanto la regulación a la baja de los componentes de la vía de síntesis antioxidante como el aumento en los niveles de ROS se han observado relacionados en pacientes con TP (Mass, 2017).

1.8 Glutación

El glutación es un tripéptido de bajo peso molecular, formados por glutamato, glicina y cisteína, es el principal antioxidante endógeno implicado en reacciones redox, este tripéptido puede presentarse en dos formas: oxidada o también llamada disulfuro de glutación (GSSG) y su forma reducida, nombrada glutación (GSH) que se llega a presentar hasta en un 90% del glutación total en células y tejidos sanos. La relación GSH/GSSG a menudo es utilizado como indicador del estado oxidativo de la célula y de la toxicidad celular, se dice que cuanto mayor es la cantidad de GSH, menor es la toxicidad celular (*Martínez-Espinoza 2019*).

En la mayoría de las células el glutación se sintetiza *de novo* a través de dos reacciones dependientes de ATP, en la primera reacción se condensa el grupo carboxilo del glutamato con el grupo amino de la cisteína; esta reacción es catalizada por la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL) en donde se forma gamma-glutamilcisteína. En una segunda reacción se adiciona la glicina mediante la intervención de la enzima glutación sintetasa (*Lu, 2013*).

La principal reserva de GSH en células eucariotas se encuentra en el citosol en un porcentaje del 80 al 85%, mitocondrial de un 10-15% y un pequeño porcentaje más, se ubica en el retículo endoplásmico.

El GSH se caracteriza por tener un grupo sulfhidrilo (-SH) en el aminoácido cisteína; este grupo tiene como característica que puede oxidarse y reducirse de manera reversible, lo que permite mantener el equilibrio redox (*Ortega-Herrero 2015*). La actividad antioxidante de este tripéptido se da mediante dos mecanismos: enzimático y no enzimático, en el primero la enzima glutación peroxidasa cataliza la reacción de oxidación de GSH a GSSG utilizando para ello peróxido de hidrógeno que evita los efectos degradantes de los peróxidos. En el mecanismo no enzimático, el GSH neutraliza moléculas formando aductos con radicales OH y el NO. Una vez que el glutación neutraliza las moléculas oxidantes se obtiene (GSSG), el cual es incapaz de reaccionar con ROS, por lo que se necesita la función de la enzima

glutación reductasa (GR), la cual es la encargada de recibir electrones provenientes del NADPH y cederlos al GSSG para obtener de nuevo la forma reducida (GSH).

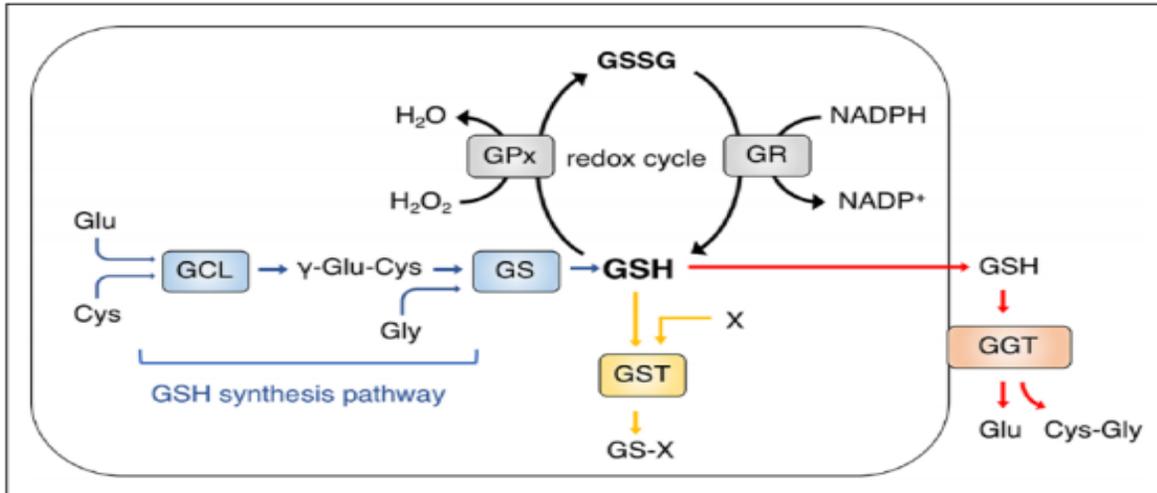


Figura 4 Síntesis y metabolismo del glutación. Como primer paso de la síntesis el glutamato (Glu) se combina con cisteína (Cys) para formar γ -glutamilcisteína por la glutamato-cisteína ligasa (GCL). A continuación, la GSH sintetasa (GS) combina este dipéptido con glicina (Gly) para producir GSH. El GSH se utiliza como cofactor para reducir el peróxido de hidrógeno por acción de la enzima glutación peroxidasa (GPx), produciendo el disulfuro de glutación (GSSG). Entonces, GSSG se reduce a GSH por la glutación reductasa (GR) usando NADPH. Estos pasos forman un ciclo redox. Las enzimas glutación S-Transferasas (GST) desintoxican de los peróxidos y productos de peroxidación lipídica que contienen grupo carbonilo usando GSH. Después de que el GSH es liberado de la célula, la ectoenzima GGT degrada el glutación. Tomada de: Tsugawa *et. al*, 2019

1.8.1 Glutación en el Cerebro

A comparación de otros órganos, el cerebro tiene mayor susceptibilidad al daño oxidativo, ya que cuenta con la presencia de abundantes ácidos grasos insaturados, que son blanco de la peroxidación lipídica. Este órgano tiene una baja o moderada actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa, y la presencia de grandes concentraciones de hierro que favorecen la formación de ROS, además de que el cerebro consume una gran cantidad de oxígeno (*Fuentes Lugo, 2019*).

En el cerebro, los astrocitos aportan a las neuronas los precursores necesarios para la síntesis de GSH. Se ha observado que el GSH es previamente sintetizado en los astrocitos y liberado de éstos, después de eso es hidrolizado por una ectoenzima conocida como γ -glutamyltranspeptidasa (γ GT), localizada en la membrana plasmática de los astrocitos. En esta reacción se produce el dipéptido cisteín-glicina (CysGly) y γ -Glu. El CysGly es disociado por una ectopeptidasa localizada en las neuronas generando cisteína y glicina que son capturados de manera independiente por las neuronas y utilizados para volver a sintetizar GSH (*García, Massieu 2004*). La glutamina liberada de los astrocitos es usada por las neuronas como un precursor del glutamato necesario como neurotransmisor y para la síntesis de GSH (*Diaz-Hung 2015*).

1.8.2 GCLC

La Glutamato-Cisteína Ligasa, es la primera enzima limitante de la síntesis de glutación. Tiene dos subunidades: moduladora (GCLM) y catalítica (**GCLC**) (*Gysin et al. 2007*). Diversos estudios han mostrado que las variantes de un solo nucleótido (SNV) en el gen **GCLC**, pueden tener diversas consecuencias funcionales (*Checa*

et al., 2007). Se ha visto que pacientes con la variante intrónica rs761142 : chr6-53527310-A-C, se asocian con hipersensibilidad inducida por fármacos como el sulfametoxasol (*Wang et al.*, 2012) también se encuentra la variante rs17883901 chr6-53545239-G-A que se ha encontrado involucrada en fallas del metabolismo del glutatión en enfermedades como diabetes, esteatohepatitis e infarto al miocardio (*Vieira et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que existe una asociación entre la esquizofrenia y una variante de repetidos trinucleótidos GAG (TNR) en la subunidad catalítica, donde el número de repetidos afecta los niveles de GSH (*Xin et al.*, 2016). Se dice que los genotipos 7/8 ,8/8, 8/9 y 9/9 son más frecuentes en pacientes que en controles, por lo que son considerados “genotipos de alto riesgo” en cambio los genotipos 7/7 y 7/9 se presentan con mayor frecuencia en individuos sanos, por lo que se consideran “genotipos de bajo riesgo” (*Gysin et al.*, 2011)

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar si existe una correlación entre las variantes del gen **GCLC** y los niveles de glutatión plasmático para identificar genotipos de riesgo en trastornos psicóticos primarios bajo tratamiento con clozapina

2.2 Objetivos particulares

Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes rs761142: y rs17883901 de **GCLC** en pacientes controles mediante PCR en tiempo real

Determinar los niveles de GSH plasmático mediante espectrofotometría de fluorescencia

Determinar los niveles de Gpx mediante espectrofotometría UV

Correlacionar los niveles plasmáticos de GSH con los genotipos de **GCLC** en pacientes y controles

Realizar análisis multivariado de los niveles plasmáticos de GSH y Gpx con los genotipos de **GCLC** y las características clínicas de los pacientes con TP bajo tratamiento de CLZ

3.0 Hipótesis

Se sabe que los niveles de glutatión en plasma son menores en pacientes con TP que en controles y que se asocia con estrés oxidativo. Algunas variantes del gen **GCLC** podrían explicar los niveles bajos de GSH en pacientes con TP, esto, a su vez, podría estar relacionado con una mayor incidencia de reacciones adversas debidas a la CLZ.

4.0 Metodología

4.1 Sujetos y métodos

Siguiendo los requerimientos éticos internacionales, el protocolo de investigación #104/17 fue aprobado por los Comités de Investigación y de Bioética del INNNMVS. Así mismo, a todos los participantes se les explicó en qué consistía el protocolo y firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo A).

4.2 Pacientes

Se estudiaron 75 pacientes diagnosticados con TP, tratados con CLZ. Los pacientes que decidieron participar voluntariamente en el protocolo, se reclutaron en la consulta externa del INNNMVS. Las valoraciones clínicas fueron realizadas por médicos psiquiatras del INNNMVS.

4.2.1 Criterios de Inclusión

Pacientes de población mestiza-mexicana (MM), mayores de edad, bajo tratamiento con CLZ, con diagnóstico clínico de ESQ, psicosis interictal, TE o TB, que aceptaron participar voluntariamente en el estudio y hayan firmado la carta de consentimiento informado.

4.2.3 Criterios de exclusión

Pacientes de nacionalidad extranjera, pacientes con TP que no tengan tratamiento con CLZ o pacientes que no hayan aceptado participar y/o firmado la carta de consentimiento informado.

4.3 Controles

Se incluyeron 40 personas MM, las cuales no presentaban ningún TP o enfermedad neurodegenerativa, ni antecedentes de ellos en su familia. Todos los controles firmaron una carta de consentimiento informado para el banco de DNA del Departamento de Genética, INNNMVS (Anexo A).

4.4 Toma de muestra biológica

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción venosa, las cuales se recolectaron en tubos *Vacutainer* de 5ml con citrato de sodio (22mg/ml) como anticoagulante. Para la determinación del GSH y GPx se utilizaron tubos con EDTA.

4.5 Tratamiento de la muestra

4.5.1 Muestra Sanguínea

La muestra sanguínea fue centrifugada a 3000 rpm durante 6 minutos a una temperatura de 4°C, la capa leucocitaria y el plasma fueron separados y almacenados a -80°C hasta su uso.

4.5.2 Extracción de DNA por metodología de sales modificada

Se siguió la técnica de (Gaaib, Nassief y AL-Assdi 2011)

- i. En un tubo cónico de 15 ml se añadió sangre y amortiguador de lisis de glóbulos rojos (BLGR: NH_4Cl [0.155mM], $KHCO_3$ [10mM] y $EDTA$ [0.1mM, pH = 7.4]) en una proporción 1:3 v/v. La mezcla se agitó hasta lisar los glóbulos rojos, se centrifugó por 6 minutos a 3000rpm.
- ii. Se desechó el sobrenadante y al botón de células blancas se le agregó 1ml de BLGR adicional, se transfirió a un tubo de 1.5ml y se centrifugó durante 2 minutos a 3000 rpm.
- iii. Se realizaron dos lavados adicionales siguiendo el procedimiento del paso anterior para eliminar el mayor contenido posible de glóbulos rojos.
- iv. Al botón limpio se le agregaron 570µl de $NaCl$ [5mM], se agitó durante 2 minutos, posteriormente se adicionaron 40µl de dodecil-sulfato de sodio

(SDS) al 10%; lo que genera la ruptura de la membrana celular, seguido de esto se adicionaron 200µl de *NaCl* [7M] y esta mezcla se agitó durante 10 minutos para precipitar las proteína, la mezcla fue centrifugada a 11500 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C.

- v. Se recolectó el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml, a este se le agregaron 600µl de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1 v/v) se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, esto para realizar la extracción orgánica de componentes celulares no polares.
- vi. La fase acuosa fue transferida a un tubo de 1.5ml y se le añadió 1 ml de etanol absoluto a 4°C, se centrifugó a 14 000rpm durante 15 min para precipitar el DNA y separar las sales remanentes, se desechó el sobrenadante y al botón obtenido se le agregó 1ml de etanol al 70% v/v y se centrifugó a 14 000 durante 15min.
- vii. El sobrenadante fue descartado y la muestra fue secada por centrifugación al vacío, se agregaron 200 µl de agua inyectable para su rehidratación.
- viii. Las muestras se cuantificaron mediante espectrofotometría con el equipo *Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos)*.

4.5.2 Precipitación de proteínas en plasma para cuantificación de glutatión reducido

- I. En un tubo ámbar de 2ml se realizó una dilución 1:1 de plasma con ácido tricloroacético (*TCA*) al 10% p/v. Se mezcló con *vórtex* y se dejó reposar en hielo por 10 minutos.
- II. La muestra se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.
- III. El sobrenadante se transfirió a un tubo ámbar de 600 µl, se mantuvo a -80°C durante un día y el “botón” (*pellet*) de proteínas fue descartado.

4.6 Cuantificación de glutatión reducido (GSH)

- I. Para la cuantificación de Glutatión se prepararon los siguientes reactivos:
Amortiguador de fosfatos 0.1M + EDTA 5mM, ortoftaldehido (OPA) 1 mg /ml y GSH 5µg/ml (solución de trabajo)
- II. Se preparó una curva de GSH en tubos de 2 ml ámbar como se muestra en la Tabla 1

Tabla 1. Preparación de curva de GSH.

TUBO	GSH (solución de trabajo µl)	Amortiguador (µl)	Concentración (µl)
Blanco	0	1000	0
1	120	880	0.975
2	240	760	1.95
3	480	520	3.9
4	960	40	7.8

- III. En una placa protegida de la luz se agregó a cada uno de los pozos 122.7µl de amortiguador, 13.6 µl de cada uno de los puntos de la curva o plasma sin proteínas, cada una de las muestras se realizó por duplicado
- IV. Se agregaron 13.6 µl de OPA, la reacción se mezcló y la placa fue incubada por 15 minutos a temperatura ambiente
- V. La placa fue leída mediante fluorometría a una longitud de onda de excitación de 350 nm, longitud de onda de emisión de 420 nm y a una sensibilidad de 90 en el equipo FLX800 (BioTek™, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

4.7 Cuantificación de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en plasma

- I. Se prepararon los siguientes reactivos: Amortiguador (Na_2HPO_4 0.4 M + EDTA sódico 5mM), NaN_3 0.01M, citrato trisódico 1%, Reactivo de Ellman (DNTB 40mg en 100 ml de citrato tribásico 1%), H_2O_2 1.25 mM, GSH 2mM y GSH 1mg/ml
- II. Se preparó una curva de GSH en tubos ámbar de 2 ml como se muestra en la Tabla 2

Tabla 2. Preparación de la curva de GPx

Tubo	Concentración (µl/ml)	Amortiguador (µl)	GSH (1 mg/ml)	NaN_3 (µl)	GSH 2mM (µl)	H_2O (µl)
1	15	250	22.5	125	250	852.5
2	30	250	45	125	250	830
3	60	250	90	125	250	785
4	120	250	180	125	250	695
5	240	250	360	125	250	515
6	480	250	720	125	250	155

- III. En tubos ámbar de 2ml se agregaron 50µl de plasma sin proteínas, 250 µl de amortiguador, 250µl de GSH [2mM], 125µl de NaN_3 y 812.5 µl de H_2O . Estos tubos con muestras y la curva se llevaron a un baño de agua a 37°C con agitación durante 5 minutos.
- IV. Al terminar el tiempo de incubación se agregaron 250 µl de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) previamente incubado a las mismas condiciones y se mezcló suavemente con vórtex.

- V. En el caso de las muestras, se tomaron alícuotas de 250 μ l y se mezclaron con 250 μ l de amortiguador, cada muestra se realizó por duplicado. De igual forma se tomaron 250 μ l de alícuota de cada punto de la curva y se agregó 1ml de amortiguador, cada alícuota también se realizó por duplicado.
- VI. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 30 min a una temperatura de 4°C; mientras los tubos con la curva se mantuvieron en hielo.
- VII. En una placa de 96 pozos, se agregaron 50 μ l/pozo de sobrenadante de cada duplicado de la curva y 50 μ l de amortiguador, en el caso de las muestras se agregaron las mismas proporciones.
- VIII. A cada pozo, se adicionaron 25 μ l de reactivo de Ellman para iniciar la reacción, esto se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.
- IX. La placa fue leída mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 412 nm en un equipo FLX800 (BioTek™, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

4.8 Análisis de Fragmentos para repetidos GAG del gen *GCLC* mediante PCR fluorescente

Se realizó una PCR para amplificar la región de repetidos del trinucleótido GAG del gen ***GCLC*** que codifica para la subunidad catalítica de la enzima γ -glutamin cisteín-ligasa. Los detalles de reacción se muestran en las tablas 3 - 5:

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para análisis de repetidos GAG de GCLC

Oligonucleótido	Secuencia 5´-3´	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de fusión, Tm (°C)
GCLC-F	/6-FAM/CGG CTG AGT GTC CTC GC	220	62.9
GCLC-R	CCA CTT GAG AAC GTC CTT GTG CCG G		63.7

F: hebra sentido (*forward*); R: hebra antisentido (*reverse*); pb: pares de bases.

Tabla 4. Reactivo y volúmenes para PCR fluorescente de GCLC

Reactivo	Volumen (µl)
Mezcla de reacción para PCR <i>Taq Master Mix (Qiagen)</i>	9.0
Oligonucleótido F (10 uM)	1.0
Oligonucleótido R (10 uM)	1.0
H ₂ O libre de nucleasas	2.8
DNA (50 ng/µl)	1.2

Tabla 5. Condiciones para PCR fluorescente de *GCLC*

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización	94	180
35 ciclos:		
Desnaturalización	94	30
Hibridación	63	45
Elongación	72	60
Elongación final	72	600

4.8.1 Electroforesis capilar

Se realizó en equipos AB3500 y AB3130 (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*). Para ello, se utilizó 1 µl de reacción de PCR, 0.5 µl de estándar de tamaños LIZ 500 y 8.5 µl de formamida. Esta mezcla de reacción se desnaturalizó a 95°C y se llevó inmediatamente a 4°C. Las condiciones de la electroforesis fueron: voltaje de inyección 1.2kV, tiempo de inyección 8s, voltaje de corrida 15kV, tiempo de corrida 2000s. Los datos crudos se visualizaron con el programa *Peak scanner* de *ThermoFisher* (<https://apps.thermofisher.com>)

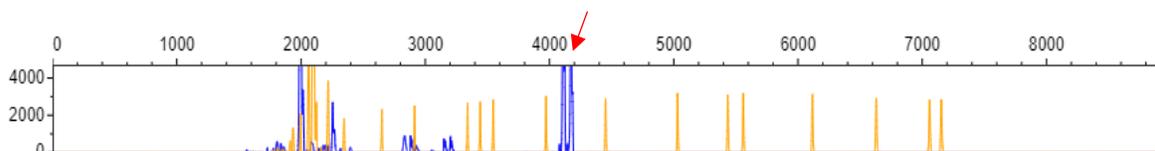


Figura 5. Análisis de Fragmentos para repetidos GAG de *GCLC*. Imagen representativa de resultados crudos obtenidos por electroforesis capilar para la variante de repetidos GAG de *GCLC*; en donde se muestra un genotipo heterocigoto 7/9 en color azul (señalado por flecha roja), y en color naranja se aprecia el estándar de tamaños LIZ 500. Eje Y en unidades arbitrarias de emisión de fluorescencia.

4.9 Genotipificación de las variantes rs761142 y rs17883901 de *GCLC* por PCR en tiempo real

Para la genotipificación de las variantes rs761142: chr6-53527310-A-C; c.151-4783T>G>A y rs17883901 chr6-53545239-G-A; c.-594C>T>A (región promotora) del gen ***GCLC***, se realizó PCR en tiempo real en el equipo *StepOne™* de *Applied Biosystems®* (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) en la que se utilizaron los volúmenes de reacción de la tabla 6.

Tabla 6. Reacción de PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (µl)
Mezcla para PCR <i>Probe fast ABI Prism qPCR kit</i> (<i>Kapa biosystems</i>)	2.5
Par de oligonucleótidos (10 µM) y sonda de interés (5 µM)	0.125
<i>H₂O</i> libre de nucleasas	1.375
DNA (25 ng/µl)	1.0

Los resultados se analizaron con el programa *StepOne™ Software v2.0.2®* (*ThermoFisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Un ejemplo de los resultados obtenidos por esta técnica, se muestra en la figura 6.

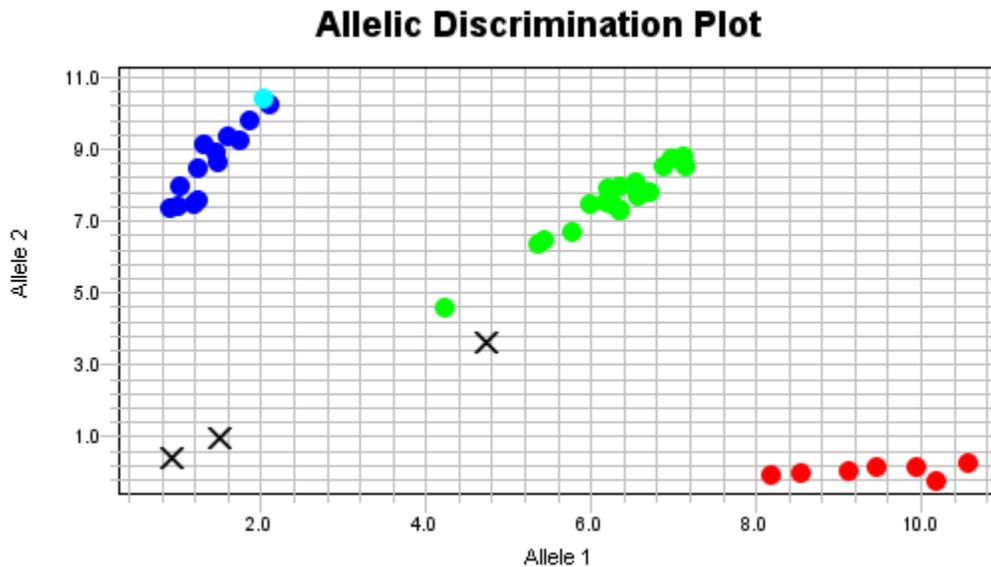


Figura 6. Gráfica polar para discriminación alélica de la variante rs761142: chr6-53527310-A-C por PCR en tiempo real. En color azul se observan las muestras que presentan el genotipo homocigoto A/A; en color verde aparecen las muestras que presentan el genotipo heterocigoto A/C; en color rojo las muestras que presentan el genotipo homocigoto C/C, y por último, en color negro se observan los controles negativos.

5.0 Resultados

5.1 Niveles plasmáticos de glutatión (GSH)

Se estudiaron 75 pacientes con diagnóstico de TP bajo tratamiento con CLZ con una media de edad de 37 (SD= 12.4) y 40 controles con media de edad de 29 (SD= 7.5) años. Los niveles de glutatión plasmático en el grupo de pacientes fueron $4.2 \pm 1.83 \mu\text{M}$ mientras que en el grupo de los controles resultó de $5.7 \pm 1.44 \mu\text{M}$, con lo que se encontró una diferencia estadísticamente significativa (Fig. 7)

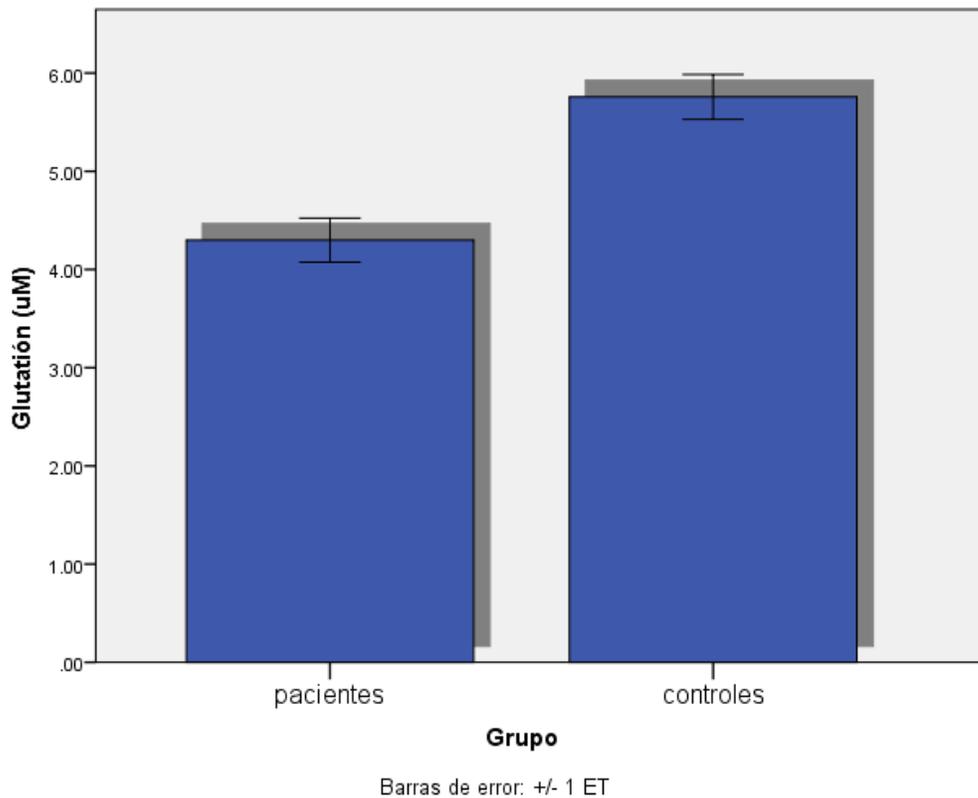


Figura 7.- Niveles plasmáticos de GSH en pacientes con TP y controles. Se muestran diferencias significativas al aplicar la prueba t, $p= 0.001$ (IC_{95%} -3.13 -0.78).

Se realizó una correlación entre los niveles de GSH y la edad de los individuos, los resultados no fueron estadísticamente significativos, sin embargo, como se muestra en la Fig. 8 existe una tendencia donde a mayor edad, hay una disminución de los niveles plasmáticos de GSH. Del mismo modo, se compararon niveles de GSH por género, pero tampoco se encontraron resultados estadísticamente significativos entre niveles de GSH de hombres y mujeres (datos no mostrados).

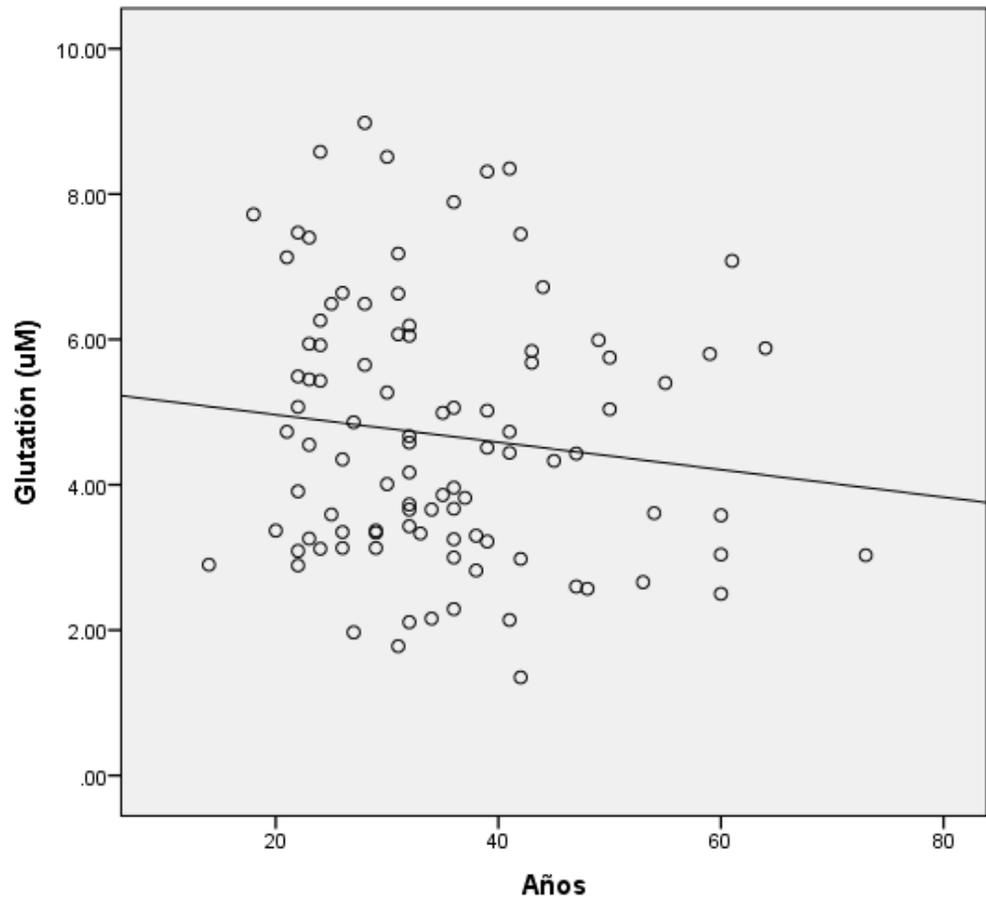


Figura 8.- correlación entre los niveles plasmáticos de GSH y la edad de los pacientes.
 La correlación de Spearman fue $r = -0.015$. $p = 0.149$ $N = 75$

5.3 Resultados de la enzima glutación peroxidasa (GPx)

Al comparar los valores de las medias entre la actividad de GPx en pacientes (189.4 ± 98.2 uM/ml) y los controles (151.8 ± 44.5 uM/ml), se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 9).

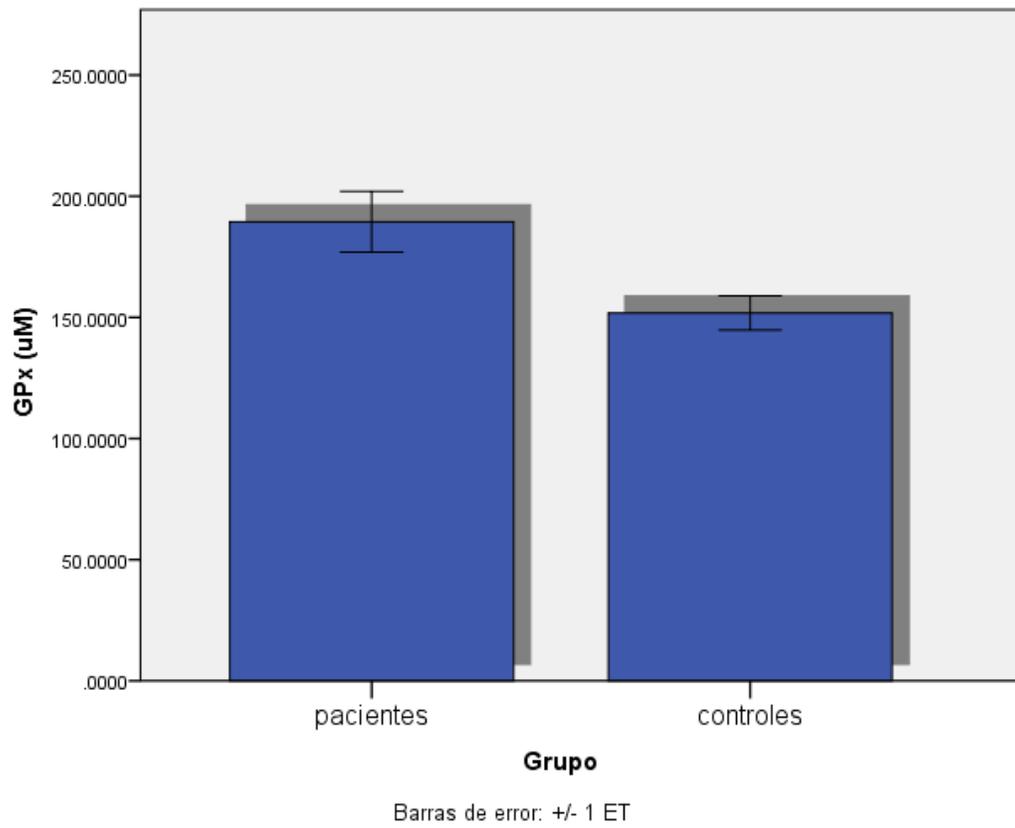


Figura 9.- Niveles plasmáticos de GPx en pacientes con TP y controles. Prueba T, $p=0.025$ (IC_{95%}= 4.7- 70.4%)

5. 4 Número de repetidos GAG en la unidad catalítica del gen *GCLC* de la enzima glutamato cisteín-ligasa

Tabla 7. Distribución de número de repetidos GAG de *GCLC*

Genotipo	7/7	7/8	7/9	9/9	TOTAL
Pacientes	13 17%	14 18%	35 49%	13 16%	75 100%
controles	13 32%	8 20%	2 5%	17 43%	40 100%

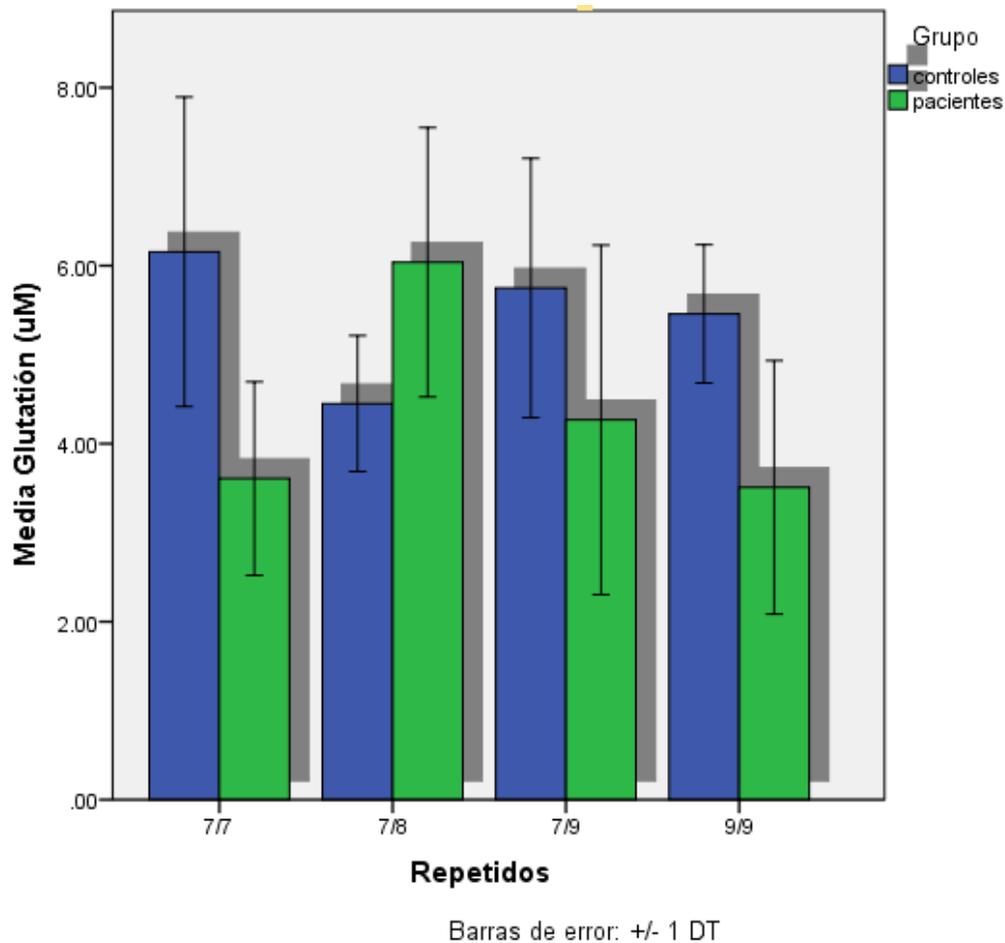


Figura 10.- Niveles de GSH según el genotipo de los repetidos GAG de GCLC. De color azul se muestran los niveles de GSH de pacientes, mientras que de color verde se observan los niveles de GSH en controles.

Por otra parte, se realizó una prueba de ANOVA de una vía, post hoc Tuckey para evaluar las diferencias entre los genotipos de los repetidos GAG de **GCLC** y niveles de glutatión, en donde no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos de controles (datos no mostrados) Sin embargo, en los pacientes se encontró una relación entre la disminución en los niveles de GSH con el genotipo 7/8 (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación entre los niveles de GSH y los genotipos de los repetidos GAG del gen GCLC en pacientes.

Genotipo	Genotipo	p	IC 95%	
			Límite inferior	Límite superior
7/7	7/8	.008	-4.37	-0.48
	7/9	.707	-2.028	0.96
	9/9	.999	-1.77	1.96
7/8	7/7	.008	0.48	4.37
	7/9	.021	0.20	3.33
	9/9	.003	0.70	4.35
7/9	7/7	.707	-0.96	2.28
	7/8	.021	-3.33	-0.20
	9/9	.530	-0.71	2.23
9/9	7/7	.999	-1.96	1.77
	7/8	.003	-4.35	-0.70
	7/9	.530	-2.23	0.7173

Prueba de Tukey. IC, intervalo de confianza

Para evaluar la asociación entre los genotipos de los repetidos GAG del gen **GCLC** y las RAM de clozapina se realizó una prueba de Chi-cuadrada, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

5.5 Resultados de la variante genética del gen *GCLC*

Tabla 9 Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs761142 en pacientes

Genotipo	n	Frecuencia genotípica observada	Frecuencia Alélica	Frecuencia genotípica esperada	n
AA	5	0.07	0.34	0.11	8
AC	35	0.49		0.44	32
CC	31	0.43	0.660	0.43	31

$X^2= 1.40$; $gl=1$ $\alpha=0.05$. Las frecuencias estuvieron en equilibrio Hardy- Weinberg

Tabla 10 Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs761142 en controles

Genotipo	n	Frecuencia genotípica observada	Frecuencia Alélica	Frecuencia genotípica esperada	n
AA	12	0.3	0.5	0.25	10
AC	18	0.45		0.5	20
CC	10	0.25	0.5	0.25	10

$X^2= 0.6$. $gl=1$ $\alpha=0.05$. Las frecuencias estuvieron en equilibrio Hardy- Weinberg

El análisis de varianza para la variante intrónica rs761142: chr6-53527310-A-C no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los niveles plasmáticos de glutatión y los genotipos, pero al evaluar las RAM, el genotipo CC se presentó en mayor porcentaje en pacientes con RAM totales (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de pacientes con TP que presentan RAM para clozapina y su asociación con la variante genética rs761142 de GCLC

RAM	rs761142			Total
	AA	AC	CC	
SI	0%	52.9%	75%	58%
NO	100%	47.1%	25%	42%
Total	100%	100%	100%	100%

Resultados prueba chi-cuadrada $X^2= 9.95$; $p=0.019$ para genotipo CC. RAM, reacción adversa a clozapina.

5.6 Resultados de la variante rs17883901 del gen *GCLC*

Tabla 12. Frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs17883901 de pacientes

Genotipo	n	Frecuencia genotípica observada	Frecuencia Alélica	Frecuencia genotípica esperada	n
GG	63	0.88	0.94	0.88	63
GA	8	0.11		0.10	8
AA	0	0.0	0.05	0.0003	0

$\chi^2 = 0$ gl=1 $\alpha=0.05$. Las frecuencias estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 13. Frecuencia alélicas y genotípica para la variante rs17883901 de controles

Genotipo	n	Frecuencia genotípica observada	Frecuencia Alélica	Frecuencia genotípica esperada	n
GG	37	0.92	0.961	0.92	37
GA	3	0.075		0.073	3

AA	0	0	0.03	0.001	0
----	---	---	------	-------	---

$\chi^2= 0$. $gl=1$. $\alpha=0.05$. Las frecuencias estuvieron en equilibrio Hardy- Weinberg

En el caso de la variante rs17883901 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de GSH y los genotipos, ni diferencias en las RAM.

6.0 Discusión de resultados

En las enfermedades psicóticas se ha planteado que el déficit de GSH tiene un origen genético, además existe un exceso de estrés oxidativo que es causado por factores ambientales que se dan principalmente en el neurodesarrollo, junto con la neuroinflamación y la hipofunción glutamatérgica, que en consecuencia, alteran la conectividad neuronal (*Steullet et al., 2016*).

El nivel de GSH intracelular depende de distintos factores como: la capacidad del equipo enzimático de la célula, la disponibilidad de sustratos precursores y la capacidad de la célula para reciclar el glutatión oxidado (*Küster et al., 2011*). En ese sentido, las variantes genéticas que afecten la actividad de las enzimas participantes pueden también alterar los niveles de glutatión disponibles en la célula. Los resultados obtenidos mostraron una disminución estadísticamente significativa de GSH en pacientes (**$p= 0.001$**). En relación a esto, existen reportes previos con hallazgos similares en esquizofrenia, trastorno bipolar; tanto en tejidos periféricos como cerebrales en estudios *post mortem*, así como en modelos animales (*Nucifora et al., 2017*). Los autores atribuyen esta disminución a la baja disponibilidad de cisteína, ya que se ha considerado limitante para la síntesis de GSH en otras situaciones patológicas (*Küster et al., 2011*). En estudios previos se ha visto que al administrar N-acetil-cisteína (NAC) como precursor por vía oral, se aumentan rápidamente los niveles de cisteína en plasma, reponiendo así las reservas de GSH agotadas (Tharoor, 2018); también se ha visto que la cisteína mejora la conectividad funcional dentro de la corteza cingulada en la psicosis temprana (*Müllier et al., 2019*)

por lo que la NAC podría funcionar como un coadyuvante para el tratamiento de los TP (*Cotton et al., 2019*).

Los niveles bajos de glutatión también se han asociado con una baja neurotransmisión glutamatérgica (Hardingham et al., 2016). Existe evidencia de que la transmisión glutamatérgica activa las vías bioquímicas que generan radicales libres y/o disminuyen la defensa contra el daño de los radicales libres (*Kumar et al., 2020*). Otro neurotransmisor implicado es la dopamina, el exceso de ésta, genera una gran cantidad de ROS, lo cual también influye en las disfunciones conductuales que se observan en pacientes con esquizofrenia (*Nucifora et al., 2017*).

El estrés oxidativo puede anular la capacidad de las células de reducir GSSG a GSH, lo que resulta en la acumulación de GSSG, que puede exportarse fuera de la célula para ser eliminado por otros mecanismos que contribuyen a una pérdida neta de GSH intracelular (*Wickramasekara et al., 2018*) aunque estos mecanismos aún no se han investigado por completo.

Con respecto a la asociación entre la edad y los niveles de GSH, nuestros resultados concuerdan con lo que se ha observado en la literatura, de que a mayor edad se tienen menores niveles de GSH (Figura 8). En condiciones normales, se ha visto que la alteración de las enzimas antioxidantes se asocia con el incremento de estrés oxidativo que se intensifica con el envejecimiento (Reyazuddin et al., 2014), y que se traduce en una correlación negativa lineal. En el caso de los TP se ha observado que los niveles de GSH se ven disminuidos a edades mucho más tempranas en comparación con controles lo que indica un aumento exponencial de radicales libres en lugar de un incremento lineal y correlaciona con el envejecimiento acelerado propuesto en estos (*Rebrin et al., 2003*)

Otro factor relevante que modula los niveles de GSH es el estilo de vida de la persona. Se ha visto que la población urbana lleva una vida más estresante psicológicamente y tienen un ambiente más contaminado, esto genera un mayor estrés oxidativo, en el caso de los pacientes con TP esto podría contribuir al deterioro de la condición (*Reyazuddin et al., 2014*) tomando en cuenta también que existen pacientes que consumen tabaco y alcohol, y que además llevan un estilo de vida sedentario.

Los niveles de GSH alterados y especialmente disminuidos en la esquizofrenia pueden contribuir a una mayor actividad de las enzimas involucradas en la degradación de GSH, como son la GSH-transferasa (GST), γ -glutamyl transpeptidasa (GGT) y GSH-peroxidasa (GPX1) (*Hanzawa et al., 2011*). Como se puede apreciar en la Figura 3, se compararon los niveles de Gpx de pacientes y controles, donde se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.025$). La función de la Gpx junto con la catalasa es reducir el H_2O_2 , lipoperóxidos y O_2^- , estos compuestos se dan como consecuencia del metabolismo aeróbico y síntesis de ATP; además, las mitocondrias del cerebro tienen una gran demanda de oxígeno, debido a esto se generan grandes cantidades de ROS, como se ha documentado en pacientes con TP (*Górny et al., 2020*). La actividad de estas dos enzimas presenta una correlación negativa (*Dietrich-Muszalska et al., 2014*); donde, el aumento de GPx puede deberse a un mecanismo compensatorio para eliminar la producción excesiva de H_2O_2 , aunque sin la medición de los niveles de CAT esta hipótesis no puede ser comprobada.

En este trabajo todos los pacientes se encontraron bajo tratamiento con CLZ. Se sabe que el tratamiento antipsicótico se asocia con un aumento en los niveles periféricos de Gpx (*Yang et al., 2019*); aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se da el aumento de estos niveles, pero se relaciona con el aumento de ROS que inducen los antipsicóticos (*Soto-Bernardi et al., 2008*) ya que se ha visto que pacientes bajo tratamiento con CLZ tienen un aumento en niveles de colesterol, HDL y niveles de triacilglicéridos (*Miljevic et al., 2010*).

La GPx es una metaloenzima, lo que significa que depende de la presencia de minerales como selenio (Se), cobre (Cu), zinc (Zn) y manganeso (Mn), que actúan como catalizadores para su síntesis (Górny et al., 2020). Estudios previos han indicado que la actividad enzimática de Gpx es directamente proporcional a la ingesta de selenio (Mehdi, 2013) por lo que podría pensarse que los pacientes con TP pudieran tener deficiencias de selenio y a pesar de haber una mayor cantidad de enzima esta pudiera no ser completamente funcional. En este trabajo, no evaluamos la ingesta de estos compuestos en la dieta de los pacientes.

Un factor que se ha considerado determinante de los niveles de GSH, es la actividad de GCL ya que, como se ha mencionado antes es la enzima limitante de la velocidad de biosíntesis de GSH (*Nichenametla et al., 2011*).

El polimorfismo de repetición GAG en la región 5'UTR del gen **GCLC** se ha asociado con actividad alterada de GCL y GSH (*Nichenametla et al., 2011*). La repetición de los trinucleótidos afecta la eficiencia de traducción y la estabilidad del ARNm. Se ha especulado que, en condiciones fisiológicas los repetidos de GAG forman estructuras de horquillas que impiden el acceso de la subunidad 40S del ribosoma, lo cual afecta el proceso y disminuye el RNAm total disponible para la traducción (*Nichenametla et al., 2011*).

Los genotipos de los repetidos se han clasificado en dos grupos: “de bajo riesgo” que incluye el genotipo 7/7 y 7/9 y grupo de “alto riesgo” genotipos 7/8, 8/8,9/8 y 9/9 (*Xin et al., 2016*). Al analizar los datos obtenidos se encontró que los pacientes con genotipo 7/8 fueron el grupo con menores niveles de GSH (Figura 4) y este genotipo presento un OR=19.6, con esto se puede sugerir que un mayor número de repetidos no es proporcional a la disminución de GSH (*Xin, et al., 2011*) además, el alelo 8 en este estudio si puede considerarse un alelo de riesgo para la enfermedad, en el caso del genotipo 9/9 aunque estaba establecido como un genotipo de riesgo, en los resultados obtenidos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, esto puede deberse al tamaño de la muestra lo que podría explicar también la ausencia de los genotipos 8/8 y 9/8, sin embargo un factor a considerar

es el tipo de población ya que los estudios realizados anteriormente se hicieron en población Europea.

En el caso de los controles el grupo con mayores niveles de GSH fue el de genotipo 7/7 y en pacientes 7/9, por lo que el alelo 7 podría un factor protector (*Xin et al., 2016*).

Las variantes rs761142 y rs17883901 se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg, esto nos indica que las frecuencias se mantienen constantes en diferentes generaciones en pacientes y controles (*Hernández, et al. 2014*)

La frecuencia del alelo C en la variante rs17883901 se reporta como 0.0519 en población latina, sin embargo, en los resultados obtenidos tiene una frecuencia de 0.05 en pacientes y 0.03 en controles. En el caso de la variante rs761142 se reporta una frecuencia de 0.45 en población latina para el alelo C, mientras que en los resultados obtenidos presenta una frecuencia de 0.66 para pacientes y 0.5 en controles sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo.

De igual forma, se compararon niveles de GSH con la variante intrónica rs761142 y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, esta variante si se relacionó con las RAM presentes en el tratamiento con CLZ, los pacientes con el genotipo CC presentaron el mayor porcentaje de RAM (Tabla 2). Al respecto existe evidencia que esta variante se asocia con niveles más bajos de RNAm, lo que conduce a una expresión reducida de **GCLC**, esto a su vez, tiene un papel importante en el aumento de riesgo de desarrollar hipersensibilidad a sulfametoxazol (*Küster et al., 2011*). Se sabe que la CLZ forma aductos con el GSH lo cual genera toxicidad (*Laine et al., 2015*) sin embargo diversos autores mencionan que las reacciones adversas con mayor relevancia clínica como la agranulocitosis, se dan por la presencia de intermediarios de CLZ como lo es el ión nitrenio, este es el resultado de la oxidación de CLZ por el ácido hipocloroso en presencia de H₂O₂ (*Jegouzo et al., 1999*). El ión nitrenio se une con el grupo sulfhidrilo de proteínas en las membranas celulares (*Wiciński et al., 2018*) y tiene afinidad a las selenocisteínas, proteínas que contienen selenio, estas proteínas cumplen un papel importante como antioxidantes extracelulares (*Lammi et al., 2008*)

por lo que podría pensarse que contribuyen en el aumento de estrés oxidativo. Esto último también podría relacionarse con una disminución de selenio y apoyar a la hipótesis antes planteada sobre la Gpx.

Una de las alternativas estudiadas en la actualidad para tratar los efectos adversos de la CLZ es la administración de ascorbato de sodio (*Jegouzo et al., 2019*) y de algunos otros antioxidantes, aunque las pruebas solo se han realizado *in vitro*, por lo que sería de suma importancia realizar más investigación sobre este tema y conocer algunos de los mecanismos que podrían ayudar a reducir las RAM.

Otra de las variantes estudiada fue la rs17883901, esta variante se asocia con una disminución en la funcionalidad de la región promotora de **GCLC** (*Küster et al, 2011*) por lo que afecta los niveles de GSH, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de su frecuencia alélica y genotípica entre controles y pacientes con TP. Actualmente esta variante no se ha estudiado en pacientes con TP, ni en pacientes bajo tratamiento de CLZ, por lo que se deben realizar estudios adicionales bien diseñados con muestras multiétnicas de mayor tamaño para confirmar estos resultados.

7.0 Conclusiones

En este estudio se confirma la disminución de los niveles de GSH en pacientes mexicanos con TP, al respecto, otro grupo del Instituto publicó un estudio con resultados similares pero con estudios de neuroimagen en pacientes mexicanos (*Reyes-Madrigal et al., 2019*). Se piensa que este antioxidante, se asocia a la predisposición de la psicosis y puede ser un cambio fisiopatológico común sobre todo en la ESQ, más que un efecto de la medicación, ya que la capacidad deteriorada para sintetizar GSH en condiciones de estrés oxidativo es un factor de vulnerabilidad.

Se piensa en la necesidad de implementar biomarcadores que puedan ayudar al diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades, como la variante asociada a RAM

que identificamos en este trabajo, la cual deberá confirmarse en muestras de mayor tamaño.

La enzima glutatión peroxidasa, es un factor que nos permite comprender de una mejor manera las causas de la desregulación redox, la importancia que tienen los micronutrientes en el sistema antioxidante y dar pauta para la implementación de un tratamiento nutricional a la par de uno farmacológico, como se ha iniciado en años recientes.

La variante GAG de **GCLC** podría utilizarse como marcador para determinar individuos en riesgo, ya que puede ayudar a identificar el origen del déficit de GSH, en este caso se puede considerar el genotipo 7/8 como factor de riesgo.

En el caso de las variantes estudiadas rs761142 y rs17883901, a pesar de encontrarse en una región intrónica, los estudios previos mencionan que estos SNV tienen importancia al momento de la traducción, desafortunadamente estas variantes no cuentan con estudios realizados en población mexicana, y los estudios existentes en pacientes con TP son muy pocos, por lo que es necesario realizar más investigación en este campo.

La CLZ a pesar de ser un fármaco muy eficaz, contribuye a la generación de estrés oxidativo y RAM, debido a la formación de metabolitos intermediarios, esto podría empeorar el estado en pacientes con mayor susceptibilidad como es el caso de los pacientes con genotipo CC para la variante rs761142, en estos casos se refuerza la idea de la importancia de la dieta, aquí se podrían incluir antioxidantes como alimentos ricos en vitamina A, E y C que podrían ayudar en la disminución de RAM.

Será importante el estudio adicional de las diferentes enzimas que también se ven involucradas en los mecanismos antioxidantes como lo son: GGT, CAT, GSSG, por mencionar algunas, para complementar la información obtenida en este trabajo. Así como completar la información de factores que se ha visto que aumentan el estrés oxidativo como lo es el consumo de alcohol, tabaco, drogas, estilo de vida entre algunos otros.

8.0 Referencias bibliográficas

Agilar Valles, A. (2011). Identificación de factores genéticos en la etiología de la esquizofrenia, *Acta Biológica Colombiana*, 16 (3), 129-138.

Recuperado de

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/189003/27972>

Área de Gestión Clínica de Psiquiatría y Salud Mental del Hospital Universitario 12 de Octubre. (2019). *Manejo de clozapina* (pp. 1-29). Madrid, España.

Aringhieri, S., Carli, M., Kolachalam, S., Verdesca, V., Cini, E., Rossi, M., ... Scarselli, M. (2018). *Objetivos moleculares de los antipsicóticos atípicos: del mecanismo de acción a las diferencias clínicas. Farmacología y terapéutica*. doi: 10.1016 / j.pharmthera.2018.06.012

Aringhieri, S., Carli, M., Kolachalam, S., Verdesca, V., Cini, E., Rossi, M., McCormick, P. J., Corsini, G. U., Maggio, R., & Scarselli, M. (2018). Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences. *Pharmacology & therapeutics*, 192, 20–41.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.012>

Avello, Marcia, & Suwalsky, Mario. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>

Buka, S. L., Tsuang, M. T., Torrey, E. F., Klebanoff, M. A., Bernstein, D., & Yolken, R. H. (2001). Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. *Archives of general psychiatry*, 58(11), 1032–1037. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.11.1032>

Carrillo, R., Diaz-Ponce, J., Peña, A., Flores, O., Neri, R., & Zepeda, A. et al. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista De La Facultad De Medicina De La UNAM*, 59(1), 6-18. Retrieved 2 June 2020, from <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v59n1/2448-4865-facmed-59-01-6.pdf>.

Ceruelo Bermejo, J., & García Rodicio, S. (2007). Antipsicóticos típicos. Antipsicóticos atípicos. *FMC.*, 14(10), 637-647.

Coronado, H., M., Vega y León, S., Gutierrez T, R., Vazquez F, M., & Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*, 42(2), 206-212. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>

Corrales MSc, L., & Muñoz Ariza, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213. <https://doi.org/10.22490/24629448.1010>

Dalman, C., Allebeck, P., Gunnell, D., Harrison, G., Kristensson, K., Lewis, G., Lofving, S., Rasmussen, F., Wicks, S., & Karlsson, H. (2008). Infections in the CNS during childhood and the risk of subsequent psychotic illness: a cohort study of more than one million Swedish subjects. *The American journal of psychiatry*, 165(1), 59–65. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.07050740>

Díaz-Hung, M. L., & González Fraguela, M. E. (2014). El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas: ¿causa o consecuencia? *Neurología*, 29(8), 451–452. doi:10.1016/j.nrl.2013.06.022

Díaz-Hung, M., González Fraguela, M., & Blanco Lezcano, L. (2015). El sistema antioxidante del glutatión en la etiopatología de la disfunción nigro-estriatal. *Revista Cubana De Investigaciones Biomédicas*, 34(2), 168-186.

Fatemi, SH y Folsom, TD (2009). La hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia, revisada. *Boletín de esquizofrenia*, 35 (3), 528–548. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn187>

Flores-Rojas, E., & González-Zúñiga, A. (2019). Efectos secundarios metabólicos de los antipsicóticos de segunda generación. *Medicina Interna De México*, 35(5), 725-731.

Fuentes Lugo, O. (2019). *Efecto de la rotenona sobre la concentración de glutatión y enzimas relacionadas con el metabolismo en cultivos primarios de astrocitos* (Licenciatura). UNAM.

Gallardo, I., Camacho, M., Robles, L., Celis, A., & Partida, A. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*, 15(1), 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2015.06.002>

Gawryluk, J. W., Wang, J.-F., Andreatza, A. C., Shao, L., & Young, L. T. (2010). Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(01), 123–130. doi:10.1017/s1461145710000805

Gejman, P. V., Sanders, A. R., & Duan, J. (2010). The role of genetics in the etiology of schizophrenia. *The Psychiatric clinics of North America*, 33(1), 35–66. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.12.003>

Giménez, C. (2012). Bases moleculares de la esquizofrenia. *Anales De La Real Academia Nacional De Farmacia*, 4, 365-385.

Gómez Ayala, A. (2006). Farmacoterapia de la esquizofrenia. *Elsevier*, 20(9), 73-78. Retrieved 28 May 2020, from <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-farmacoterapia-esquizofrenia-13094212>.

Graff-Guerrero, A., Apiquian, R., Fresán, A., & García-Anaya, M. (2001). Perspectiva neurobiológica de la esquizofrenia. *Salud Mental*, 24(6), 26-42.

Gysin, René & Kraftsik, Rudolf & Sandell, Julie & Bovet, Pierre & Chappuis, Céline & Conus, Philippe & Deppen, Patricia & Preisig, Martin & Ruiz, Viviane & Steullet, Pascal & Tomic, Mirjana & Werge, Thomas & Cuenod, Michel & Do, Kim. (2007). Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: Convergent genetic and functional evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104. 16621-6. 10.1073/pnas.0706778104.

Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet*. 2003;361(9355):417-419. doi:10.1016/S0140-6736(03)12379-3

Harrison, P. J., & Owen, M. J. (2003). Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet (London, England)*, 361(9355), 417–419. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12379-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12379-3)

Howes, O., & Kapur, S. (2009). The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III--The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 549-562. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp006>

Iglesias García, C., Iglesias Alonso, A., & Bobes, J. (2017). *Variaciones en las concentraciones plasmáticas de clozapina en pacientes con esquizofrenia y trastorno esquizoafectivo*. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*, 10(4), 192–196. doi:10.1016/j.rpsm.2017.06.002

Ip, J., & Uetrecht, J. P. (2008). Testing the hypothesis that selenium deficiency is a risk factor for clozapine-induced agranulocytosis in rats. *Chemical research in toxicology*, 21(4), 874–878. <https://doi.org/10.1021/tx7004037>

Jann, MW, Grimsley, SR, Gray, EC y Chang, W.-H. (1993) *Farmacocinética y farmacodinámica de clozapina*. *Farmacocinética clínica*, 24 (2), 161-176. doi: 10.2165 / 00003088-199324020-00005

Jegouzo, A., Gressier, B., Frimat, B., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Kouach, M., Cazin, M., & Cazin, J. C. (1999). Comparative oxidation of loxapine and clozapine by human neutrophils. *Fundamental & clinical pharmacology*, 13(1), 113–119. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1999.tb00329.x>

Kapur, Shitij, Mizrahi, Romina & Li, Ming. (2005). From dopamine to salience to psychosis—Linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis. *Schizophrenia research*. 79. 59-68. 10.1016/j.schres.2005.01.003.

Krauskopf P, V., & de la Barra M, F. (2013). Trastornos psiquiátricos en los pacientes con epilepsia. *REV. MED. CLIN. CONDES*, 24(6), 979-985. Retrieved from https://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2013/6%20noviembre/11-Dra.Krauskopf.pdf

Krauskopf, V., & De la barrera M., C.. (2013). Trastornos psiquiátricos en los pacientes con epilepsia. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(6), 979-985. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70252-9](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70252-9)

Kumar, J., Liddle, E. B., Fernandes, C. C., Palaniyappan, L., Hall, E. L., Robson, S. E., Simmonite, M., Fiesal, J., Katshu, M. Z., Qureshi, A., Skelton, M., Christodoulou, N. G., Brookes, M. J., Morris, P. G., & Liddle, P. F. (2020). Glutathione and glutamate in schizophrenia: a 7T MRS study. *Molecular psychiatry*, 25(4), 873–882. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0104-7>

Küster, A., Tea, I., Ferchaud-Roucher, V., Le Borgne, S., Plouzenec, C., Winer, N., Rozé, J. C., Robins, R. J., & Darmaun, D. (2011). Cord blood glutathione depletion in preterm infants: correlation with maternal cysteine depletion. *PloS one*, 6(11), e27626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027626>

Laine, J. E., Häkkinen, M. R., Auriola, S., Juvonen, R. O., & Pasanen, M. (2015). Comparison of trapping profiles between d-peptides and glutathione in the identification of reactive metabolites. *Toxicology reports*, 2, 1024–1032. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.07.002>

Lammi, M. J., & Qu, C. (2018). Selenium-Related Transcriptional Regulation of Gene Expression. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2665. <https://doi.org/10.3390/ijms19092665>

Lu SC (2013). Síntesis de glutatión. *Biochimica et biophysica acta* , 1830 (5), 3143-3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>

Maas, D. A., Vallès, A., & Martens, G. (2017). Oxidative stress, prefrontal cortex hypomyelination and cognitive symptoms in schizophrenia. *Translational psychiatry*, 7(7), e1171. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.138>

Martínez-Espinosa, Rosa. (2019). Glutatión: papel biológico y efectos en las aves.. 98. 47-53.

Mednick, SA, Machon, RA, Huttunen, MO y Bonett, D. (1988). Esquizofrenia en adultos después de la exposición prenatal a una epidemia de gripe. *Archivos de*

192. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1988.01800260109013>

Mehdi, Y., Hornick, J. L., Istasse, L., & Dufrasne, I. (2013). Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(3), 3292–3311. <https://doi.org/10.3390/molecules18033292>

Miller, J. N., & Black, D. W. (2019). Schizoaffective disorder: A review. *Annals of clinical psychiatry : official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*, 31(1), 47–53.

Nucifora, L. G., Tanaka, T., Hayes, L. N., Kim, M., Lee, B. J., Matsuda, T., Nucifora, F. C., Jr, Sedlak, T., Mojtabai, R., Eaton, W., & Sawa, A. (2017). Reduction of plasma glutathione in psychosis associated with schizophrenia and bipolar disorder in translational psychiatry. *Translational psychiatry*, 7(8), e1215. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.178>

Ortega Herrero, R. (2015). *Metabolismo del glutatión y enzimas antioxidantes frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en el ciliado-modelo "Tetrahymena thermophila"* (Doctorado). Universidad Complutense de Madrid.

Ortuño, F., & Gutiérrez- Rojas, L. (2011). Psicosis. *Medicine*, 10(84), 693-702.

Pacheco, A., & Raventós, H. (2014). Genética de la esquizofrenia: avances en el estudio de genes candidatos. *Revista De Biología Tropical*, 1(2), 467. <https://doi.org/10.15517/rbt.v1i2.15280>

Pacheco, Adriana, & Raventós, Henriette. (2004). Genética de la esquizofrenia: avances en el estudio de genes candidatos. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 467-473. Recuperado en 02 de junio de 2020, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300007&lng=es&tlng=es.

Pupo, E., Gómez, L., & Campaña, I. (2017). Oxidative Stress. *Universidad De Ciencias Medicas De Holguin*, 21(1). Retrieved 2 June 2020, from <http://revcocmed.sld.cu/index.php/cocmed/article/view/2173/985>.

Rae, C. D., & Williams, S. R. (2017). Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy. *Analytical biochemistry*, 529, 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.022>

Roselló, P., Tudela Torras, P., Malventi Bellido, D., Pomares Martínez, T., & Pérez Longás, B. (2018). Psicosis como clave en el diagnóstico de epilepsia. A propósito de un caso. *Psiquiatría Biológica*, 25(3), 116-119. doi: 10.1016/j.psiq.2018.11.001

Soto-Bernardini, María Clara y Raventós-Vorst, Henriette. (2008) Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. *Acta Médica Costarricense*, 50 (4), 197-202. Recuperado el 28 de mayo de 2020, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022008000400003&lng=en&tlng=es.

Stahl, S. (2018). Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate. *CNS Spectrums*, 23(3), 187-191. <https://doi.org/10.1017/s1092852918001013>

Stephen, L., Ming, T. y Fuller, E. (2001). Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. *Archives of General Psychiatry*, 58, 1032-1037

Tsugawa, S., Noda, Y., Tarumi, R., Mimura, Y., Yoshida, K., Iwata, Y., ... Nakajima, S. (2019). *Glutathione levels and activities of glutathione metabolism enzymes in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. Journal of Psychopharmacology*, 026988111984582. doi:10.1177/0269881119845820

Vargas, A., y Ebner Á., Matías, y Gaete, T. (2017). Agranulocitosis secundaria a clozapina: un estudio descriptivo en pacientes chilenos. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría*, 55 (2), 77-84. [Fecha de Consulta 2 de Junio de 2020]. ISSN: 0034-7388. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3315/331552284002>

Viada Pupo, Esther, Gómez Robles, Lisvelt, & Campaña Marrero, Ibel Reyna. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*, 21(1), 171-186. Recuperado en 03 de mayo de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014&lng=es&tlng=es

Wang, D., Curtis, A., Papp, A. C., Koletar, S. L., & Para, M. F. (2012). Polymorphism in glutamate cysteine ligase catalytic subunit (**GCLC**) is associated with sulfamethoxazole-induced hypersensitivity in HIV/AIDS patients. *BMC medical genomics*, 5, 32. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-32>

Wickramasekara, R. N., Morrill, S., Farhat, Y., Smith, S. J., & Yilmazer-Hanke, D. (2018). Glutathione and Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 3 (Itih3) mRNA levels in nicotine-treated Cd44 knockout mice. *Toxicology reports*, 5, 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.06.010>

Xin, L., Mekle, R., Fournier, M., Baumann, P. S., Ferrari, C., Alameda, L., Jenni, R., Lu, H., Schaller, B., Cuenod, M., Conus, P., Gruetter, R., & Do, K. Q. (2016). Genetic Polymorphism Associated Prefrontal Glutathione and Its Coupling With Brain Glutamate and Peripheral Redox Status in Early Psychosis. *Schizophrenia bulletin*, 42(5), 1185–1196. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw038>

Yang, A. C., & Tsai, S. J. (2017). New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1689. <https://doi.org/10.3390/ijms18081689>

Zhang, H., & Forman, H. J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(7), 722–728. doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.017

ANEXO A

Carta de consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIURGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

CONSENTIMIENTO INFORMADO: "IMPACTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL EN LA FARMACOCINÉTICA DE CLOZAPINA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA CLÍNICA EN PACIENTES CON TRASTORNOS PSICÓTICOS"

NOMBRE DEL PACIENTE _____	FECHA _____	HORA _____
REGISTRO _____	FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____	
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL _____		

Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

- ✓ He sido invitado/a a participar voluntariamente en el protocolo de investigación: "Impacto de la variabilidad genética individual en la farmacocinética de clozapina y su asociación con la respuesta clínica en pacientes con espectro esquizo-afectivo".
- ✓ He sido informado/a que padezco o algún familiar padece (Marque una de las siguientes opciones):
ESQUIZOFRENIA ___ TRASTORNO ESQUIZOAFECTIVO _____ TRASTORNO BIPOLAR _____
- ✓ He sido informado/a que los trastornos psicóticos (ambos mencionados) son padecimientos psiquiátricos crónicos que puede presentar reactividad emocional alterada, conducta desorganizada y alteraciones cognitivas con respuesta variable al tratamiento y remisión parcial. Actualmente no se conocen los mecanismos que determinan la aparición de estas enfermedades; sin embargo se sabe que los factores genéticos pueden contribuir a la respuesta al tratamiento y a las reacciones adversas asociadas a éste.
- ✓ He sido informado/a que el objetivo general de este estudio es evaluar la asociación entre el perfil genético, las concentraciones plasmáticas del antipsicótico clozapina, junto con la respuesta terapéutica (eficacia, ineficacia y reacciones adversas) en pacientes mestizo mexicanos con espectro esquizo-afectivo (diagnóstico clínico de esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar). Adicionalmente, se comparará el perfil genético de pacientes con controles sanos. Los resultados de este protocolo de investigación nos permitirán identificar factores asociados a la respuesta terapéutica y factores de riesgo para el desarrollo de reacciones adversas asociadas al tratamiento con clozapina.
- ✓ He sido informado/a que para participar en este estudio, en primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados, acto seguido se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el material genético (DNA) y se estudiarán diferentes variantes genéticas asociadas con la farmacocinética de la clozapina.



CONSENTIMIENTO INFORMADO: "IMPACTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL EN LA FARMACOCINÉTICA DE CLOZAPINA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA CLÍNICA EN PACIENTES CON TRASTORNOS PSICÓTICOS"

- ✓ He sido informado/a que cuando se realiza la toma de muestra de sangre, podré experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.
- ✓ He sido informado/a que mi información clínica recopilada es confidencial. El nombre de los participantes está codificado y nunca aparecerá en ningún reporte o publicación.
- ✓ He sido informado/a que mi participación en este estudio no tendrá ningún costo ni recibiré remuneración económica alguna.
- ✓ He sido informado/a que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.
- ✓ He sido informado/a que mi tratamiento y la actitud de los doctores hacia mí no se verán afectados en el caso de decidir que no deseo formar parte de este estudio. La negativa a participar no afectará cualquier beneficio para el cual yo de otra forma tenga derecho. También podré retirarme una vez enrolado/a durante el estudio si es que así lo deseo, con las mismas implicaciones mencionadas previamente.
- ✓ He sido informado/a que este estudio es a largo plazo (3 años) y requiere de la participación de un gran número de pacientes con estas enfermedades. Una vez terminado el estudio, sólo si los resultados son de relevancia para mí, se me contactará para comunicármelos y explicármelos.
- ✓ He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para esta investigación y otras en las que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos: SI NO
- ✓ He sido informado/a que si me surgen dudas puedo contactar a la Dra. Alejandra Camacho Molina, al Dr. David J. Dávila Ortiz de Montellano, o la Dra. Nancy Monroy Jaramillo del departamento de Neurogenética y Biología Molecular, las puedo localizar en el Tel. (55) 56 06 38 22 Exts. 1071, 2018 y 3041. También puedo comunicarme al Comité de Ética en Investigación, a la ext. 5027.
- ✓ Después de haber leído cuidadosamente este documento acepto **VOLUNTARIAMENTE** participar en el presente estudio.

Domicilio: _____

Teléfono: _____

Comeo electrónico: _____

