



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA



INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRIA
RAMÓN DE LA FUENTE

Cuantificación de la expresión de receptores dopaminérgicos, en células mononucleares de sangre periférica, en pacientes con esquizofrenia sin tratamiento.

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA LA TESIS DE ESPECIALIDAD EN
 PSIQUIATRÍA QUE PRESENTA:**

Dra. Areli López Alvarado

Médico Residente de cuarto año de la especialidad en Psiquiatría.

ASESORES

Dr. Ricardo Arturo Saracco Álvarez

Tutor teórico

Dr. Raúl Iván Escamilla Orezco

Tutor metodológico

Dr. Héctor Senties Castellá

Director de Enseñaza





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.

Índice

1.	Agradecimientos.....	3
2.	Antecedentes	4
3.	Justificación	18
4.	Pregunta de investigación	19
5.	Objetivos	
-	Generales	19
-	Específicos	20
6.	Hipótesis	20
7.	Población	
-	Criterios de inclusión	21
-	Criterios de exclusión	21
-	Criterios de eliminación	22
8.	Material y métodos	
-	Diseño del estudio.....	22
-	Consideraciones éticas.....	23
-	Procedimientos.....	24
-	Análisis estadístico.....	28
-	Definición de grupos.....	28
9.	Resultados	
-	Datos demográficos.....	29
-	Resultados de la expresión de receptores y transportador de dopamina.....	31
-	Gráficas.....	34
10.	Discusión.....	35
11.	Cronograma de actividades.....	39
12.	Referencias.....	40
13.	Consentimiento informado.....	46
14.	Carta de resguardo de muestras.....	51
15.	Anexo 1 (Criterios diagnósticos)	53
16.	Anexo 2 (PANSS).....	55
17.	Anexo 3 (Test de Fageström).....	57

Agradecimientos

Quisiera agradecer y dedicar especialmente esta tesis, como un logro más en el camino, en primer lugar, a mi familia, especialmente a mis padres, mi abuela y mi hermano que en todo momento han luchado por apoyarme darme las herramientas necesarias para cumplir mis metas. Son el mejor ejemplo a seguir para mí.

Además de todas las personas que hicieron posible que concluyera este proyecto, mis compañeros de residencia, mis amigas Alejandra y María Rosa. Pero especialmente al personal del laboratorio de Neuroinmunología, pero especialmente a Samantha, quien me enseñó la importancia del procedimiento y trabajó arduamente conmigo a lo largo del proceso, gracias por el tiempo y esfuerzo invertido.

A mis tutores el doctor Ricardo Saracco y el doctor Raúl Escamilla, que aguantaron cada una de mis presiones y se ocuparon de que esto se llevara a cabo adecuadamente. Además, gracias de enseñarme muchas más cosas no relacionadas a lo largo del proceso.

Y por último, aunque no menos importante, gracias a mi compañero de viaje, Lalo, no hubiera logrado terminar esto sin ti, gracias por cada minuto que dedicaste a sentarte conmigo para que pudiera terminar esto, eres mi inspiración para continuar.

1. ANTECEDENTES

Generalidades

Fue en abril de 1908 cuando Eugen Bleuler, mientras se encontraba en una convención en el hospital Charitè de Berlín, utilizó por primera vez el término *esquizofrenia o grupo de esquizofrenias*, para hacer referencia al grupo de síntomas clínicos que Kraepelin llamaba como demencia precoz, sin embargo, Bleuler aunque apoyaba la descripción clínica de Kraepelin, diferían en cuanto al pronóstico, ya que decía que no necesariamente debían tener un mal desenlace (Hoff, 2012).

Actualmente de acuerdo a la OMS, la esquizofrenia es un trastorno mental grave, que se caracteriza por una distorsión del pensamiento, de la percepción, las emociones, el lenguaje, la conciencia de sí mismo y la conducta. Según la American Psychiatric Association, en su Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales, en su 5° versión, la esquizofrenia se define como la presencia de dos o más de los siguientes síntomas: 1) delirios, 2) alucinaciones, 3) discurso desorganizado, 4) comportamiento muy desorganizado o catatónico, 5) síntomas negativos; durante un periodo de un mes, donde desde el inicio del padecimiento el nivel del funcionamiento en ámbitos como el trabajo, relaciones interpersonales o el cuidado personal, se encuentra por debajo del nivel alcanzado previamente.

Tiene una prevalencia de 1% de forma global, afecta a más de 21 millones de personas en todo el mundo. Es más frecuente en hombres (12 millones vs 9 millones), quienes además generalmente la desarrollan a una edad más temprana. Se asocia a una discapacidad considerable y puede afectar al desempeño educativo y laboral. Por otra parte, las personas con la enfermedad tienen entre 2 y 2,5 veces más probabilidades de morir a una edad

temprana que la población general; esto se debe a enfermedades cardiovasculares, metabólicas e infecciosas (OMS, septiembre 2015).

En México, se estima que existen más de 500 mil pacientes con esquizofrenia. Los requerimientos de estos pacientes son diversos: hospitalización en la fase aguda, uso de medicamentos antipsicóticos de por vida, rehabilitación psicosocial, acciones de reinserción a su entorno y tratamiento familiar complementario.

Tratamiento

Debido a la cronicidad de los síntomas y las múltiples recaídas, la intervención debe contener un enfoque multimodal, tanto con fármacos como con terapia psicosocial con el objetivo de reducir tanto la frecuencia y gravedad de los episodios, como mejorar la calidad de vida de los pacientes, llevándolos a un grado de funcionalidad suficiente que les permita ser independientes (Tandon R. et al, 2010).

La introducción del primer antipsicótico hace más de medio siglo, permitió a los pacientes salir de los hospitales psiquiátricos y mejorar su calidad de vida, convirtiéndose en el pilar del tratamiento; desde entonces se han desarrollado más de 60 antipsicóticos, clasificándolos como fármacos de primera y segunda generación, con la característica común de bloquear el receptor de dopamina D2 como mecanismo de acción; de acuerdo a la afinidad por el receptor es como se define la potencia de cada uno (Kapur S, et al., 2001).

A continuación, se muestra una tabla con todas las familias de antipsicóticos (ver, tabla 1):

Tabla 1. Diferentes familias de antipsicóticos de primera y segunda generación.
--

Primera generación o típicos	Segunda generación o atípicos
<p>1. <u>Fenotiazinas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Alifáticas:</i> clorpromazina, levomepromazina, triflupromazina. - <i>Piperidinas:</i> pipotiazina, mesoridazina. - <i>Piperazinas:</i> flufenazina, perfenazina, trifluoperazina. 	<p>1. <u>Benzo (diazepinas o tiazepinas):</u> clozapina, olanzapina, quetiapina.</p>
<p>2. <u>Butirofenonas:</u> haloperidol, benperidol.</p>	<p>2. <u>Indolonas:</u> aripiprazol, risperidona, paliperidona, ilioperidona, ziprasidona, sertindol.</p>
<p>3. <u>Tioxantenos:</u> zuclopentixol, clopentixol, flupentixol.</p>	<p>3. <u>Benzamidas:</u> amisulprida.</p>
<p>4. <u>Dihidroindolonas:</u> molindona.</p>	
<p>5. <u>Dibenzoxazepinas:</u> loxapina.</p>	
<p>6. <u>Difenilbutilpiperidinas:</u> pimozida, penfluridol.</p>	

7. <u>Benzamidas</u> : sulpiride.	
-----------------------------------	--

(Modificado de Tandon R. et al, 2010).

Efectividad entre los antipsicóticos.

En lo que respecta a control de síntomas positivos o desorganización del pensamiento comparados contra placebo, todos muestran superioridad de respuesta, pero no existen diferencias entre fármacos de primera y de segunda generación. La respuesta al antipsicótico en las primeras dos a cuatro semanas es un factor predictivo para el tratamiento a largo plazo. Sin embargo, los antipsicóticos de primera generación no cuentan con buena respuesta para reducir los síntomas negativos y cognitivos, que contribuyen en gran parte la poca funcionalidad de los pacientes, además, muchos de estos síntomas pueden aumentar como producto de los efectos extrapiramidales secundarios a los medicamentos (Tandon R. et al, 2010).

En 1960, se desarrolló el primer antipsicótico de segunda generación o atípico, la clozapina, debido a los efectos adversos, en particular a la agranulocitosis secundaria, fue restringido su uso, sin embargo, al disminuir las ideas suicidas, los síntomas extrapiramidales y mejorar el control de los síntomas positivos en aquellos pacientes refractarios a tratamiento, desde ese momento se empezó a buscar un fármaco similar a este sin los potenciales efectos adversos antes descritos. Así, se crearon el resto de los antipsicóticos de segunda generación, con la idea de que eran más eficaces y con menores efectos adversos. Pese a la teoría antes descrita, recientemente se ha encontrado en múltiples estudios que los antipsicóticos de segunda generación no son mejores en el control de los síntomas positivos, ni restablecen las

funciones cognitivas alteradas en esta población. (Lieberman et al., 2005; Swartz et al., 2007).

Impacto del tratamiento farmacológico.

A pesar de los efectos adversos de estos fármacos, sobre todo los motores, el principal motivo de continuar dichos medicamentos es que, al tener un control de los síntomas positivos, en muchos de casos les permite ingresar al campo laboral al prevenir recaídas de episodios psicóticos e intentos suicidas (Tandon R. et al, 2010).

De acuerdo a las Guías de Práctica Clínica NICE 2014, dado que no existe diferencia, hablando de eficacia sobre los síntomas positivos, entre los antipsicóticos de primera generación sobre los de segunda, se recomienda al clínico escoger el fármaco de acuerdo a las características del paciente siempre monitorizando las dosis del fármaco; pero no retrasar el uso de clozapina en aquellos que no han respondido a dos ensayos terapéuticos.

Teorías sobre la fisiopatogenia de la Esquizofrenia

Aun cuando no ha sido esclarecida la causa que provoca este padecimiento, no existe la duda de que hay una compleja interacción entre factores genéticos y el medio ambiente. Es difícil utilizar modelos animales ya que al parecer es una enfermedad que únicamente se presenta en humanos. Sin embargo, como se ha demostrado en estudios de gemelos monocigotos adoptados, el incremento del riesgo no tiene que ver con el hecho de que el padre adoptivo presente la enfermedad, sino con la existencia de la enfermedad en los padres biológicos y la concordancia entre estos gemelos es del 40-50%, a diferencia de los dicigotos que es del 10-15% (Kringlen E, 2000).

Una de las hipótesis más aceptadas es la dopaminérgica, desde el descubrimiento de los antipsicóticos y su efecto en el control de algunos de los síntomas de la enfermedad ésta ha sido la más aceptada. La mayor parte de estos medicamentos bloquean al receptor D2, proponiendo un exceso en los niveles de dopamina en la vía mesolímbica como la causa de los síntomas psicóticos; con el advenimiento de los antipsicóticos de segunda generación y la introducción de la clozapina que en realidad es un antagonista débil de dicho receptor se propuso que la disminución de dopamina en la corteza prefrontal sería la causante de los síntomas cognitivos (Goldman-Rakic PS, et al. 2004). Pese a ello, muchos de los pacientes no responden al tratamiento, a pesar de llevar de forma adecuada y con dosis terapéuticas, lo que llevó a la búsqueda de otras explicaciones como la teoría del glutamato y la hipofunción del receptor NMDA, la teoría serotoninérgica y gabaérgica (Lahti AC, et al. 2001).

Otra de las propuestas, han sido relacionada a infecciones, incrementando el riesgo de padecer el trastorno en aquellos nacidos en invierno derivado de la exposición materna a influenza, también se ha encontrado aumento de anticuerpos a sarampión o de *herpes simplex tipo 2* en las madres de pacientes que posteriormente desarrollaron psicosis (Brown As, et al. 2010). Estas teorías conducen a estudiar el rol del sistema inmune en la fisiopatogenia de la entidad. Se ha encontrado, una exacerbación de la activación del sistema inmune con incremento de citocinas pro-inflamatorias que alteran la barrera hematoencefálica, por la activación constante de la microglía. Además, una mayor asociación con ciertas enfermedades autoinmunes como: tirotoxicosis, enfermedad celiaca y anemia hemolítica adquirida (Eaton WW, et al. 2006).

El Sistema inmunológico en Esquizofrenia.

Generalidades.

El Sistema inmune está conformado por una serie de órganos, tejidos y células por todo el cuerpo. Si se toma en cuenta las funciones que realizan, entonces se pueden clasificar dichos órganos en primarios y secundarios. En los primeros, tienen lugar la generación de las células que conforman al sistema inmune (linfopoyesis). Mientras que los segundos, se encargan de hospedar las células capacitadas funcionalmente para interactuar con microorganismos o antígenos, atrapados por estos órganos, en un entorno adecuado para que las mismas interactúen con dichos agentes extraños al organismo y los eliminen.

De acuerdo al tipo de respuesta, podemos clasificarlo en: innato y adquirido. El primero está relacionado a toda respuesta inmunológica, trabaja mediante patrones de reconocimiento asociados a receptores en los microorganismos y está presente desde el nacimiento, permaneciendo estable durante toda la vida del individuo. Está conformado por neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteliales, mastocitos plaquetas, adipocitos, linfocitos de respuesta innata que responden a interleucinas y natural killers (Medzhitov R, 2013). En cambio, el segundo brazo del sistema inmunológico está en constante cambio a lo largo de la vida de acuerdo a la exposición de patógenos, está conformado por los linfocitos T y B, que adquieren receptores durante la maduración para respuestas específicas, denominadas respuestas celulares a antígenos específicas, éstas se activan ante la presencia de los antígenos ya sea externos como las alergias o internos como las enfermedades autoinmunes.

La inflamación en el SNC tiene un papel dual: neuroprotección o neurotoxicidad (Hohlfeld et al., 2007). Existen varias descripciones de la asociación entre la inflamación crónica del

SNC y la esquizofrenia (Anderson et al., 2013). Esta inflamación, es mediada por citocinas proinflamatorias, microglía, astrocitos y células de respuesta inmunológica invasoras, como monocitos, macrófagos y linfocitos T o linfocitos B, una respuesta exacerbada puede generar daño adicional (Muller, 2014).

Existen numerosas descripciones de una asociación entre cambios del sistema inmunológico y esquizofrenia (Ribeiro-Santos et al., 2014). El aumento de marcadores proinflamatorios como citocinas han sido descritos en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCF) de pacientes con esquizofrenia. Estudios genéticos, han demostrado una fuerte asociación de este padecimiento y alteraciones en el cromosoma 6p22.1, una región relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad y otras funciones inmunológicas. También, se han demostrado alteraciones en neurotransmisión serotoninérgica, dopaminérgica, noradrenérgica y glutamatérgica con un bajo nivel de neuroinflamación, que podría estar directamente involucrado en la generación de los síntomas de la enfermedad. Además, la pérdida del volumen del sistema nervioso central y la activación de la microglía ha sido demostrada en la esquizofrenia por estudios de radioimagen, donde se sustenta la suposición de la existencia de cierto nivel de neuroinflamación (Muller, 2014).

La microglía es el principal reservorio de citocinas proinflamatorias, como interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e interferón-gamma (INF- γ) y puede actuar como célula presentadora de antígeno en el SNC, comprende aproximadamente entre el 10% y 15% de las células del SNC (Muller, 2014), es la principal línea de defensa después de algún daño o enfermedad convirtiéndose en el principal componente de la neuroinflamación. Su activación, puede contribuir directamente a la degeneración neuronal por la producción de las citocinas antes dichas y especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas células pueden ser

activadas por patrones moleculares asociados a daño (DAMP's), así como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's). La respuesta inmunológica inicial de la microglía, se da por un primer estímulo que provoca la liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios y de activación, sin embargo, una reexposición al mismo estímulo está asociado a una respuesta igual o mayor, aunque el estímulo sea más débil. (Monji et al., 2013).

La activación microglial o aumento de densidad celular de microglía, ha sido sugerida en poblaciones de individuos con esquizofrenia, obtenida en estudios post-mortem, (Steiner et al., 2008). Las imágenes con tomografía computarizada por emisión de positrones (PET) han demostrado que existe microglía activa en pacientes con esquizofrenia dentro de los primeros cinco años de inicio de la enfermedad o en estado de psicosis agudos (Van Berckel et al., 2008). La activación prolongada de la microglía, puede llevar a apoptosis neuronal y daño cerebral (Block et al., 2005). Lo que sugiere, que este trastorno mantiene durante los años iniciales un estadio neurodegenerativo.

Receptores dopaminérgicos y el transportador de dopamina, en linfocitos de sangre periférica.

Aunque la etiología y la fisiopatología de la esquizofrenia no han sido descritas por completo, una de las teorías más aceptadas es la dopaminérgica, que propone un aumento en la actividad del neurotransmisor como causante del trastorno.

Los receptores de dopamina se dividen en dos grupos; los pertenecientes a la familia D1 (D1 y D5) y la familia D2 (D2, D3 y D4). La familia de los D2, se ha relacionado a la hipótesis

dopaminérgica (Ilani et al., 2001). Los estudios en cerebros postmortem de pacientes con esquizofrenia, donde se ha intentado medir la expresión de los receptores dopaminérgicos por medio de radioligandos o cuantificación de RNAm, han demostrado pérdida de D3 en la corteza parietal y motora, disminución de D3 y D4 en la corteza orbitofrontal y un aumento de D4 en núcleo estriado, pero la densidad de D2 permanece sin cambios en esas regiones. (Schmauss et al., 1993; Meador-Woodruff et al., 1997).

- Estudios con radioligandos

Los primeros estudios que compararon pacientes con esquizofrenia con controles sanos, por medio de antagonistas dopaminérgicos como ligandos, en linfocitos de sangre periférica se realizaron en la década de 1980, demostrando que hay una mayor unión del ligando a los linfocitos en los pacientes con el padecimiento que en los controles (Bondy et al., 1984 y 1985). Sin embargo, mucho se discutió sobre si estos sitios a los que se unía el ligando eran específicos para dopamina.

- Estudios con RNAm

Estudios más recientes, se han llevado a cabo en células mononucleares de sangre periférica. En 2001, se realizó uno de los primeros estudios midiendo la expresión de RNAm en linfocitos de sangre periférica de 14 sujetos con diagnóstico de esquizofrenia, tres de los cuales no tienen tratamiento farmacológico, comparados con 11 controles sanos; encontrando un aumento de 2-7 veces más de los niveles de D3, pero no de D4 en linfocitos. No se observó expresión de otros receptores, ni cambios de los resultados por la presencia del tratamiento

farmacológico, debido a que los tres pacientes sin tratamiento farmacológico mostraron un patrón de expresión del receptor igual a aquellos que si recibieron tratamiento (Ilani et al., 2001).

Alrededor de esas fechas, se llevó a cabo otro estudio en Corea que incluía 87 pacientes con esquizofrenia. En esta población se incluían pacientes con más de 3 años de tratamiento, sin medicamento por más de 3 meses y pacientes vírgenes que fueron comparados con 31 controles sanos pareado por edad y sexo. Realizaron mediciones de RNAm para D3 y D5 en linfocitos de sangre periférica; de acuerdo a sus resultados, hay un aumento de la expresión de D3 en pacientes vírgenes y sin tratamiento, comparados con los controles y con tratamiento farmacológico. No se observaron diferencias estadísticamente significativas de D5 en pacientes sin tratamiento comparados con los controles. Adicionalmente, los pacientes vírgenes y sin tratamiento, fueron separados de acuerdo al nivel expresión del receptor D3, aquellos que tenían más de dos desviaciones estándar correlacionaban con un mayor puntaje en el BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale) inicial. A las 8 semanas del inicio de tratamiento antipsicótico en aquellos que no tenían, se observó una disminución en la densidad del receptor, pero siempre por arriba de los controles (Kwak, YT et al., 2001).

Estos hallazgos, fomentaron la teoría de que el cambio de los receptores dopaminérgicos cerebrales también se veía reflejado en linfocitos de sangre periférica. Sin embargo, el uso de células mononucleares de sangre periférica para el análisis de la expresión de los receptores cuenta con una limitación importante, ya que la población celular se divide de forma inicial en linfocitos y monocitos; secundariamente los linfocitos se subdividen en B, T y natural killer, que son funcionalmente diferentes y no se puede asumir que la expresión

de los receptores será igual en diferentes líneas celulares, por lo tanto, se han empezado a estudiar poblaciones específicas.

En 2005, el Instituto de Biotecnología Thurgau en Suiza, analizó la expresión de RNAm receptores dopaminérgicos, por medio de PCR-TR, en 12 voluntarios sanos en las siguientes poblaciones celulares: neutrófilos, monocitos, células B, natural killers CD4+-T y CD8+-T. Se encontró que D1 y D2 no se expresaron, en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas. Por otra parte, D3 y D4 si se observaron en leucocitos, el primero específicamente en natural killers, T-CD4+ y T-CD8+; el segundo en T-CD4+. Posteriormente, se parearon los controles con diez pacientes con esquizofrenia en control por medio de fármacos (antipsicótico sin importa cuál fuera), observando una mayor expresión de ambos receptores en T-CD4+ en los pacientes con esquizofrenia (Boneberg et al., 2006).

- *El transportador de dopamina.*

Por otra parte, el transportador de dopamina (DAT), que es una glucoproteína de 80 kD, perteneciente a la familia de transportadores dependientes de Na^+/Cl^- , aunque está presente en corteza frontal, estriado e hipotálamo, las áreas de concentración son las vías mesolímbicas y mesocortical (Little KY, et al.1995), también ha sido estudiado como un probable marcador temprano del trastorno. Primero se demostró que en controles sanos se encuentran patrones similares de expresión en tejido cerebral y en linfocitos periféricos (Amenta F, et al. 2001; Mill J, et al. 2002). En 2010, se propuso al DAT como un marcador de efectos adversos a los antipsicóticos y se empezó a estudiar a D2, con la idea de que es éste el receptor blanco de la mayor parte de los antipsicóticos. En China, se estudiaron 52 pacientes, tanto resistentes a tratamiento, como primeros episodios o pacientes que tenían por

lo menos un mes de haber suspendido el medicamento; estos grupos fueron comparados contra 30 sujetos sanos. Los niveles de RNAm de DAT, fueron significativamente más altos en pacientes que en los controles y esta relación se mantuvo entre los primeros episodios y en pacientes sin tratamiento en comparación con los pacientes resistentes a tratamiento. Pero, no se encontró diferencia en la expresión de D2, entre la duración en años de la enfermedad, con los niveles de RNAm de DAT (Liu, L, et al. 2010)

- *Estudio de receptores serotoninérgicos en sangre periférica.*

Serotonina es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, en los últimos años se ha aceptado la teoría de una disfunción en este neurotransmisor agregado a dopamina, motivo por el cual es una de los blancos terapéuticos en los antipsicóticos de segunda generación.

Debido a las similitudes tanto morfológicas como bioquímicas entre los sinaptosomas del receptor 5-HT de las plaquetas con los del sistema nervioso, las primeras han sido utilizadas como un reflejo del segundo (Pletscher, 1988). En 1994, se clonó la secuencia de nucleótidos del DNAC para el receptor 5-HT_{2A} de las plaquetas en humanos, encontrando una secuencia idéntica a la reportada para la corteza frontal, excepto por el nucleótido 120 (Cook et al., 1994). De forma similar, se demostró que el sitio de recaptación de serotonina en las plaquetas era semejante al transportador cerebral (Lesch et al., 1993). Esto llevó a la propuesta de que los receptores serotoninérgicos en plaquetas pueden ser un reflejo de los receptores cerebrales, y que podrían servir en el estudio de los padecimientos neuropsiquiátricos.

En el 2000, en Tailandia se llevó a cabo un estudio con 31 pacientes con esquizofrenia, separados por el grupo de antipsicótico que estaban recibiendo, 6 sin tratamiento y 20 controles. Por medio del ligando [³H]speridone, se encontró mayor captación del mismo en plaquetas de pacientes sin tratamiento, que aquellos en tratamiento farmacológico y que los controles. Se demostró una mayor densidad de receptores 5-HT_{2A} en el primer grupo, la cual disminuía a las cuatro semanas del inicio del fármaco (Govitrapong, P et al., 2000). Estos mismos autores, en 2002 realizaron mediciones del transportador de serotonina en plaquetas de 42 pacientes con esquizofrenia, 6 de los cuales eran vírgenes a tratamiento por medio del radioligando [³H]imipramina, observando los mismos resultados que con el receptor de serotonina (Govitrapong, P et al., 2002).

Sin embargo, las únicas investigaciones realizadas en linfocitos de sangre periférica muestran resultados negativos. En Brasil, en 2012, se compararon 40 pacientes hospitalizados con esquizofrenia contra 40 controles pareados por edad y sexo; sin encontrar diferencias en la expresión de receptores serotoninérgicos, ni del transportador de dicho receptor en células T-CD8 y T-CD4, mientras que los resultados de los niveles de receptores dopaminérgicos fueron similares a los antes descritos (Brito-Melo, GE. et al., 2012).

Por lo tanto, podemos concluir que no contamos con suficiente evidencia de la correlación de la expresión de receptores serotoninérgicos en linfocitos periféricos y en sistema nervioso central, en comparación de lo reportado para los receptores dopaminérgicos.

2. JUSTIFICACIÓN

La Esquizofrenia es un trastorno mental grave. Es considerada por la OMS como una de las 10 enfermedades más incapacitantes, que inicia en la etapa más productiva de los pacientes (15-25 años de edad), predisponiéndolos a bajo desempeño educativo, laboral y social, además, su curso es crónico recurrente presentando normalmente recaídas que requieren en ocasiones más de una hospitalización al año. Una vez internados, los pacientes con Esquizofrenia requieren de estancias más largas para estabilizarse que cualquier enfermo con otro diagnóstico, generando altos costos económicos y sociales, haciendo de este padecimiento de relevancia en salud pública.

Hasta el día de hoy, no se tiene clara la etiología, para realizar el diagnóstico definitivo se requiere la observación clínica, que el paciente presente síntomas por un periodo mínimo de 6 meses, pero no se cuenta con marcadores biológicos precisos para identificar la enfermedad, ni una forma rápida y asertiva de realizar el diagnóstico para asegurar el mejor tratamiento de los pacientes en etapas tempranas resulta primordial, avanzar en estudios de esta índole.

El propósito de la investigación en estas áreas, es encontrar marcadores biológicos que permitan identificar a los pacientes de alto riesgo o en etapas tempranas de la enfermedad, para evitar, no sólo con la intención de ampliar nuestros conocimientos en estas áreas sino de poder brindar un mejor abordaje diagnóstico y terapéutico a los pacientes con este padecimiento, optimizando su pronóstico y funcionalidad en la sociedad, previniendo el deterioro funcional de los mismo que se ha observado en la evolución crónica del padecimiento.

Existen estudios que permiten asociar el sistema inmunológico, al sistema nervioso central por medio de la expresión de receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos en linfocitos de sangre periférica como marcadores biológicos del padecimiento, observando un incremento en los mismos en pacientes con esquizofrenia vírgenes a tratamiento y en aquellos que han suspendido el mismo por periodos prolongados, así como una disminución posterior al inicio del tratamiento. Siendo estos resultados prometedores, no han sido replicados en población latinoamericana, por lo cual se considera fundamental realizar estudios similares con muestras de pacientes mexicanos que permitan conocer la expresión de dichos marcadores y proponerlos como posibles estrategias diagnósticas en un futuro cercano.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe un aumento en la expresión de RNA mensajero de los receptores dopaminérgicos D3, D5, del transportador DAT, en linfocitos de sangre periférica en pacientes con esquizofrenia vírgenes y sin tratamiento farmacológico por más de 4 semanas en comparación con la población general previamente descrita?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la expresión de receptores dopaminérgicos en pacientes con esquizofrenia, vírgenes a tratamiento y en aquellos sin tratamiento farmacológico por al menos 4 semanas.

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar si existe una diferencia entre la expresión genética de los pacientes vírgenes a tratamiento con los que ya han tomado algún medicamento previamente.
2. Evaluar si existe influencia del tiempo de diagnóstico sin tratamiento con el nivel de expresión de los receptores y del transportador.
3. Evaluar si hay una distinción entre los niveles de expresión de RNA, de acuerdo a los puntajes del PANSS.

5. HIPÓTESIS

Existirá un aumento en los niveles de expresión de RNA mensajero de los receptores D3, D5 y del transportador DAT, en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con esquizofrenia vírgenes y sin tratamiento antipsicótico, en comparación con lo descrito en la literatura en población general.

6. PARTICIPANTES

6.1 Población clínica

La meta inicial era reclutar 12 pacientes, sin embargo, se logró juntar una muestra de 15 sujetos con diagnóstico de esquizofrenia de acuerdo al DSM-5, atendidos en el INPRF en los

servicios de Atención Psiquiátrica Continua (APC), consulta externa general y Clínica de Esquizofrenia y trastornos del espectro, vírgenes a tratamiento o que contaban con un periodo de al menos 4 semanas previas sin tratamiento.

6.1.1 *Criterios de inclusión:*

- Pacientes de sexo femenino y masculino de 18 a 55 años de edad.
- Con diagnóstico de esquizofrenia de acuerdo al DSM-5.
- Pacientes que a la fecha de inclusión al estudio no hubieran estado bajo tratamiento farmacológico en las últimas 4 semanas.
- Pacientes con consumo de café menor a dos tazas al día y consumo de alcohol menor a 3 copas por semana.
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

6.1.2 *Criterios de exclusión:*

- Pacientes que rechazaron la colaboración en el estudio y no firmaron el consentimiento informado.
- Pacientes con alteración en el estado de conciencia.
- Pacientes con otra comorbilidad psiquiátrica.
- Pacientes con diagnóstico clínico de discapacidad intelectual.
- Embarazo.
- Que cursaran con cualquier proceso infeccioso, activo o crónico.

- Pacientes que presentaran cualquier tipo de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes o enfermedades hemato-oncológicas.
- Pacientes con tratamiento inmunomodulador por cualquier causa.

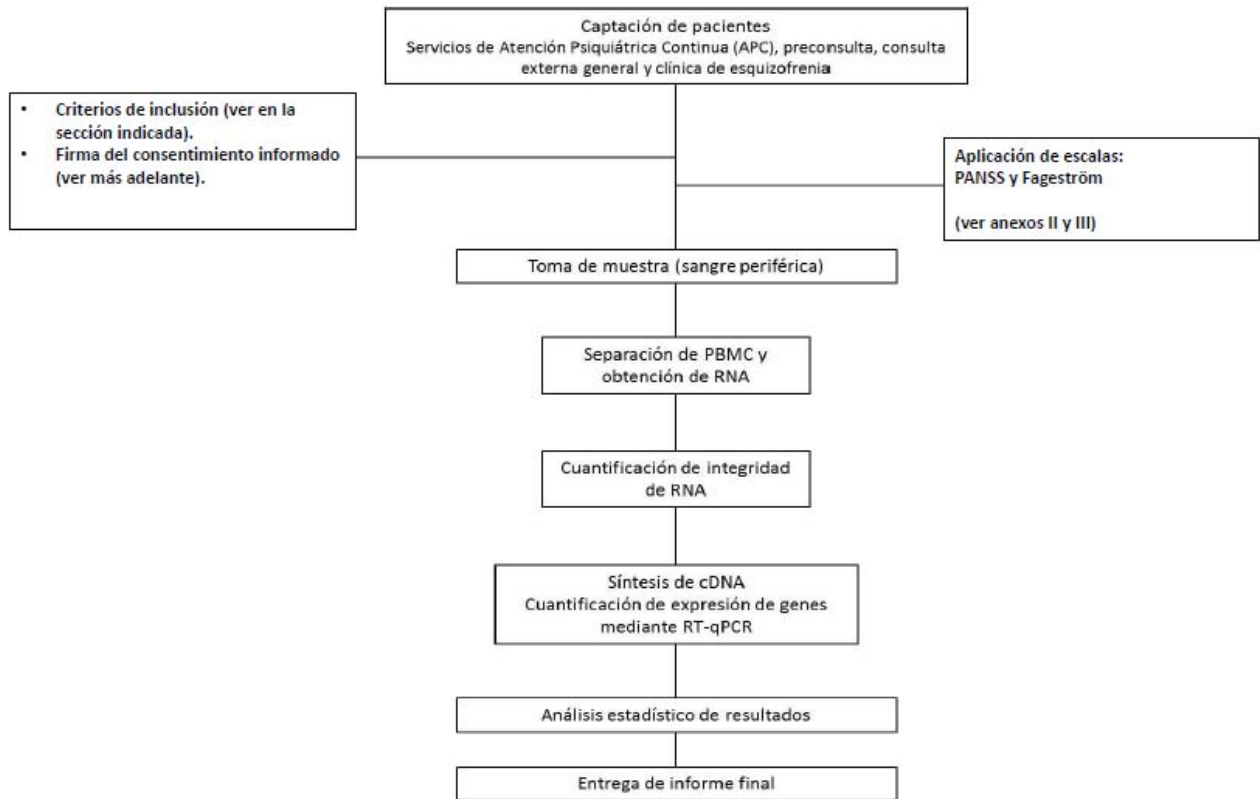
6.1.3 Criterios de eliminación:

- Pacientes cuya muestra sanguínea fue insuficiente para realizar las determinaciones del protocolo.
- Pacientes que decidieron suspender su participación en el estudio en cualquier momento del proceso.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Es un estudio transversal, descriptivo y observacional. Los procedimientos clínicos y experimentales de este protocolo siguieron el siguiente diagrama de trabajo:



Consideraciones éticas

El estudio se realizó con base en los postulados de Núremberg, Helsinki, Belmont y conforme a la ley General de Salud. Todos los participantes recibieron una explicación detallada de los objetivos y metas del estudio. Los datos recabados se protegieron con base en lo establecido por la ley federal de protección de datos personales; cada uno de los participantes firmó una carta de consentimiento informado que cumple con los criterios de ética y de confidencialidad. Se asignaron claves numéricas para la identificación de las muestras, así se evitó el uso de datos personales. Aprobado por el Comité de Ética Institucional el 19 de agosto de 2016.

Procedimientos:

Evaluación clínica

Todos los pacientes que participaron en el protocolo fueron evaluados por al llegar a nuestra institución, los que aceptaron participar, firmaron el consentimiento informado. Un médico especialista en psiquiatría los evaluó de manera clínica y con las siguientes escalas clinimétricas: La escala para el síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS) y el Test de Fagerström de dependencia a nicotina (Fagerström Test Nicotine Dependence, FTND). Ver anexos III, IV y V.

Obtención de la muestra

La obtención de la muestra de sangre periférica se realizó por punción venosa humeral, en el antebrazo por el personal capacitado del laboratorio clínico de Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. Se colectaron 25 mL de sangre venosa en un tubo con EDTA (Venoject® no Cat. VT-030STK), dos tubos con heparina de sodio (BD Vacutainer® no. Cat. 367878) y un tubo con activador de coágulo y gel separador (BD Vacutainer® no. Cat. 367988). La muestra en los tubos con heparina de sodio se utilizó para realizar análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo y obtención de células mononucleares de sangre periférica para el posterior aislamiento de RNA. La muestra en el último tubo descrito se usó para la obtención de alícuotas de suero del cual se obtendrá la cuantificación de neurotransmisores.

Obtención de suero

Para la obtención de suero se empleó la muestra del tubo con activador de coágulo y gel separador. El tubo se centrifugó a 1125 x g a 4°C por 15 minutos. El suero se dividió en tubos de 100 µL y se congelarán a -80°C para su posterior uso.

Separación de células mononucleares.

El volumen de muestra obtenido en tubos con heparina de sodio se diluyó 1:1 (v/v) con solución salina isotónica (SSI) y se homogenizó de manera lenta. La suspensión obtenida se colocó en tubos de polipropeno sobre Ficol-Histopaque (Sigma-Aldrich; St Luis, USA no. Cat. 10771) con una pipeta de transferencia, cuidando de no mezclar las fases. La proporción del gradiente corresponde a un volumen de Ficol por cada dos volúmenes de la suspensión sanguínea. Los tubos se centrifugaron a 461 x g por 30 minutos a 4°C. En condiciones de esterilidad se extrajo la capa correspondiente al concentrado de células mononucleares y se transfirió a un nuevo tubo. Para retirar el exceso de Ficol y plasma, se realizaron lavados con SSI y se centrifugaron a 461 x g por 10 minutos eliminando el sobrenadante por decantación. Posterior a los lavados se re-suspendieron las células y se adicionaron 1 mL de reactivo TRIzol® (Invitrogen Life Technologies no. Cat. 15596-018). Las muestras se almacenaron a -80°C para preservación e integridad del material genético hasta su uso para la extracción de RNA.

Aislamiento e integridad de RNA.

Se aisló el ácido ribonucleico RNA a partir de las células mononucleares re-suspendidos en 1 mL de TRIzol®; la muestra se mezcló 15 segundos con vortex y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionó 220 µL de cloroformo, se incubó por 5 minutos

en baño de hielo y se centrifugó a 9,300 x g por 15 minutos a 4 °C para separar la fase acuosa. Se precipitó el RNA mediante la adición de 520 µL de isopropanol, se incubó por 20 minutos en baño de hielo y se centrifugó a 9,300 x g por 15 minutos. El material genético se lavó con 1 mL de alcohol al 80%. La muestra se dejó secar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se re-suspendió en 25 µL de agua libre de RNAsas y DNAsas (agua Gibco). La concentración y la calidad del RNA obtenido se determinó mediante la lectura a 260 nm/280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop® (Fisher U.S.A.). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso para la síntesis de cDNA.

La integridad del RNA se evaluó mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2% cargando 1µg de RNA re-suspendido en agua Gibco y 1µL de GelRed™ (Biotium, CA, USA), utilizando TBE 1X como buffer de corrida y tomando como referencia de integridad GADPH y la subunidad ribosomal 18s.

Obtención de cDNA por retrotranscripción

Las muestras de RNA fueron tratadas con DNasa 1 (Invitrogen Life Technologies; CA, USA) para eliminar la contaminación con DNA genómico. La síntesis de cDNA (DNA complementario) se realizó a partir de 1 µg de RNA total en un volumen de reacción de 25 µL el cual contenía: 5 µL de Buffer 5x para Retro-Transcriptasa (Promega; WI, USA), 15 mM de MgCl₂, 1.25 µl de la mezcla dNTP 10 mM (Promega; WI, USA), 1U M-MLV transcriptasa reversa (Promega; WI, USA) y 1 µL de 10 mM OligodT (GE, UK). La mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos a 42°C en un termociclador (Gradient Thermocycler; Eppendorf, Germany) con un ciclo final de 90°C por 5 minutos.

Determinación de la expresión génica por RT-qPCR (Real Time Polimerase-quantitative-Chain Reaction).

La determinación cuantitativa de expresión génica se realizó mediante (RT-qPCR). Las reacciones de amplificación se determinaron mediante un sistema de PCR en tiempo real. Previamente a la determinación de los genes se calibraron cada uno de los genes para obtener una curva con valor de $r^2 \geq 0.99$ en diluciones ascendentes (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2). Cada mezcla de reacción consistió en un volumen final de 5 μL que estuvo constituido por 2.5 μL de Buffer TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.25 μL de Sonda TaqMan®, 1.75 μL de agua Gibco y 0.5 μL de cDNA como templado.

El programa de amplificación para todos los genes fue: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, posteriormente 20 ciclos a 95°C durante 15 segundos y por último un ciclo de 60°C por 1 minuto. Se realizó un nuevo periodo de las mismas características con 30 ciclos. Se utilizó como referencia y/o normalización al gen B-actina. La determinación de cada una de las muestras se realizó por duplicado.

A continuación, se muestran las sondas para cada uno de los genes:

Símbolo del gen	Sonda	No. De catálogo
β -Actina (house-keeping o normalizador)	Hs01060665_g1	4331182
DRD2	Hs00241436_m1	4331182
DRD3	Hs00364455_m1	4331182
DRD5	Hs00361234_s1	4331182

SLC6A3 (DAT)	Hs00997374_m1	4331182
--------------	---------------	---------

Análisis estadístico

- Estadística descriptiva: características demográficas y clínicas de la población.
- Mediana o media como medida de tendencia central en las variables continuas y desviación estándar y los rangos intercuartiles para determinar la dispersión, dependiendo de la distribución de las variables.
- Las variables dicotómicas o categóricas se informarán como proporciones.
- Comparación de variables entre los grupos: se realizó por medio de ANOVA de una vía para datos paramétricos y no paramétricos (Kruskal-Wallis). Para los datos paramétricos, se ajustó el valor de p por medio del Test de Tukey; y para los no paramétricos a través del Test de Dunn. Todo el análisis y las gráficas se llevó a cabo por medio de GraphPad Prism 7.03.

Definición de grupos:

- Controles: sujetos sanos pareados por edad y sexo con los participantes del estudio que no tuvieran antecedente de consumo de sustancias.
- Vírgenes: pacientes con diagnóstico de esquizofrenia de acuerdo a los criterios diagnósticos del DSM-5 que no habían recibido psicofármacos previamente.
- Lavados: pacientes con diagnóstico de esquizofrenia de acuerdo a los criterios diagnósticos del DSM-5 que habían recibido tratamiento antipsicótico previo, pero que lo habían suspendido por al menos 4 semanas previo al ingreso al estudio.

Resultados

Datos demográficos

En total se reclutaron 15 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, que cumplieron los criterios de inclusión para el estudio, los cuales acudieron a atención en el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, entre marzo de 2016 y febrero de 2017.

El sexo masculino predominó en los casos estudiados (53.3%), con una edad promedio de 35 (± 12.40) años. El 46.6% contaban con un IMC normal, sólo una paciente tenía diagnóstico previo de Diabetes Mellitus tipo 2, en control.

En cuanto a las características basales de la enfermedad, en los sujetos estudiados se obtuvo lo siguiente: en promedio cada paciente tenía al menos 46.20 (± 11.4) meses con el diagnóstico, del total 5 eran vírgenes a tratamiento y no habían tenido contacto con algún psiquiatra previo. De los pacientes lavados, en promedio contaban con 43.87 (± 61.2) semanas sin tratamiento; 7 (46.7%) habían recibido como tratamiento previo con un antipsicótico de segunda generación, que habían suspendido por decisión propia. Ninguno cumplía criterios de resistencia a tratamiento, ni con otro diagnóstico psiquiátrico que implicara consumo de algún psicofármaco.

De la muestra total, ninguno consumía sustancias, incluyendo alcohol, en el último año previo al ingreso del protocolo. En cuanto al consumo de nicotina, 4 pacientes fumaban (26.7%), con rango de puntuación en el Fagërstrom de 0-8, indicando dependencia leve.

En la tabla 1 se muestra el resumen de las características de la población.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes reclutados	
Características	N (% o rango)
Edad (años)	35 (21-55)
Mujeres <i>n</i> (%)	7 (46.7%)
Hombres <i>n</i> (%)	8 (53.3%)
IMC:	
Normal <i>n</i> (%)	7 (46.7%)
Sobrepeso <i>n</i> (%)	4 (26.7%)
Obesidad <i>n</i> (%)	4 (26.7%)
Exposición previa a antipsicóticos:	
Vírgenes <i>n</i> (%)	5 (33.3%)
Lavados <i>n</i> (%)	10 (66.7%)
PANSS (puntos)	
Positivo	32.60 (16-44)
Negativo	23.27 (9-41)
Cognitivo	21.27 (14-28)
Excitabilidad	10.20 (4-15)
General	11.27 (6-16)
Consumo de nicotina <i>n</i> (%)	4 (26.7%)

Resultados de la expresión de receptores y transportador de dopamina

Una vez obtenido los datos de la expresión de RNA para los receptores y el transportador de dopamina, se realizaron pruebas para conocer la distribución de los mismos (Shapiro Wilk). Para el receptor DRD3 y DAT (transportador de dopamina), se obtuvo una distribución normal de los datos para cada uno de los grupos. En cuanto a la determinación de la expresión de DRD5 los sujetos controles tenían una distribución normal, mientras que los pacientes vírgenes y lavados no tenían un comportamiento *gaussiano*. Los datos para cada grupo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Test De Normalidad De Shapiro-Wilk

	Control (Valor de p)	Vírgenes (Valor de p)	Lavados (Valor de p)
DRD3	0.7326	0.5983	0.5768
DRD5	0.1876	0.0236	0.0144
DAT	0.6755	0.1856	0.2853

Para DRD3 y DAT, se analizaron diferencias entre grupos por medio de ANOVA de una vía para datos paramétricos. La expresión de DRD3 se encontró disminuida en pacientes vírgenes y lavados comparados con el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0023$), mientras que no se encontró diferencia entre los diferentes grupos en la expresión de DAT ($p=0.684$), de igual modo no existió diferencia tanto en DRD3 como DAT al comparar sujetos vírgenes vs lavados. En cuanto el análisis

de DRD5 no se encontró diferencia significativa entre los tres grupos (tabla 3).

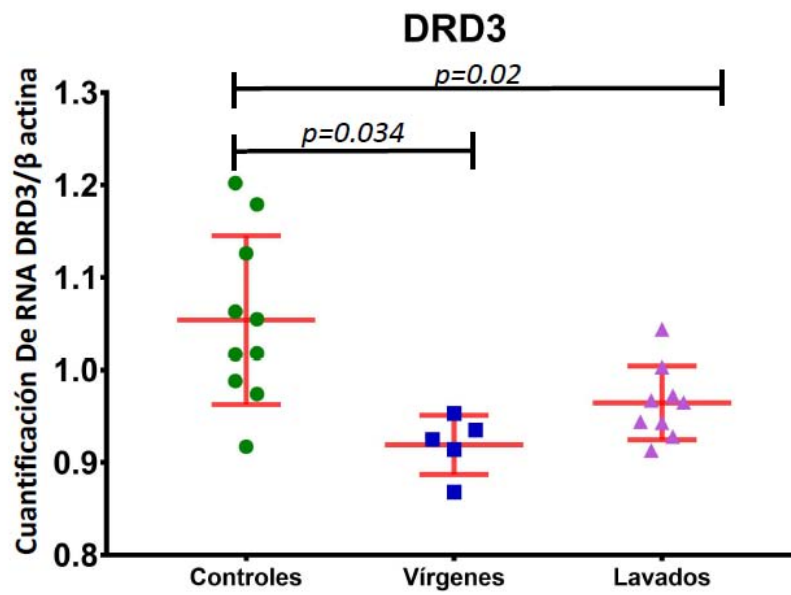
Tabla 3. Datos estadísticos por grupos		
<i>Grupo</i>	<i>Medias</i> <i>(DE)^e</i>	<i>F</i>
DRD3^a		
<u>Control</u>	1.054 (0.09128)	8.21, 21 gl ^d , <i>p</i> = 0.0023*
<u>Virgenes</u>	0.919 (0.03191)	
<u>Lavados</u>	0.9643 (0.03989)	
DAT^b		
<u>Control</u>	1.107 (0.087)	0.3881, 17 gl ^d , <i>p</i> =0.6842
<u>Virgenes</u>	1.151 (0.06776)	
<u>Lavados</u>	1.122 (0.07706)	
DRD5^c		
<u>Control</u>	0.927 (0.06692)	NA
<u>Virgenes</u>	0.846 (0.09841)	
<u>Lavados</u>	0.865 (0.0622)	

a.	Receptor de dopamina D3	
b.	Trasportador de dopamina	
c.	Receptor de dopamina D5	
d.	Grados de libertad	
e.	Desviación estándar	

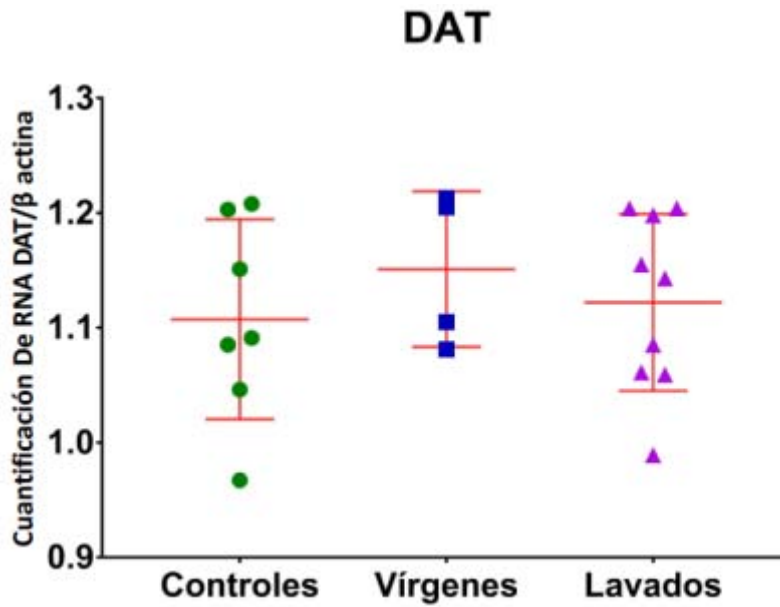
Tabla 4. Comparación por grupos, de los niveles de expresión de RNA/ β actina.

	<i>Vírgenes</i>	<i>Lavados</i>
GRUPO DRD3		
<i>Control</i>	$p = 0.0034^*$	$p = 0.0201^*$
<i>Vírgenes</i>		$p = 0.4496$
GRUPO DAT		
<i>Control</i>	$p = 0.6595$	$p = 0.9282$
<i>Vírgenes</i>		$p = 0.8171$
GRUPO DRD5		
<i>Control</i>	$p = 0.1780$	$p = 0.4597$
<i>Vírgenes</i>		$p = >0.9999$

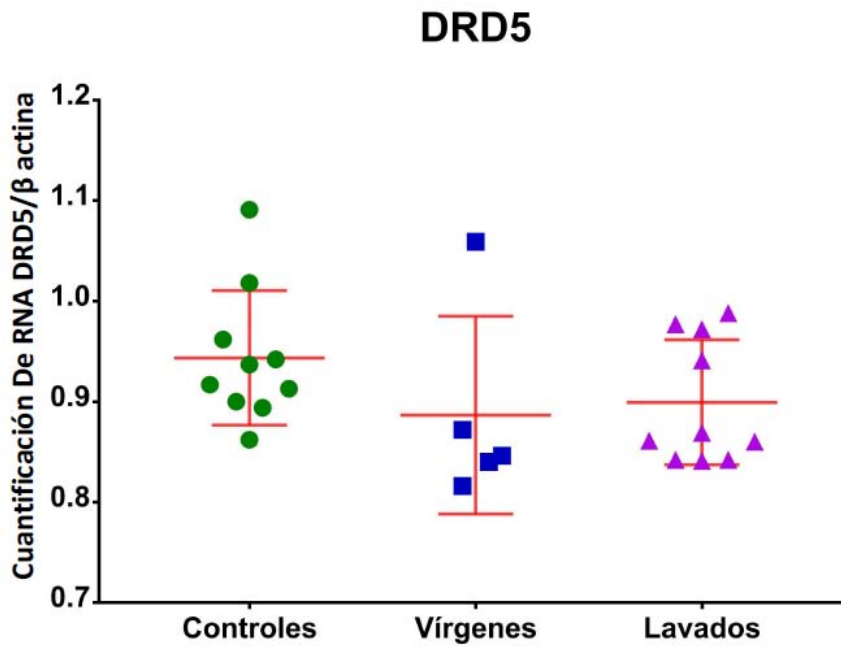
🚩 Graficas



Gráfica 1. Cuantificación de los niveles de expresión de RNA del receptor DRD3, de forma individual y la comparación por grupos.



Gráfica 2. Cuantificación de los niveles expresión de RNA del receptor DAT de forma individual y la comparación por grupos.



Gráfica 3. Cuantificación de los niveles expresión de RNA del receptor DRD5, de forma individual y la comparación por grupos.

Discusión

Existe un gran interés, para identificar biomarcadores que permitan establecer de manera temprana el diagnóstico de esquizofrenia y vigilar la respuesta al tratamiento. Actualmente, uno de los campos prometedores es sobre los receptores dopaminérgicos en células mononucleares de sangre periférica. Sin embargo, los estudios en humanos están hechos en su mayoría con radioligandos para receptores de dopamina, por lo que los resultados no son del todo específicos. Como una nueva estrategia, surgió la cuantificación de RNA receptores de dopamina en células de sangre periférica.

La caracterización de la expresión de los receptores células en sangre periférica, se ha realizado y los resultados encontrados muestran que existe expresión aislada de DRD5 de la familia D1, mientras que de la familia D2, se logró identificar los diferentes subtipos (D2, D3 y D4), (Boneberg et al., 2006).

Con respecto a DRD5, tiene una secuencia de nucleótidos muy similar a D1, se encuentra localizada principalmente en hipocampo y tálamo, por lo que se ha relacionado a la presencia de síntomas cognitivos y negativos, aunque hasta el momento no es clara su influencia en la enfermedad. En nuestro estudio encontramos que no existen diferencias entre la población sana y los pacientes con esquizofrenia en la expresión de DRD5, los hallazgos fueron similares reportes previos (Kwak, YT et al., 2001 y Boneberg et al., 2006).

En cuanto a la expresión de DAT, encontramos únicamente dos estudios previos que han trabajado sobre esta variable. Uno de ellos, utilizó radioligandos y el otro PCR (Liu L, et al. 2010; Marazziti D, et al. 2010). En ambos, se describe aumento en la expresión del

transportador, lo que contrasta con nuestros grupos experimentales, a diferencia de este antecedente, no se encontró diferencia en la expresión de DAT en población sana, en comparación con población portadores del padecimiento. Esto, se puede deber a dos factores: primero, el tamaño de nuestra muestra, la cual es más pequeña que lo reportado y segundo, la técnica que se empleó en nuestro estudio, que fue PCR cuantitativa. La última cuenta con la ventaja sobre la convencional, de ser más sensible ya que tiene menos probabilidad de contaminación y los datos son tomados de la fase exponencial de la amplificación, reduciendo así los falsos positivos (KAPA Library Quantification Technical Guide, 2014).

En nuestros resultados, encontramos una marcada disminución de la amplificación DRD3, sobre todo de pacientes vírgenes a tratamiento, que persiste en los lavados, aunque en menor grado. De acuerdo a lo reportado en los estudios previos realizados en humanos (Kwak, YT et al., 2001 y Boneberg et al., 2006), existe una mayor expresión del mismo, especialmente en pacientes vírgenes a tratamiento. Aunque esto, podemos inferir que esto se debe al incremento general de dopamina de forma prolongada, ya que la mayoría de nuestros pacientes tienen una patología de larga evolución, lo que provoca un efecto de *down regulation* en los receptores periféricos, a diferencia de los centrales. Los altos niveles de dopamina, modificarán a largo plazo la expresión de dichos receptores como medio compensatorio, mismo que se regularía posterior al inicio del tratamiento. Se observó en los pacientes crónicos que recibieron tratamiento farmacológico, en los que persiste la disminución de la expresión del RNA, pero que es menor que en los vírgenes. Una explicación, es el posible impacto a nivel genético a largo plazo del tratamiento farmacológico. Aunque no tenemos claro en qué momento del tratamiento o cuánto tiempo se requiere para generar esta modificación, ya que la mayor parte de nuestros pacientes

abandonaron el tratamiento al año de haber recibido el mismo. En estudio previos, han encontrado que a las 8 semanas hay una regularización en los niveles de amplificación en todos los pacientes, ya sean vírgenes o lavados (Kwak, YT et al., 2001). Otra posibilidad, que hemos de tomar en cuenta para la diferencia en los resultados, es el método de procesamiento de las muestras, la mayor parte de los ensayos pasados se realizaron por medio de radioligandos o PCR en tiempo real, somos el primer grupo en llevar a cabo PCR cuantitativa, que mejora la confiabilidad de los resultados ya que como se describió previamente, debido al procedimiento de la técnica es menor la probabilidad de contaminación y permite cuantificar en tiempo real mientras se realiza la fase exponencial por medio de la fluorescencia únicamente los segmentos de DNA deseados.

A pesar de la relación ya descrita de los síntomas positivos de esquizofrenia y los niveles de dopamina, no encontramos correlación entre la expresión de los receptores y la valoración clínica estandarizada (PANSS), ni con el tiempo transcurrido con la enfermedad.

Las limitaciones de nuestro estudio, en primer lugar, es el tamaño de muestra, ya que contamos con una n pequeña, derivado de los problemas de reclutamiento, todos nuestros pacientes se encontraban en un episodio agudo lo que dificultaba que aceptaran participar en el proyecto, lo que dificultó obtener un muestra mayor y por ende, en los niveles de amplificación del transportador de dopamina, a diferencia de los otros estudios con tamaño de muestra mayores. Además, de la diferencia entre los controles y los sujetos de estudio, ya que, aunque fueron pareados por edad y sexo, no contamos con los antecedentes étnicos exactos de cada uno lo que puede influir en la expresión basal del RNA. Y por último, el hecho de que no separamos las células en subpoblaciones, únicamente se tomaron células mononucleares, pero por motivos económicos y de tiempo, no se realizó específicamente en

poblaciones linfocitarias o neutrófilos, que a largo plazo ayudaría a establecer un marcador con mayor confiabilidad, para tomarlo con un biomarcador específico para la enfermedad.

En cuanto a las fortalezas, este estudio, es el primer ensayo realizado en población mexicana con esquizofrenia que busca definir la utilidad de la cuantificación de receptores dopaminérgicos en sangre periférica, para diagnóstico y seguimiento de esta patología. Nuestro estudio permitirá continuar el seguimiento de los pacientes y ampliar la muestra estudiada para fortalecer nuestros resultados. Además a partir, de éste se pueden realizar nuevos proyectos para comprobar la modificación de la expresión de los niveles de receptores con el tratamiento a lo largo del tiempo y si existe alguna diferencia con los pacientes que son resistentes a tratamiento.

Conclusión

Existe una diferencia en los niveles de expresión de RNA, que nos habla de una disminución del procesamiento específicamente de los receptores dopaminérgicos tipo D3, sugiriendo un aumento a nivel sistémico de los valores séricos de dopamina concordando con el episodio agudo donde destacan los síntomas positivos de la enfermedad por medio del PANSS. Es necesario continuar estudiando este fenómeno, en nuestra población con mayor número de muestra y la respuesta al tratamiento, para lograr establecer a largo plazo la posibilidad de un biomarcador en este padecimiento.

8. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	1 trimestre 2016	2 trimestre 2016	3 trimestre 2016	4 trimestre 2016	1 trimestre 2017	2 trimestre 2017
Entrega corrección de protocolo	X					

Comité de Ética en Investigación.	X					
Captura de pacientes	X	X	X	X		
Entrega de primer avance		X				
Tratamiento/Toma de muestras y aplicación de escalas	X	X	X	X		
Seguimiento clínico de pacientes ya ingresados al estudio	X	X	X	X		
Entrega de segundo avance			X	X		
Entrega de tercer avance						
Análisis de resultados					X	
Entrega de cuarto avance					X	
Entrega de tesis terminada						X
Entrega de tesis impresa						X

9. REFERENCIAS

1. Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jul 1;25(13):2657-60.
2. Amenta F, Bronzetti E, Cantalamessa F, El-Assouad D, Felici L, Ricci A, Tayebati SK. Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2001 Jul 2;117(1-2):133-42.
3. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 2005 Jun;76(2):77-98.

4. Bondy B, Ackenheil M, Birzle W, Elbers R, Fröhler M. Catecholamines and their receptors in blood: evidence for alterations in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1984 Oct;19(10):1377-93.
5. Bondy B, Ackenheil M, Elbers R, Fröhler M. Binding of 3H-spiperone to human lymphocytes: ¿a biological marker in schizophrenia? *Psychiatry Res*. 1985 May;15(1):41-8.
6. Boneberg EM, von Seydlitz E, Pröpster K, Watzl H, Rockstroh B, Illges H. D3 dopamine receptor mRNA is elevated in T cells of schizophrenic patients whereas D4 dopamine receptor mRNA is reduced in CD4+ -T cells. *J Neuroimmunol*. 2006 Apr;173(1-2):180-7.
7. Brito-Melo GE, Nicolato R, de Oliveira AC, Menezes GB, Lélis FJ, Avelar RS, Sá J, Bauer ME, Souza BR, Teixeira AL, Reis HJ. Increase in dopaminergic, but not serotonergic, receptors in T-cells as a marker for schizophrenia severity. *J Psychiatr Res*. 2012 Jun;46(6):738-42.
8. Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry*. 2010 Mar;167(3):261-80.
9. Cook EH Jr, Fletcher KE, Wainwright M, Marks N, Yan SY, Leventhal BL. Primary structure of the human platelet serotonin 5-HT2A receptor: identify with frontal cortex serotonin 5-HT2A receptor. *J Neurochem*. 1994 Aug;63(2):465-9.
10. Eaton WW, Byrne M, Ewald H, Mors O, Chen CY, Agerbo E, Mortensen PB. Association of schizophrenia and autoimmune diseases: linkage of Danish national registers. *Am J Psychiatry*. 2006 Mar;163(3):521-8.

11. Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, Williams GV. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 Jun;174(1):3-16
12. Govitrapong P, Chagkutip J, Turakitwanakan W, Srikiatkachorn A. Platelet 5-HT(2A) receptors in schizophrenic patients with and without neuroleptic treatment. *Psychiatry Res*. 2000 Sep 25;96(1):41-50.
13. Govitrapong P, Mukda S, Turakitwanakan W, Dumrongphol H, Chindaduangratn C, Sanvarinda Y. Platelet serotonin transporter in schizophrenic patients with and without neuroleptic treatment. *Neurochem Int*. 2002 Oct;41(4):209-16.
14. Hoff P. Eugen Bleuler's concept of schizophrenia and its relevance to present-day psychiatry. *Neuropsychobiology*. (2012) 66(1):6-13.
15. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Meinel E. Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology*. 2007 May 29;68(22 Suppl 3): S58-63.
16. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005 Jun;6(4):279-84.
17. Ilani T, Ben-Shachar D, Strous RD, Mazor M, Sheinkman A, Kotler M, Fuchs S. A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D3 dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):625-8.
18. KAPA Library Quantification Kits for Illumina® platforms, Technical Guide, v1.14, 2014.
19. Kapur S, Remington G. Dopamine D2 receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. *Biol Psychiatry*. 2001 Dec 1;50(11):873-83.

20. Kringlen E. Twin studies in schizophrenia with special emphasis on concordance figures. *Am J Med Genet.* 2000 Spring;97(1):4-11.
21. Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology.* 2001 Oct;25(4):455-67.
22. Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. *Schizophr Res.* 2008 Dec;106(2-3): 89-107.
23. Kwak YT, Koo MS, Choi CH, Sunwoo I. Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients. *BMC Med Genet.* 2001; 2 :3.
24. Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem.* 1993 Jun;60(6):2319-22.
25. Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK; Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med.* 2005 Sep 22;353(12):1209-23.
26. Little KY, Carroll FI, Cassin BJ. Characterization and localization of [¹²⁵I] RTI-121 binding sites in human striatum and medial temporal lobe. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Sep;274(3):1473-83.
27. Liu L, Yuan G, Cheng Z, Zhang G, Liu X, Zhang H. Identification of the mRNA expression status of the dopamine D2 receptor and dopamine transporter in peripheral blood lymphocytes of schizophrenia patients. *PLoS One.* 2013 Sep 25;8(9).

28. Marazziti D, Catena Dell'osso M, Baroni S, Masala I, Dell'Osso B, Consoli G, Giannaccini G, Betti L, Lucacchini A. Alterations of the dopamine transporter in resting lymphocytes of patients with different psychotic disorders. *Psychiatry Res.* 2010 Jan 30;175(1-2):54-7.
29. Meador-Woodruff JH, Haroutunian V, Powchik P, Davidson M, Davis KL, Watson SJ. Dopamine receptor transcript expression in striatum and prefrontal and occipital cortex. Focal abnormalities in orbitofrontal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1997 Dec;54(12):1089-95.
30. Medzhitov R. Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity. *J Immunol.* 2013 Nov 1;191(9):4473-4.
31. Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I. Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet.* 2002 Dec 8;114(8):975-9.
32. Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Yamauchi Y, Yamada S, Kanba S. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013 Apr 5; 42:115-21.
33. Müller N. Immunology of schizophrenia. *Neuroimmunomodulation.* 2014;21(2-3):109-16.
34. National Collaborating Centre for Mental Health (UK). *Psychosis and Schizophrenia in Adults: Treatment and Management: Updated Edition 2014.* London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2014.

35. OMS. Esquizofrenia. Nota descriptiva N° 397 (2014) (accessed 15 de julio de 2015, 2015).
36. Pletscher A. Platelets as models: use and limitations. *Experientia*. 1988 Feb 15;44(2):152-5.
37. Ribeiro-Santos A, Lucio Teixeira A, Salgado JV. Evidence for an immune role on cognition in schizophrenia: a systematic review. *Curr Neuropharmacol*. 2014 May;12(3):273-80.
38. Steiner J, Bielau H, Brisch R, Danos P, Ullrich O, Mawrin C, Bernstein HG, Bogerts B. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res*. 2008 Jan;42(2):151-7.
39. Swartz MS, Perkins DO, Stroup TS, Davis SM, Capuano G, Rosenheck RA, Reimherr F, McGee MF, Keefe RS, McEvoy JP, Hsiao JK, Lieberman JA; CATIE Investigators.. Effects of antipsychotic medications on psychosocial functioning in patients with chronic schizophrenia: findings from the NIMH CATIE study. *Am J Psychiatry*. 2007 Mar;164(3):428-36.
40. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res*. 2008 Jul;102(1-3):1-18
41. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, "just the facts" 5. Treatment and prevention. Past, present, and future. *Schizophr Res*. 2010. Sep;122(1-3):1-23.
42. Van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitmaker A, Caspers E, Luurtsema G, Windhorst AD, Cahn W, Lammertsma AA, Kahn RS. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*. 2008 Nov 1;64(9):820-2.

Carta de consentimiento informado para participantes

Cuantificación de la expresión de receptores dopaminérgicos, en células mononucleares de sangre periférica, en pacientes con Esquizofrenia sin tratamiento.

Código para el estudio: _____

Se le invita a participar en un estudio de investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, su participación es voluntaria. Lea con cuidado la siguiente información, todas sus preguntas serán contestadas, no dude en preguntar.

Justificación del estudio:

La esquizofrenia es una enfermedad degenerativa y crónica cuyo origen no está claro; pero existen múltiples estudios que demuestran el aumento de los niveles de ciertas sustancias cerebrales; llamadas neurotransmisores (serotonina y dopamina), como un potencial desencadenante de la enfermedad. Sin embargo, no es posible medir dichos neurotransmisores de forma habitual, por su localización en el sistema nervioso. Se han hecho investigaciones en pruebas en sangre, como una equivalencia de la expresión cerebral de estas sustancias; no obstante, no hay un estudio en nuestra población que permita comprobar

esta información y al mismo tiempo conocer cómo es que la evolución de la enfermedad, así como el tratamiento afectan dicha manifestación, o si las alteraciones observadas pueden ser asociadas al tratamiento.

Objetivo del estudio:

Evaluar la expresión de los receptores de dopamina en células mononucleares de sangre periférica, en pacientes con esquizofrenia que no han recibido tratamiento o que lo han suspendido por al menos 4 semanas.

Comparar la expresión de receptores de dopamina en células mononucleares de sangre periférica entre sujetos sano y sujetos con esquizofrenia que con o sin exposición previa a tratamiento farmacológico

Procedimiento del estudio:

Su participación es voluntaria, si usted acepta participar en este estudio, será entrevistado y evaluado por un médico psiquiatra. Primero se le realizarán una serie de preguntas con el fin de obtener información respecto a su edad, género, estado civil, escolaridad y religión, que serán registradas en una hoja de datos, posteriormente se realizarán tres cuestionarios para conocer el estado de la enfermedad en el momento, evaluar su apego al tratamiento y la cantidad de cigarros que fuma (en caso de que usted fume), esto no tomará más de 1 hora. Además, se extraerá una muestra de sangre mediante un piquete en la parte interior del brazo; la cantidad de sangre que se sacará es de aproximadamente 25 mL, que es menor en comparación, la cantidad de sangre que se toma en una donación de sangre para la Cruz Roja es de 450mL. A partir de esta muestra se obtendrán células sanguíneas para cuantificar los niveles de dopamina y serotonina antes explicados.

El riesgo por la extracción de sangre es mínimo, se trata de un dolor leve o la aparición de un moretón, sin embargo, la sangre será extraída por un técnico experimentado para tratar de evitarlos. Todos los materiales que se utilicen serán nuevos, estériles y serán abiertos en su presencia. En caso de que este procedimiento llegara a provocar una lesión recibirá la atención médica necesaria por parte de los médicos e investigadores involucrados en el estudio; los cuales serán responsables de los gastos originados únicamente por las lesiones secundarias o los procedimientos que se lleven a cabo durante la investigación. En caso de que no acepte que su muestra sea empleada en futuros estudios, esta será destruida una vez que se terminen los análisis de esta investigación.

Consignas a seguir:

1. Se solicitará su cooperación como participante para contestar la entrevista.
2. Las entrevistas y las escalas serán sin costo económico alguno.
3. En caso de cambiar de opinión o decidir, por cualquier motivo, no colaborar en el estudio, puede retirarse de él en cualquier momento en que usted lo decida, le solicitamos nos lo informe. Esto no afectará la calidad del trato en el hospital o en su futuro tratamiento.
4. Se solicitará su cooperación como participante para obtener una muestra de sangre.

Beneficios:

1. Su participación en el estudio le permitirá conocer a usted y a su médico tratante, si así lo desea usted, los resultados de las escalas aplicadas y de los estudios de laboratorio, como parte de la evaluación de la respuesta al tratamiento.

Estaría usted de acuerdo en que la información obtenida sea compartida con su médico tratante, por si su médico tiene alguna recomendación con base en el tratamiento.

Sí

No

¿Estaría usted de acuerdo en que consultemos su expediente clínico para recabar los datos de su análisis de biometría hemática (BH) realizada el día de toma de la muestra para este estudio para calcular porcentajes de células sanguíneas?

Sí

No

Nombre y firma del Participante: _____

Confidencialidad:

Los datos obtenidos durante el estudio son completamente confidenciales. No se utilizará el nombre de ningún participante. Se le asignará un código numérico para la identificación de las muestras con el propósito de salvaguardar su anonimato. Su nombre no aparecerá en ningún reporte o publicación. La información que usted le brinde al investigador en ningún momento será comunicada a otra persona ajena a este estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído la carta de consentimiento informado y entiendo de qué se trata el estudio. He hablado directamente con el responsable del estudio y ha contestado todas mis preguntas en términos que he podido entender. Puedo hacer cualquier pregunta en cualquier momento de la investigación.

ACEPTO VOLUNTARIAMENTE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO.

Entiendo que puedo suspender mi participación en el estudio en cualquier momento sin que esto tenga consecuencias en mi relación con la institución. Mi identidad no será revelada en ninguna referencia del estudio o sus resultados. Además, recibí una copia de la carta de consentimiento.

Si requiere información adicional o cualquier duda al respecto del estudio, puede comunicarse con el Dr. Raúl Iván Escamilla Orozco, jefe de la Clínica de Esquizofrenia, del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, ubicado en la calzada México-Xochimilco No. 101, colonia San Lorenzo Huipulco, en la delegación Tlalpan, en el edificio de Servicios Clínicos, módulo B de 08:00 a 14:00 horas; o también a los teléfonos 41605263. O con la Dra. Areli López Alvarado, Clínica de Esquizofrenia del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, ubicado en la calzada México-Xochimilco No. 101, colonia San Lorenzo Huipulco, en la delegación Tlalpan, en el edificio de Servicios Clínicos, módulo B de 08:00 a 17:00 horas

Nombre del participante

Firma del participante

Fecha

Nombre del Investigador

Firma del Investigador

Fecha

Nombre del Testigo 1	Firma del Testigo 1	Fecha
----------------------	---------------------	-------

Nombre del Testigo 2	Firma del Testigo 2	Fecha
----------------------	---------------------	-------

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA EL RESGUARDO DE MESTRAS BIOLÓGICAS

Nombre del proyecto: Cuantificación de la expresión de receptores dopaminérgicos, en células mononucleares de sangre periférica, en pacientes con Esquizofrenia sin tratamiento.

Usted aceptó participar en el presente estudio que tiene como objetivo evaluar las alteraciones sistema de defensa del cuerpo, como un reflejo de lo que sucede en el sistema nervioso, en los diferentes periodos que atraviesan los pacientes con la misma enfermedad que se le ha diagnosticado a usted. Sin embargo, existe una gran cantidad de alteraciones que pueden presentarse en esta enfermedad, que van más allá de las posibilidades de este proyecto y que por lo tanto por el momento no se puede evaluar. De tal manera se le invita a que su muestra sea almacenada por 5 años, bajo el resguardo del Dr. Lenin Pavón Romero en el Laboratorio de Psicoimmunología, para que en el futuro puedan ser analizados otras alteraciones del sistema inmunológico o de defensa que permitan tener mayor conocimiento sobre el desarrollo de la enfermedad. Cumpliendo 5 años su muestra será destruida.

Su muestra será manejada por medio de códigos numéricos que hacen imposible su identificación. La numeración de su número de identificación sólo será registrada en formatos de investigación bajo resguardo del Dr. Lenin Pavón Romero. Si los datos de investigación son presentados su identidad nunca será revelada.

Si usted no desea que su muestra permanezca almacenada, ésta se destruirá inmediatamente después de concluir los análisis del presente estudio, sin que se vea afectada la atención médica que recibe de esta institución.

Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, por favor comuníquese con el investigador principal, el Dr. Raúl Iván Escamilla Orozco al número telefónico 41605263 o con el Dr. Lenin Pavón Romero al número telefónico 41605082 u 83, en horarios regulares de trabajo. Estoy de acuerdo que las muestras de la toma de sangre sean almacenadas en el Laboratorio de Psicoimmunología para futuros estudios relacionados a los objetivos de este proyecto:

SI NO

Nombre y firma del participante: _____ Fecha: _____

ANEXO I
(Criterios diagnósticos)

- A. La aparición concomitante de dos o más de los siguientes síntomas, cada uno de ellos presente por un lapso de tiempo significativo durante un periodo de un mes (o menos si ha sido tratado con éxito). Al menos uno de ellos debe ser uno de los primeros tres mencionados.
- Ideas delirantes.
 - Alucinaciones.
 - Lenguaje desorganizado (por ejemplo, descarrilamiento infrecuente o incoherencia).
 - Comportamiento catatónico o gravemente desorganizado.
 - Síntomas negativos, por ejemplo, aplanamiento afectivo, alogia o abulia.
- B. Durante una parte significativa del tiempo desde el inicio de la alteración, una o más áreas importantes de actividad, están claramente por debajo del nivel previo al inicio del trastorno (o, cuando el inicio es en la infancia o adolescencia, fracaso en el rendimiento interpersonal, académico o laboral).
- C. Persisten signos continuos de la alteración durante al menos 6 meses. Este período debe incluir al menos 1 mes de síntomas que cumplan el Criterio A (o menos si se ha tratado con éxito) y puede incluir los períodos de síntomas prodrómicos y residuales.
- D. El trastorno esquizoafectivo y el trastorno del estado de ánimo con síntomas psicóticos se han descartado.

- E. El trastorno no es debido a los efectos fisiológicos directos de alguna sustancia (ejemplo, una droga de abuso, un medicamento) o de una enfermedad médica.
- F. Si hay historia de trastorno autista u otro trastorno generalizado del desarrollo, el diagnóstico adicional sólo se realizará si las ideas delirantes o las alucinaciones también se mantienen durante al menos 1 mes (o menos si se han tratado con éxito).

ANEXO II

ESCALA DE SINTOMAS POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA LA ESQUIZOFRENIA

PANSS

Nombre del paciente: _____ Fecha: _____

Instrucciones: Marque con un círculo la evaluación apropiada para cada ítem de la entrevista clínica que se especifica a continuación. Consulte el manual de evaluación para las definiciones de los ítems, la descripción de los puntos concretos y el procedimiento para la puntuación.

1 = ausente; 2 = mínimo; 3 = leve; 4 = moderado; 5 = moderadamente severo; 6 = severo; 7 = extremo.

1) SUBESCALA POSITIVA

P1	Delirios	1	2	3	4	5	6	7
P3	Conducta alucinatoria	1	2	3	4	5	6	7
P5	Grandiosidad	1	2	3	4	5	6	7
P6	Susplicacia/persecución	1	2	3	4	5	6	7
N7	Pensamiento estereotipado	1	2	3	4	5	6	7
G1	Preocupación Somática	1	2	3	4	5	6	7
G9	Contenidos de pensamientos inusuales	1	2	3	4	5	6	7
G12	Falta de juicio y discernimiento	1	2	3	4	5	6	7

2) SUBESCALA NEGATIVA

N1	Afecto adormecido o embotado	1	2	3	4	5	6	7
N2	Retirada emocional	1	2	3	4	5	6	7
N3	Empatía limitada	1	2	3	4	5	6	7
N4	Retirada social apática/pasiva	1	2	3	4	5	6	7
N6	Dificultad para la conversación fluida	1	2	3	4	5	6	7
G7	Retraso motor	1	2	3	4	5	6	7
G16	Evitación social activa	1	2	3	4	5	6	7

3) SUBESCALA COGNITIVA

P2	Desorganización conceptual	1	2	3	4	5	6	7
N5	Dificultad para pensar en abstracto	1	2	3	4	5	6	7
G5	Manerismo y actitud postural	1	2	3	4	5	6	7
G11	Atención deficiente	1	2	3	4	5	6	7
G13	Alteración de la voluntad	1	2	3	4	5	6	7
G15	Preocupación	1	2	3	4	5	6	7
G10	Desorientación	1	2	3	4	5	6	7

4) SUBESCALA DE EXCITABILIDAD

P4	Excitación	1	2	3	4	5	6	7
P7	Hostilidad	1	2	3	4	5	6	7
G8	Falta de cooperación	1	2	3	4	5	6	7
G14	Deficiente control de los impulsos	1	2	3	4	5	6	7

5) SUBESCALA DE ANSIEDAD/DEPRESION

G2	Ansiedad	1	2	3	4	5	6	7
G3	Sentimiento de culpabilidad	1	2	3	4	5	6	7
G4	Tensión	1	2	3	4	5	6	7
G6	Depresión	1	2	3	4	5	6	7

ESCALA	TOTAL	PERCENTIL
Positiva	_____	_____
Negativa	_____	_____
Cognitiva	_____	_____
Excitabilidad	_____	_____
Ansiedad/Depresión	_____	_____
TOTAL	_____	

ANEXO IV

TEST DE FAGERSTRÖM DE DEPENDENCIA A NICOTINA

Nombre del paciente: _____ Fecha: _____

	Pregunta	Respuesta	Puntaje
1	¿Cuánto tarda en fumar su primer cigarrillo después de despertarse?	5 min	3
		6-30 min	2
		31-60 min	1
		Más de 60 min	0
2	¿Encuentra difícil abstenerse de fumar en sitios donde está prohibido?	Sí	1
		No	0
3	¿A qué cigarrillo odiaría más renunciar?	El primero de la mañana	1
		Cualquier otro	0
4	¿Cuántos cigarrillos fuma al día?	<10	0
		11-20	1
		21-30	2
		>31	3

5	¿Fuma más frecuentemente durante las primeras horas después de despertarse que durante el resto del día?	Sí No	1 0
6	¿Fuma cuando está tan enfermo que pasa en la cama la mayor parte del día?	Sí No	1 0

Puntaje total	
---------------	--

PUNTAJE:

- 0 - 2 Dependencia **MUY BAJA**
- 3 - 4 Dependencia **BAJA.**
- 5 Dependencia **MODERADA.**
- 6 - 7 Dependencia **ALTA.**
- 8 - 10 Dependencia **MUY ALTA.**