



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio bioquímico y molecular de variantes de los genes *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* y *GCLC* en pacientes con trastornos psicóticos bajo tratamiento con clozapina.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Blanca Alejandra Motilla Frías

ASESOR DE TESIS

Dra. Nancy Monroy Jaramillo



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Alicia Beatriz Cervantes Peredo.

VOCAL: **Profesor:** Martha Patricia Coello Coutiño.

SECRETARIO: **Profesor:** Nancy Monroy Jaramillo.

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Francisca Morayna Gutiérrez Luna.

2º SUPLENTE: **Profesor:** Alberto Ortega Vázquez.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”

ASESOR DEL TEMA:

DRA. NANCY MONROY JARAMILLO

SUSTENTANTE:

BLANCA ALEJANDRA MOTILLA FRÍAS

Índice

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 GENERALIDADES.....	3
1.2 CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO.....	4
1.2.1 <i>Esquizofrenia</i>	4
1.2.2 <i>Trastorno Esquizoafectivo</i>	5
1.2.3 <i>Trastorno Bipolar</i>	6
1.3 ESCALA DE LOS SÍNDROMES POSITIVO Y NEGATIVO.	6
1.3.1 <i>Escala positiva</i>	7
1.3.2 <i>Escala negativa</i>	7
1.3.3 <i>Escala de psicopatología general</i>	7
1.4 HIPÓTESIS ACERCA DEL DESARROLLO DE LA PSICOSIS.	7
1.4.1 <i>Hipótesis dopaminérgica</i>	8
1.4.2 <i>Hipótesis glutamatérgica</i>	9
1.4.3 <i>Integración de la hipótesis dopaminérgica y glutamatérgica</i>	10
1.5 FACTORES GENÉTICOS EN LOS TRASTORNOS PSICÓTICOS (TP)	11
1.5.1 <i>Hipótesis de enfermedad común / variante común</i>	12
1.5.2 <i>Hipótesis de enfermedad común / variante rara</i>	12
1.6 TRATAMIENTO.....	13
1.6.1 <i>Antipsicóticos atípicos</i>	13
1.7 ESTRÉS OXIDATIVO	16
1.8 GLUTATIÓN (GSH)	16
1.9 GLUTATIÓN S TRANSFERASAS (GST).....	20
1.9.1 <i>GSTP1</i>	21
1.9.2 <i>GSTT1 y GSTM1</i>	21
1.10 GCLC.....	22
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
3 JUSTIFICACIÓN	25
4 HIPÓTESIS	26
5 OBJETIVO GENERAL	27

6	OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
7	SUJETOS Y MÉTODOS.....	29
7.1	PACIENTES.....	29
7.1.1	<i>Criterios de inclusión</i>	<i>29</i>
7.1.2	<i>Criterios de exclusión</i>	<i>29</i>
7.2	CONTROLES	29
7.3	TOMA DE MUESTRA BIOLÓGICA.....	30
7.4	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	30
7.4.1	<i>Muestra sanguínea</i>	<i>30</i>
7.4.2	<i>Muestra de saliva.....</i>	<i>32</i>
7.5	CUANTIFICACIÓN DE GSH.....	32
7.6	REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DEPENDIENTE DE SONDAS DE LIGADOS MÚLTIPLES (MLPA)	33
7.6.1	<i>Electroforesis capilar.....</i>	<i>33</i>
7.6.2	<i>Análisis de datos con el programa Coffalyzer.net</i>	<i>35</i>
7.7	CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS DE CNV DE <i>GSTT</i> Y <i>GSTM</i>	37
7.7.1	<i>Confirmación genotipos nullos mediante PCR dúplex punto final.....</i>	<i>37</i>
7.7.2	<i>Confirmación de genotipos mediante PCR cuantitativa por SYBR Green.</i>	<i>40</i>
7.8	ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA REPETIDOS GAG DE <i>GCLC</i> MEDIANTE PCR FLUORESCENTE	41
7.8.1	<i>Electroforesis capilar.....</i>	<i>43</i>
7.9	CONFIRMACIÓN DE ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA REPETIDOS GAG DE <i>GCLC</i> POR MEDIO DE SECUENCIACIÓN SANGER. 44	
7.10	GENOTIPIFICACIÓN DE GEN <i>GSTP1</i> POR PCR EN TIEMPO REAL	46
8	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	48
8.1	INFORMACIÓN CLÍNICA OBTENIDA	50
8.2	NIVELES PLASMÁTICOS DE GSH	53
8.3	RESULTADOS CNV DE <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i>	55
8.4	RESULTADOS DE REPETIDOS GAG EN <i>GCLC</i>	65
8.5	RESULTADOS DE LA VARIANTE C.313A>G (NM_000852.3, rs1695, p.ILE105VAL) DE <i>GSTP1</i>	66
9	DISCUSIÓN	71
10	CONCLUSIONES	82

11	PERSPECTIVAS	84
12	BIBLIOGRAFÍA	85
	ANEXO A. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES	100
	ANEXO B. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CONTROLES.....	103

Resumen

Los trastornos psicóticos afectan a más de 21 millones de personas en el mundo y a más del 1% de la población mexicana, a pesar de su incidencia, no se cuentan con biomarcadores para su diagnóstico y este se basa meramente en la sintomatología clínica presentando dificultades y periodos de tiempo largos para su correcto diagnóstico. A su vez, los pacientes refractarios al tratamiento con dos antipsicóticos suelen tener buenos resultados con Clozapina, mostrando una disminución notable en agresión y riesgo suicida; sin embargo, se llegan a presentar reacciones adversas letales como la agranulocitosis, presentando un alto riesgo para el paciente.

Este estudio se realizó con el fin de establecer una correlación entre las variantes de los genes *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GCLC* con los niveles de Glutación (GSH) plasmático para determinar si se asocian con riesgo de desarrollo de trastornos psicóticos, sintomatología de la enfermedad, respuesta al tratamiento y/o aparición de reacciones adversas a Clozapina.

Se reclutaron 46 pacientes mestizo-mexicanos con trastornos psicóticos (63.04% Esquizofrenia, 23.91% Trastorno bipolar y 13.04% Trastorno esquizoafectivo) de ambos sexos (63.04% hombres; 36.54±11.96 años) y 46 controles mestizo-mexicanos sanos pareados por edad y género (36.96% mujeres; 35.34±13.41 años; $p>0.05$). Se cumplieron con todas las consideraciones éticas y con firma de carta de consentimiento informado para ambos grupos.

Se genotiparon: variantes en número de copias de *GSTT1* y *GSTM1* mediante amplificación dependiente de sondas de ligados múltiples (MLPA), la variante c.313A>G de *GSTP1* por qPCR y la variante de repetidos de trinucleótido GAG de *GCLC* por medio de análisis de fragmentos por PCR fluorescente y se midieron los niveles de GSH en plasma por espectroscopía de fluorescencia con el fin de buscar biomarcadores que auxilien en el diagnóstico, predicción de respuesta al tratamiento farmacológico con Clozapina y la aparición de reacciones adversas.

Las variantes genéticas mencionadas se analizaron en relación a los niveles de GSH como marcador de estrés oxidativo, además, se compararon con la escala de los síndromes positivos y negativos (PANSS) antes del tratamiento con Clozapina que refleja la gravedad del cuadro clínico del paciente, con la escala PANSS a 18 semanas de haber comenzado la terapia con Clozapina como marcador de respuesta ante el tratamiento farmacológico y mejora del cuadro, por último, se evaluó si las variantes genéticas están relacionadas con la aparición de reacciones adversas a Clozapina.

Los niveles de GSH obtenidos fueron de $3.19 \pm 0.75 \mu\text{M}$ en el grupo de pacientes y de $5.57 \pm 1.47 \mu\text{M}$ en el grupo de controles. En cuanto a las variantes en número de copias para los genes *GSTT1* y *GSTM1* se obtuvieron frecuencias similares en genotipos de riesgo para ambos grupos (pacientes: 0.77 y 0.16 respectivamente; controles: 0.74 y 0.07 respectivamente), este mismo comportamiento se apreció en las frecuencias de genotipos de riesgo de la variante estudiada de los genes *GSTP1* (pacientes 0.26; controles 0.26) y *GCLC* (pacientes 0.20 y controles 0.28).

Se encontró que los niveles de GSH estaban significativamente reducidos en los pacientes en contraste con los controles y que la aparición de reacciones adversas a Clozapina (neurológicas, metabólicas y totales) es significativamente mayor en los pacientes con los niveles más bajos de GSH. Es por esto que los niveles de GSH son un potencial marcador de riesgo de desarrollo del trastorno y aparición de reacciones adversas a Clozapina. A su vez se encontró que la variante de repetidos de trinucleótido GAG de *GCLC*, específicamente el genotipo 9/10, está relacionado con niveles bajos de GSH.

Las variantes en número de copias de *GSTT1* y *GSTM1* funcionan como posibles marcadores para gravedad del trastorno y mejora clínica tras la terapia con Clozapina, la variante c.313A>G de *GSTP1* figura como posible candidato como marcador de gravedad de enfermedad y presencia de reacciones adversas a medicamentos ante Clozapina.

1 Introducción

1.1 Generalidades.

El término "psicosis", por sus raíces griegas, se define como condición anormal de la mente, y se ha utilizado de muchas maneras diferentes en la medicina clínica. Antes de 1980, el término "psicótico" se aplicaba a personas cuyo funcionamiento mental estaba lo suficientemente deteriorado impidiendo que realizaran sus actividades diarias. A partir de 1980, con la publicación de la tercera edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de Desórdenes Mentales (DSM), psicosis indica la interrupción de la capacidad de distinguir entre la experiencia interna de la mente y la realidad externa (Lieberman y First 2018).

En la quinta edición del DSM, que es la versión más reciente de este manual (APA 2014), se definen a los Trastornos Psicóticos (TP) por la presencia de al menos uno de los siguientes síntomas: delirios, alucinaciones y/o discurso desorganizado, así como un comportamiento muy desorganizado o catatónico. El diagnóstico es meramente basado en la sintomatología del paciente, en su testimonio y el de sus familiares, debido a que actualmente no se tienen marcadores biológicos determinantes para esta condición.

Los TP afectan a más de 21 millones de personas en el mundo (OMS 2018) y estos corren el riesgo de sufrir complicaciones y efectos derivados de la psicosis (Lieberman y First 2018). Entre ellos, en particular los intentos de suicidio con una prevalencia de por vida de 34.5% (Suokas, et al. 2010) teniendo que la mortalidad por suicidio es aproximadamente 10 veces mayor que en la población general (Heilä, et al. 2005). El abuso de sustancias tiene una prevalencia de por vida de 74% (Lambert, et al. 2005), las personas sin hogar con prevalencia anual de 5% (Folsom, et al. 2005), la victimización por otros con una prevalencia en un período de 3 años de 38% (Brekke, et al. 2001), y el cometer actos de violencia con un aumento en las probabilidades de violencia en comparación con la población general de un 49% a 68% (Douglas, Guy y Hart 2009); por lo que los TP representan un problema importante en la salud pública.

Los TP se presentan en todo el espectro de la esquizofrenia (ESQ) descrito en el DSM-5 (APA 2014), así como, en el trastorno bipolar (TB) durante los episodios maníacos; el trastorno depresivo mayor se llega a presentar en trastornos delirantes y trastornos psicóticos breves. Estas condiciones mencionadas suelen conocerse como psicosis primarias idiopáticas, aunque también existen las psicosis provocadas por afecciones médicas (incluidos trastornos neurodegenerativos) y psicosis tóxicas que son provocadas por sustancias de abuso, medicamentos o toxinas (Lieberman y First 2018).

Para los fines de este trabajo, el término TP se refiere exclusivamente a ESQ, trastorno esquizoafectivo (TE) y TB con características psicóticas pertenecientes al grupo de psicosis idiopáticas primarias mencionado anteriormente.

1.2 Criterios de diagnóstico.

En esta sección se explican los criterios que deben tomar en cuenta los psiquiatras para el diagnóstico de cada uno de los TP que se incluye en este trabajo, así como una comparativa entre las dos guías diagnósticas más utilizadas y recomendadas en Psiquiatría, el DSM-5 y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE).

1.2.1 Esquizofrenia.

El diagnóstico de ESQ de acuerdo con los criterios DSM-5 se basa en la presencia de dos o más de los siguientes síntomas: delirios, alucinaciones, discurso desorganizado, comportamiento muy desorganizado o catatónico y/o síntomas negativos (ver sección 1.3 Escala de los síndromes positivos y negativos). Al menos uno de los síntomas presentes debe corresponder con los síntomas de TP y presentarse durante un mes en un periodo de 6 meses (APA 2014).

Además, se deben de tener en cuenta otras consideraciones, como que el nivel de funcionamiento en una o más áreas (trabajo, relaciones interpersonales o cuidado personal) esté muy por debajo del nivel que se tenía antes del inicio del trastorno, así como haber descartado TE y TB como posibles diagnósticos y por último, que los

síntomas no sean atribuidos a los efectos fisiológicos de una sustancia, ya sea droga o medicamento (APA 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de la CIE para la clasificación de los trastornos mentales y del comportamiento en donde se presentan varias subclasificaciones de la ESQ como son: ESQ paranoide, ESQ catatónica, ESQ residual, ESQ hebefrénica o desorganizada, entre otras (Organización Mundial de la Salud 2010).

Si bien, el presidente de la ONU en la primera edición del CIE afirmó que “ninguna clasificación es perfecta: nuevas mejoras y simplificaciones deberían hacerse posibles con el aumento de nuestro conocimiento y la experiencia acumulada con la clasificación” (Organización Mundial de la Salud 1993) ambos documentos, tanto el CIE como el DSM-5 son complementarios en el diagnóstico correcto de los pacientes con TP.

1.2.2 Trastorno Esquizoafectivo.

El diagnóstico del TE de acuerdo con los criterios DSM-5, presenta la misma sintomatología que ESQ, en donde al menos uno de los síntomas presentes debe corresponder con los síntomas de TP, sumado a esto se presenta un episodio mayor del estado de ánimo (maníaco o depresivo mayor) durante un periodo ininterrumpido de la enfermedad, y en su ausencia se presentan delirios o alucinaciones durante dos o más semanas (APA 2014).

Se debe de considerar que los síntomas que cumplen los criterios de un episodio mayor del estado de ánimo están presentes durante la mayor parte de la duración total de las fases activa y residual de la enfermedad, además que el trastorno no se puede atribuir a los efectos de una sustancia ya sea medicamento o droga (APA 2014).

En el DSM-5, el TE se presenta dentro del espectro de ESQ, mientras que en el CIE-10 se presenta como un trastorno delirante, que a su vez se clasifica en TE de tipo maníaco, TE depresivo, TE mixto (que presenta características maníacas y depresivas) o TE inespecífico (Organización Mundial de la Salud 2010).

1.2.3 Trastorno Bipolar.

En el DSM-5 se explica que existen dos tipos de TB que son: TBI y TBII, ambos diagnósticos consisten en episodios maníacos y episodios de depresión mayor que se presentan de forma cíclica. La diferencia entre ambos diagnósticos radica en la gravedad de los episodios maníacos, que en el caso de TBI son de mayor intensidad y a la par se pueden presentar episodios hipomaníacos, en contraste, en TBII solo se presentan episodios hipomaníacos (APA 2014).

Existe una subclasificación de la enfermedad basada en el tipo de episodio actual o más reciente, así como en la gravedad actual, la presencia de características de TP y el estado de remisión (APA 2014). A diferencia del DSM-5, el CIE-10 no hace la distinción entre TBI y TBII, y clasifica a la enfermedad en: Trastorno afectivo bipolar (TAB) con episodio actual hipomaníaco, TAB con episodio maníaco actual sin síntomas psicóticos, TAB con episodio maníaco actual con síntomas psicóticos, TAB con episodio actual mixto, entre otros (Organización Mundial de la Salud 2010).

Para fines de este trabajo solo se incluyeron casos con TB o TAB con características psicóticas.

1.3 Escala de los Síndromes Positivo y Negativo.

La Escala de los Síndromes Positivo y Negativo (PANSS; del inglés, *Positive and Negative Syndrome Scale*) fue desarrollada por Kay, et al. en 1987 y adaptada al español por Peralta & Cuesta en 1994. Esta es una de las escalas más utilizadas para valorar la sintomatología en pacientes con ESQ y se aplica a través de una entrevista semiestructurada de aproximadamente 45 min de duración, en la que según su puntaje se determina la gravedad del trastorno, es decir, a mayor puntaje mayor gravedad clínica, además, permite dilucidar el avance del paciente ante la terapia por un cambio en el puntaje de esta. En su versión original, la PANSS está compuesta por 30 reactivos agrupados en tres secciones: síndrome positivo (por 7 reactivos), síndrome negativo (7 reactivos) y psicopatología general (16 reactivos) (Gila, et al. 2009).

1.3.1 Escala positiva.

Es la primera sección de evaluación dentro de la escala PANSS, esta incluye la evaluación de la presencia y gravedad de síntomas considerados como positivos asociados con los TP, estos síntomas son: delirios, desorganización conceptual, conducta alucinatoria, excitación, grandiosidad, suspicacia/prejuicio y hostilidad (Peralta y Cuesta 1994).

1.3.2 Escala negativa.

Esta escala evalúa la presencia y gravedad de los síntomas negativos, incluyendo: aplanamiento afectivo, retracción emocional, pobre relación, retracción social / apatía pasiva, dificultad de pensamiento abstracto, falta de espontaneidad y fluidez en la conversación y pensamiento estereotipado (Peralta y Cuesta 1994).

1.3.3 Escala de psicopatología general.

Esta sección de la escala PANSS evalúa la presencia y gravedad de distintos síntomas, como son: preocupaciones somáticas, ansiedad, sentimientos de culpa, tensión motora, manierismos y posturas, depresión, retraso motor, falta de colaboración, contenidos inusuales del pensamiento, desorientación, atención deficiente, ausencia del juicio e introspección, trastornos de la volición, control deficiente de impulsos, preocupación y evitación social activa (Peralta y Cuesta 1994).

1.4 Hipótesis acerca del desarrollo de la psicosis.

Existen principalmente dos hipótesis de desarrollo de los TP, la hipótesis dopaminérgica y la hipótesis glutamatérgica que se enfocan en el déficit o exceso de neurotransmisión como causa de la psicosis, así como los síntomas positivos y negativos de los TP, a pesar de los esfuerzos de los investigadores, estas hipótesis no se han podido comprobar debido a resultados contradictorios en distintos estudios. Una tercera hipótesis, es más bien la integración de ambas y da origen a un panorama más amplio en cuanto al surgimiento del trastorno.

1.4.1 Hipótesis dopaminérgica.

La hipótesis dopaminérgica surgió en los años 70 como hipótesis de desarrollo únicamente de ESQ, sin embargo, actualmente esta hipótesis se enfoca en la psicosis que se presenta en los TP y otras afecciones (Howes y Kapur 2009).

La primera versión de esta hipótesis surge con el hallazgo de la eficacia de los antipsicóticos en la mejora clínica de los pacientes con ESQ que está directamente relacionada con su afinidad por los receptores de dopamina, debido a que en esta enfermedad se tiene un exceso de transmisión en estos receptores (Seeman y Lee 1975).

Posteriormente surgió la versión II, en donde la mayor innovación fue el paso de una hipótesis de dopamina unilateral que explica todas las facetas de los TP (Howes y Kapur 2009), a una deficiencia de dopamina frontal que resulta en hiperdopaminergia estriatal, donde los síntomas negativos de los TP eran consecuencia de la hipodopaminergia frontal y los síntomas positivos eran consecuencia de la hiperdopaminergia estriatal (Davis, et al. 1991).

La versión más reciente de la hipótesis dopaminérgica, la versión III, hipotetiza que múltiples factores interactúan para dar lugar a la desregulación de la dopamina (Figura 1), siendo así una enfermedad multifactorial. Además, la desregulación de la dopamina pasa de estar principalmente a nivel del receptor D2 a estar en el nivel de control dopaminérgico presináptico. Sumado a esto, la desregulación de la dopamina está relacionada con la "psicosis" en lugar de la ESQ como se dijo a inicio de esta sección y finalmente, la desregulación de la dopamina altera la evaluación de los estímulos, tal vez a través de un proceso de "*aberrant salience*" (Howes y Kapur 2009).

Actualmente no existe una traducción consensuada al español para el término "*salience*" y usualmente se recurre a la españolización del término por medio de la palabra "saliencia", en la búsqueda de un término apropiado se ha llegado a utilizar "prominencia" o bien "asignación de relevancia" (Vargas y Lahera 2011).

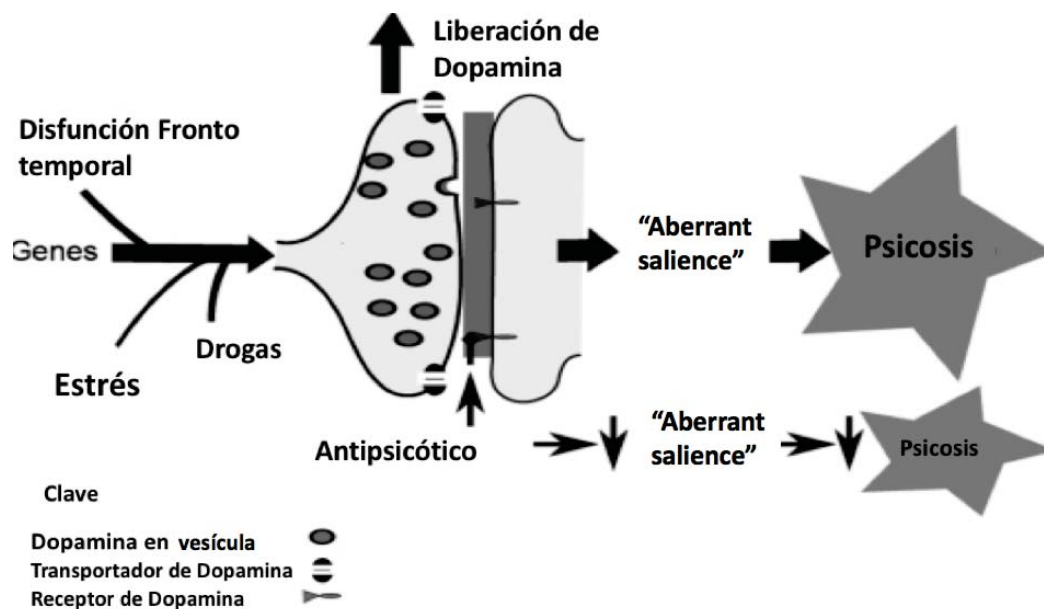


Figura 1. Versión III de la hipótesis dopaminérgica. Los múltiples factores que interactúan para dar lugar a la desregulación de la dopamina estriatal para alterar la apariencia de los estímulos y dar lugar a la psicosis y su interacción con los antipsicóticos. Figura modificada de Howes & Kapur, 2009.

En términos de TP, *“aberrant salience”* se refiere a la percepción alterada de los estímulos neutros o irrelevantes que atraen el foco de atención y generan un proceso mental de orden superior, estos se interpretan como generadores de castigo o recompensa, usualmente dando lugar a percepciones del tipo amenazante desembocando en pensamientos y conductas anómalas (Laheraa, Freunda y Sáiz-Ruiz 2013).

1.4.2 Hipótesis glutamatérgica.

La hipótesis del glutamato de la ESQ originalmente formuló que había un déficit simple en la neurotransmisión glutamatérgica. Esta teoría ha sido modificada y desarrollada a lo largo de los años y, aunque muchos receptores de glutamato han sido implicados, la hipótesis predominante es la implicación primaria de la disfunción del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Stone, et al., 2007; Howes, et al., 2015).

La hipótesis de la disfunción del receptor NMDA de la ESQ surgió inicialmente de la observación que los antagonistas no competitivos del receptor NMDA producen efectos psicológicos inmediatos, que se parecen mucho a los que ocurren en la ESQ, incluyendo dominios de síntomas positivos y negativos, así como síntomas de tipo psicótico (Krystal, et al., 1994; Stone, et al., 2014).

El mecanismo mediante el cual los antagonistas del receptor de NMDA conducen a aumentos en glutamato y cambios neurotóxicos en animales no se conoce completamente, pero la evidencia indica que involucra interneuronas GABAérgicas (Howes, McCutcheon y Stone 2015). Específicamente, los antagonistas del receptor NMDA han demostrado que reducen la función interneuronal GABAérgica (Homayoun y Moghaddam, 2007), y se cree que esto conduce a un aumento en el disparo de las células piramidales debido a la desinhibición (Olney y Farber 1995). Cómo el antagonismo NMDA conduce a reducciones en la actividad interneuronal GABAérgica, es menos claro. Se ha sugerido que pueden tener efectos preferenciales sobre los receptores NMDA expresados en las neuronas GABAérgicas (Homayoun y Moghaddam 2007).

1.4.3 Integración de la hipótesis dopaminérgica y glutamatérgica.

Cada una de las hipótesis mencionadas presenta deficiencias en cuanto a la explicación de surgimiento de ESQ y más específicamente de TP, a pesar de esto, al unir ambas hipótesis se puede tener una explicación más amplia de lo que sucede en estas condiciones. Las neuronas de dopamina están reguladas por proyecciones glutamatérgicas de los núcleos de dopamina del cerebro medio, lo que las hace potencialmente sensibles a los cambios en la función glutamatérgica (Miller y Abercrombie 1996). Esto sugiere que la función de dopamina observada en ESQ podría ser secundaria a la función glutamatérgica alterada (McGuire, et al. 2008) (Figura 2).

1.5 Factores genéticos en los trastornos psicóticos (TP)

Los estudios epidemiológicos implican fuertemente a los factores genéticos en la

patogénesis de los TP con heredabilidad cercana al 80% (Sullivan PF, Kendler y Neale 2003). Estudios en gemelos idénticos han evidenciado que la ESQ y el TB con síntomas psicóticos se caracterizan por una concordancia de aproximadamente el 50% de ciertos *loci* genéticos, y entre los hermanos y padres de personas con un TP, las tasas del mismo trastorno son de 10 a 15 veces más altas que en la población general (Lieberman y First 2018).

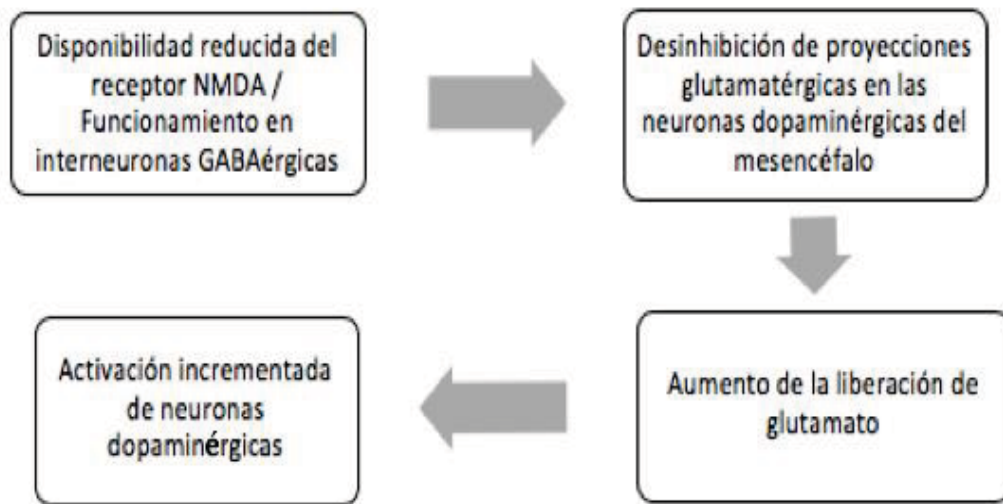


Figura 2. Interacción entre la hipótesis glutamatérgica y la hipótesis dopaminérgica. Imagen modificada de Howes, et al., 2015.

Aunque, como ya se comentó, actualmente no se han determinado los marcadores biológicos, incluidos los marcadores genéticos específicos, así como las formas de herencia de los TP, debido a que los TP son enfermedades multifactoriales. Se han propuesto dos hipótesis generales para la búsqueda de factores de riesgo y biomarcadores genéticos como es el caso de la hipótesis de enfermedad común/variante común y la hipótesis de enfermedad común/variante rara (Sullivan, Daly y O'Donovan 2012).

Desde el surgimiento de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) y los estudios de variaciones estructurales se han publicado numerosos hallazgos genéticos robustos y replicables, aunque estudios de variantes

poco comunes (variantes raras) son de gran interés por los investigadores en la actualidad (Sullivan, Daly y O'Donovan 2012).

1.5.1 Hipótesis de enfermedad común / variante común.

Las variantes genéticas comunes, pero con baja penetrancia (presentan una frecuencia > 10% en la población) actúan de forma aditiva y mediante la epistasis con otros genes confieren un riesgo para el desarrollo de TP (Lieberman y First 2018). Por medio de los GWAS se han identificado más de 100 loci independientes definidos por variantes de un solo nucleótido (SNV) comunes para ESQ (Fromer, et al. 2014). Sin embargo, los análisis de los resultados de GWAS no son robustos y representan solo una pequeña fracción de los genes críticos (Wang, et al. 2018).

Al respecto, se han encontrado varias asociaciones entre TP y los genes que controlan la neurotransmisión sináptica, en particular los genes que implican vías mediadas por la dopamina y el glutamato (Pers, et al. 2016). Estas asociaciones son consistentes con las teorías de desarrollo de los TP anteriormente mencionadas, y razonables, pero no han sido probadas.

1.5.2 Hipótesis de enfermedad común / variante rara.

Esta hipótesis implica mutaciones heredadas o *de novo*, raras, y variantes de número de copias (CNV) que ocurren en una pequeña proporción de casos (aproximadamente 2.4%) pero tienen una penetrancia alta (Lieberman y First 2018)

La anomalía genética más comúnmente asociada con un trastorno psicótico es la microdelección cromosómica 22q11.2 (McDonald-McGinn, et al. 2015). Esto causa el síndrome de delección 22q11.2 (también conocido como síndrome velocardiofacial o síndrome DiGeorge), que ocurre en aproximadamente 1 de cada 4000 nacidos vivos. Esta enfermedad se asocia con anomalías cardíacas, faciales y de las extremidades (Murphy y Owen 2001). Uno de cada cuatro individuos nacidos con esta delección desarrolla esquizofrenia y aproximadamente del 0.5 al 1% de los individuos con

esquizofrenia en la población general tienen el síndrome de deleción asociado 22q11.2 (Van, Boot y Bassett 2017).

El reconocimiento del síndrome de deleción asociado 22q11.2 es importante para el manejo clínico, incluido el tratamiento y el asesoramiento genético (hay un 50% de riesgo de transmisión de la eliminación) (Fung, et al. 2015) y para la oportunidad que presenta este modelo molecular para comprender la esquizofrenia, dada la comparabilidad del fenotipo de la esquizofrenia, incluido el perfil de los síntomas y la edad de inicio (McDonald-McGinn, et al. 2015).

1.6 Tratamiento

Los objetivos en el tratamiento de TP incluyen los síntomas de focalización, prevención de recaídas y aumento del funcionamiento adaptativo para que el paciente pueda integrarse de nuevo en la comunidad (Crismon, Argo y Buckley 2014). Dado que los pacientes rara vez vuelven a su nivel basal de funcionamiento adaptativo, se deben utilizar tratamientos no farmacológicos y farmacológicos para optimizar los resultados a largo plazo (Crismon, Argo y Buckley 2014).

Este trabajo sólo considera el tratamiento farmacológico; sin embargo, los síntomas residuales pueden persistir. Por esa razón, los tratamientos no farmacológicos, como la psicoterapia, también son importantes (Patel, et al. 2014).

Según la Asociación Estadounidense de Psiquiatría, los antipsicóticos de segunda generación o más comúnmente llamados, antipsicóticos atípicos (AA), con excepción de la clozapina, son los fármacos de elección para el tratamiento de primera línea de TP especialmente en ESQ (Lehman, et al. 2004) (Patel, et al. 2014).

1.6.1 Antipsicóticos atípicos.

El surgimiento de los AA como clozapina (CLZ), risperidona, olanzapina y quetiapina fue debido a que los antipsicóticos de primera generación o antipsicóticos típicos (AT) como haloperidol y clorpromazina son antagonistas de dopamina (Carlsson y Lindqvist

1963) y tienen poca afinidad por otros receptores, por lo que son efectivos en el tratamiento de síntomas positivos (Kaplan, Sadock y Sadock 2009) no así ante los síntomas negativos e incluso causan síntomas extrapiramidales y otras reacciones adversas a medicamentos (RAM) (Buchanan, et al. 1998).

En contraste, el mecanismo de acción de los antipsicóticos atípicos involucra una gran afinidad por varios receptores, entre los que no sólo se incluyen los receptores dopaminérgicos (D_1 - D_5), sino también gran variedad de otros receptores como los serotoninérgicos (5-HT1A/1D, 5-HT2A/2C, 5-HT3, 5HT6 y 5HT7), histaminérgicos (H1-H3), muscarínicos (M1-5), adrenérgicos (α 1-2 y β 1-3) y receptores GABA (Meltzer 1994) que en conjunto tienen efecto en síntomas tanto positivos como negativos, adicionalmente, se tiene una menor incidencia y severidad de síntomas extrapiramidales y discinesias tardías por el tratamiento (Kawanishi, Tachikawa y Suzuki 2000).

Los AA suelen preferirse sobre los AT por las ventajas mencionadas, sin embargo, algunos AA presentan riesgo de agranulocitosis, como es el caso de CLZ (Crismon, Argo y Buckley 2014) y tienden a tener efectos secundarios metabólicos, como el aumento de peso, la hiperlipidemia y la diabetes mellitus (Raedler 2010). Los efectos adversos pueden contribuir al aumento del riesgo de mortalidad cardiovascular observado en pacientes con TP, especialmente en ESQ (Raedler 2010).

1.6.1.1 Clozapina.

La CLZ es un AA derivado tricíclico dibenzodiazepínico utilizado en pacientes con comportamiento suicida recurrente asociado con TP (FDA 2015), así como para tratar TP en pacientes refractarios (20-35% de los pacientes con TP) teniendo buenos resultados (Demjaha, et al. 2012). Se entiende por paciente refractario cuando el paciente no ha respondido a 2 antipsicóticos diferentes, previos, en monoterapia, de 4 a 6 semanas de duración (de AT o AA), a dosis adecuadas (equivalente a 400 mg/día de CLZ) (Lehman, et al. 2004). Donde la respuesta a antipsicóticos está basada en la disminución significativa (al menos 30%) de los síntomas positivos, valorados por

escalas de psicopatología como la PANSS y la BPRS (del inglés, *Brief Psychiatric Rating Scale*) (Lehman, et al. 2004).

A pesar de la eficacia de CLZ; este fármaco no se considera como primera opción para la terapia de TP, debido a que suelen presentarse reacciones adversas (RA) potencialmente letales como agranulocitosis y granulocitopenia en aproximadamente 1% y 3% de los pacientes, respectivamente (Saito, et al. 2016). Por ello, los pacientes que inician su tratamiento con este medicamento requieren de un monitoreo de neutrófilos, para que en caso de ser necesario se suspenda la administración de CLZ. A su vez, el tratamiento con CLZ puede asociarse con otras RA, tales como ganancia de peso, el cual por lo general desemboca en síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares. Algunas otras RAM menos comunes son eosinofilia, convulsiones, miocarditis, hipotensión ortostática, taquicardia, obstrucción intestinal, náuseas, pancreatitis, síntomas obsesivos compulsivos y enuresis, entre otros (Saito e Ikeda, 2015).

Debido a la variedad y gravedad de las RA asociadas con este medicamento, las indicaciones para el uso de CLZ aprobadas por la FDA son únicamente las debidas a psicosis refractarias y riesgo suicida en TP (FDA 2015); siendo el medicamento de cabecera para estas condiciones, ya que a pesar de las RAM asociadas, los pacientes suelen tener muy buenos resultados bajo tratamiento con CLZ (Crismon, Argo y Buckley 2014).

A pesar de que se conocen las RA que presentan los pacientes bajo tratamiento con CLZ, no se sabe con seguridad cuál sea la razón de su aparición, por lo que en la actualidad se llevan a cabo diferentes estudios bioquímicos, farmacológicos, genéticos y farmacogenéticos para intentar explicar su aparición.

En la Figura 3 se puede apreciar la farmacodinamia de la CLZ, debe de tenerse en cuenta que cada receptor involucra toda una cascada de señalización para poder producir su efecto terapéutico, señalización que no fue incluida en este esquema.

1.7 Estrés oxidativo

Existe una fuerte evidencia de que las especies reactivas de oxígeno (ERO) desempeñan un papel importante en la fisiopatología de los TP, especialmente en la ESQ (Bitanhirwe y Woo 2011). Las ERO tienen una vida muy corta y por lo general son inactivadas o eliminadas por los antioxidantes antes de que puedan infligir daño a los lípidos, proteínas o ácidos nucleicos de la célula. El cuerpo humano tiene un sistema complejo de defensa antioxidante (SDA) que incluye las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Pero el SDA más importante, no enzimático, lo constituye el glutatión (GSH) (Raffa, et al. 2011).

Los niveles celulares de antioxidantes responden a los niveles de oxígeno y ERO; lo que permite a las células defenderse contra el aumento de la producción de ERO (Mukerjee, et al. 1996). Si las ERO se producen en exceso o no se eliminan eficazmente, resultan en daño celular, es lo que se conoce como estrés oxidativo.

1.8 Glutatión (GSH)

El GSH es una molécula compuesta por los aminoácidos cisteína, glutamato y glicina, es ubicuo y es considerado uno de los antioxidantes intracelulares más importantes (Dragovic, Boerma, et al. 2010). El GSH existe en su forma reducida como tiol, y como disulfuro en su forma oxidada (GSSG). El GSH reducido es la forma predominante y representa >98% del GSH total (Forman, Zhang y Rinna 2009).

Las células eucariotas tienen tres reservorios principales de GSH: 80-85% del GSH celular está en el citosol, 10-15% se encuentra en la mitocondria y un pequeño porcentaje está en el retículo endoplásmico (Hwang, Sinskey y Lodish 1992).

La síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos constituyentes implica dos etapas enzimáticas que requieren ATP: la primera etapa que es la formación de γ -

glutamilcisteína (GCL) a partir de glutamato y cisteína, y la segunda etapa es la formación de GSH a partir de γ -glutamilcisteína y glicina (Shelly 2013)(Figura 3).

El GSH es el antioxidante predominante en el cerebro, sus niveles más altos se alcanzan especialmente durante el desarrollo temprano (Burton y Jauniaux 2011). El GSH también puede funcionar como reserva de glutamato neuronal a través del ciclo de la γ -glutamil (Xin, et al. 2016). Por otro lado, el estrés oxidativo y la desregulación del GSH se han relacionado con la fisiopatología de la ESQ debido a que se han documentado niveles reducidos de GSH en pacientes con ESQ vs. controles (Wood, et al. 2009). Este hallazgo se ha observado en líquido cefalorraquídeo (-27%) de pacientes con ESQ crónica (Do, et al. 2000); en un estudio *post mortem* del núcleo caudado de casos tratados (Yao, Leonard y Reddy 2006); en plasma de pacientes tratados y no tratados (Micó et al., 2011; Raffa et al., 2011); así como en corteza prefrontal de pacientes con primer evento psicótico en estudios de neuroimagen (Xin, et al. 2016).

Además, se ha observado en estudios consistentes en animales que el exceso de estrés oxidativo conduce a ESQ, estos estudios incluyen lesión del hipocampo neonatal, la expresión de la proteína DISC1 mutante y la delección del gen que codifica para la enzima sintetizadora de GSH (Nucifora, et al., 2017; Johnson, et al., 2013).

De los hallazgos más importantes, se tiene que la administración de antioxidantes en modelos animales puede mejorar los déficits conductuales en la edad adulta (Cabungcal, et al. 2014). En consecuencia, se ha explorado un mecanismo de cómo el exceso de estrés oxidativo y posiblemente las cascadas de GSH pueden ser la base de los cambios de comportamiento en los TP. Se cree que las interneuronas de la corteza y el hipocampo tienen una función clave en la cognición y otras funciones cerebrales superiores y son particularmente sensibles a las ERO, por lo que el estrés oxidativo puede estar implicado en la fisiopatología de los TP (Behrens, et al., 2007; Lewis, et al., 2012; Nucifora, et al., 2017).

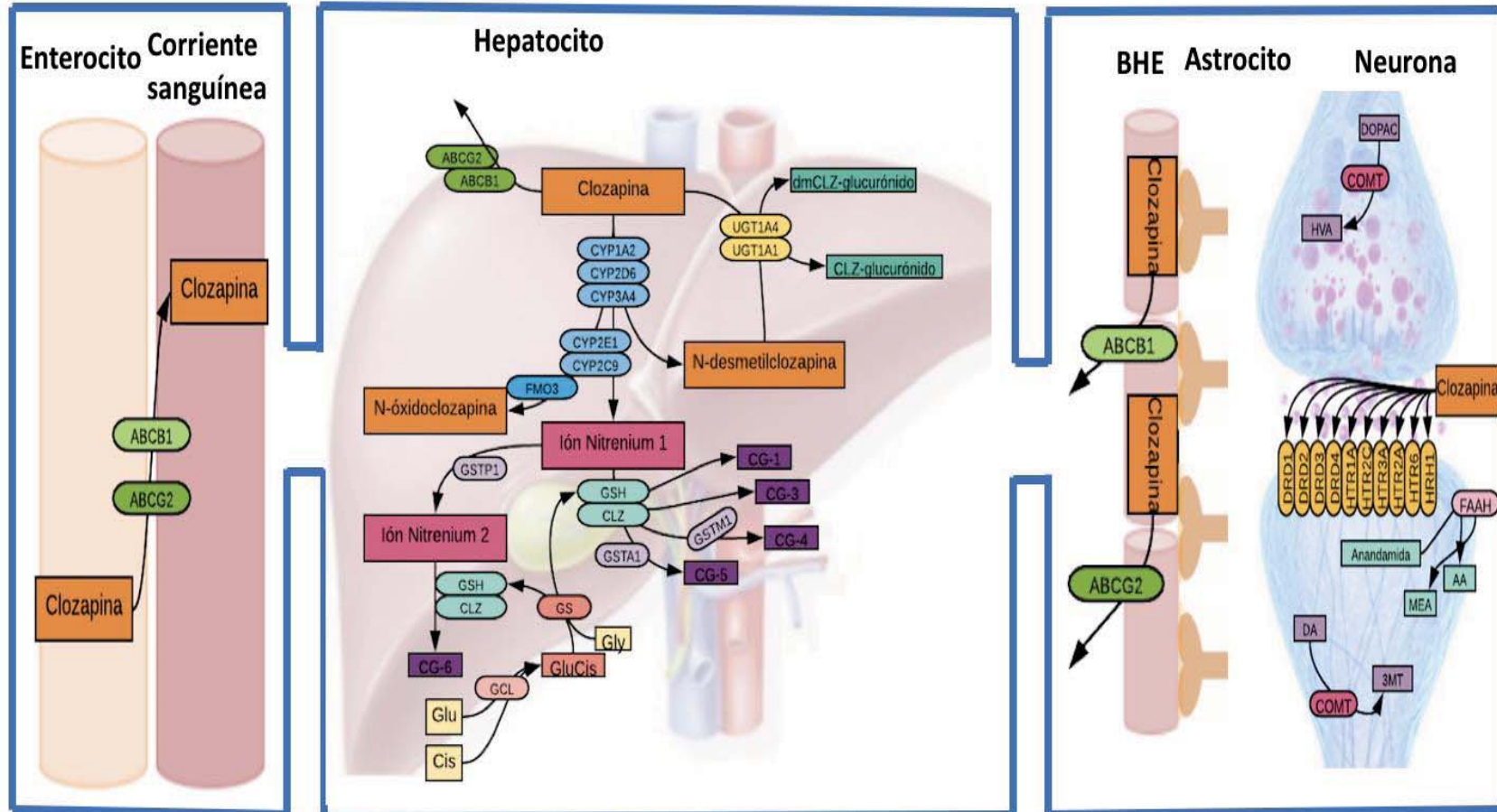


Figura 3. Transporte, metabolismo y señalización de CLZ. Glu= Glutamato; Cis= cisteína; Gly= glicina; GCL= Cisteína-glutamato ligasa; GluCis= gamma-glutamil cisteína; GS= Glutación sintetasa; GSH= Glutación; CG= conjugados de clozapina; GST= Glutación S-transferasa; FMO= Monooxigenasa que contiene flavina; CYP = Citocromo P450; ABC= Subfamilia de *cassettes* de unión a ATP; UGT= uridín-difosfato-glucuronosiltransferasa; dmCLZ = N-desmetilclozapina; CLZ= Clozapina; COMT= Catecol-O-metiltransferasa; DOPAC= Ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA= ácido homovanílico; DA= Dopamina; 3MT= 3-Metoxitiramina; FAAH= Ácido graso amida hidrolasa; AA= ácido araquidónico; MEA= etanol amida; DRD= Receptor de dopamina; HTR = receptor de 5- hidroxitriptamina (serotonina); HRH = receptor de histamina; BHE = barrera hemato-encefálica. Modificado de: Pharmgkb, 2018, Sriretnakumar, y otros, 2015 y Dragovic, y otros, 2010.

La función antioxidante del GSH es en gran medida mediante reacciones catalizadas por la peroxidasa de GSH (GPx), que reduce el peróxido de hidrógeno y el peróxido de lípidos cuando el GSH se oxida a GSSG. GSSG a su vez, se reduce de nuevo a GSH por la acción de la enzima reductasa de GSSG a expensas de NADPH, formando un ciclo redox (Lu, 2009, Shelly, 2013) (Figura 4).

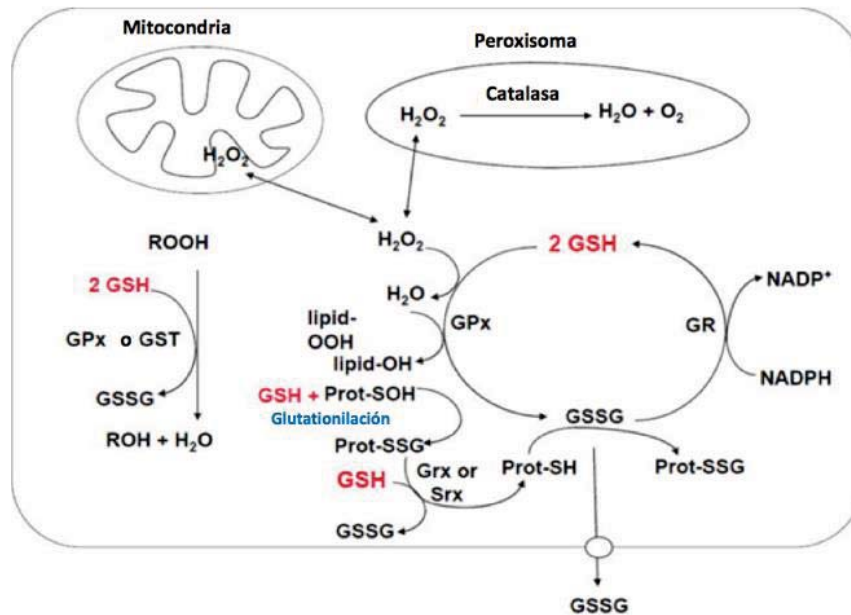


Figura 4. Función antioxidante del GSH. El metabolismo aeróbico genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede ser metabolizado por la peroxidasa de GSH (GPx) en el citosol y las mitocondrias, y por la catalasa en el peroxisoma. GSSG se puede reducir de nuevo a GSH mediante la reductasa del GSSG (GR). Los peróxidos orgánicos (ROOH) pueden reducirse por acción de GPx o GSH S-transferasa (GST). GSH también participa en la señalización redox de proteínas. Durante el estrés oxidativo, los residuos de cisteína de proteínas pueden oxidarse a ácido sulfénico (Prot-SOH), reaccionar con GSH para formar disulfuros mezclados de proteína Prot-SSG (glutacionilación), que a su vez pueden reducirse a Prot-SH vía glutaredoxina (Grx) o sulfiredoxina (Srx). Este es un mecanismo para proteger los tioles proteicos sensibles de la oxidación irreversible y también previene la pérdida de GSH en condiciones de oxidación. La capacidad de la célula para reducir GSSG a GSH puede superarse durante una lesión oxidativa grave, lo que lleva a una acumulación de GSSG. Para evitar un cambio en el equilibrio redox, GSSG puede ser transportado activamente fuera de la célula o reaccionar con una proteína sulfhidrilo (Prot-SH) para formar un disulfuro mixto (Prot-SSG). Lipid, lípidos. Figura modificada de Shelly, 2013.

Sumado a esto, se ha postulado que las RA provocadas por CLZ son el resultado de la bioactivación de metabolitos reactivos (ión nitrenio) en los diferentes tejidos diana ocasionando agranulocitosis idiosincrática. El GSH actúa como defensa antioxidante debido a que atrapa al ión nitrenio y la CLZ formando conjugados o aductos C6- y C9-

glutathionil-CLZ (Figura 3) mediante reacciones de conjugación catalizadas por las transferasas de GSH(GST) (Dragovic, Boerma, et al. 2010).

1.9 Glutación S transferasas (GST)

Las glutatión S-transferasas (GST) son una súper familia de enzimas de la fase II del metabolismo de fármacos, cuyo papel principal es la desintoxicación de xenobióticos electrófilos catalizando una reacción de conjugación de GSH a un átomo de carbono, azufre o nitrógeno electrofílico en compuestos apolares que frecuentemente son productos de metabolitos de la fase I (Henderson y Wolf 2011), en consecuencia, se forman compuestos estables y más hidrofílicos para facilitar su eliminación del cuerpo (Armstrong 1991).

Existen cuatro familias de GST que incluyen la citosólica, la mitocondrial, la peroxisomal (Armstrong 1991) y la microsomal, también denominadas proteínas asociadas a la membrana en el metabolismo de eicosanoides y glutatión (Henderson y Wolf 2011). Las GST citosólicas son diméricas y con pesos moleculares de sus subunidades de ~25 kDa. La clasificación de las GST en clases alfa, mu, pi, theta, zeta, omega y sigma se basa en la semejanza entre sus estructuras primarias (Mannervik, et al. 2005).

En los humanos, existen marcadas diferencias interindividuales en la expresión de las diversas clases de GST alfa, mu, pi y theta (Hayes y Strange 2000). Casi todos los miembros de la familia GST exhiben variantes genéticas, lo que resulta en la falta completa o disminución de la actividad de la enzima (Board, et al. 1990). Estas variantes se han asociado con una mayor susceptibilidad para presentar varias formas de cáncer, hepatopatía alcohólica y hepatitis tóxica causada por productos químicos y medicamentos (Dragovic, Boerma, et al. 2010).

Los estudios de asociación recientes sugieren que las deficiencias por determinadas por variantes genéticas de las GST pueden ser un factor de riesgo para reacciones adversas idiosincrásicas a CLZ son resultado de la formación de metabolitos reactivos del fármaco (Dragovic, Venkataraman, et al. 2014).

1.9.1 GSTP1

En humanos, un único gen localizado en el cromosoma 11q13 codifica para la isoforma pi de GST (GSTP). El gen *GSTP1* posee siete exones y abarca aproximadamente 3 kb que codifican para una transfersasa de 210 aminoácidos. *GSTP1* está altamente expresada en la mayoría de los tejidos extrahepáticos y se sobre expresa en distintos tipos de tumores (Di Pietro, Magno y Rios-Santos 2010).

Debido a que GSTP inactiva muchos carcinógenos ambientales, sus variantes genéticas han sido de gran interés en numerosos estudios para evaluar su implicación en la susceptibilidad de los individuos a diferentes tipos de cáncer y la eficacia de la quimioterapia (Dragovic, Venkataraman, et al. 2014).

El gen *GSTP1* es altamente polimórfico en la población humana debido a que presenta diversas variantes de un solo nucleótido (SNV) que provocan un cambio de aminoácido en la proteína codificada (SNV no sinónimo). Las variantes alélicas de *GSTP1* que contienen una sustitución p.Ile105Val (NM_000852.3; c.313A>G; rs1695), p.Ala114Val, o una combinación de ambas variantes, han sido las más estudiadas. Estas variantes mostraron una menor actividad en comparación con el genotipo silvestre de *GSTP1* (Ile105 / Ala114) (Dragovic, Venkataraman, et al. 2014).

1.9.2 GSTT1 y GSTM1

El gen *GSTM1* se encuentra en 1p13.3, y su variante más común es una delección del gen completo (NM_000561, *GSTM1* alelo nulo) que ocasiona una falta de actividad enzimática. *GSTT1* está ubicado en 22q11.2 y también se ha informado de una delección de este gen (NM_000855.3; *GSTT1* alelo nulo) con actividad nula. Se ha reportado que aproximadamente el 30% de los individuos caucásicos carecen de la actividad de las enzimas GSTM o GSTT debido a delecciones homocigotas de los genes que codifican estas proteínas, lo que los hace más propensos a diversas enfermedades (Emeville, et al. 2014).

Además, se ha descrito que la actividad de GSTM está reducida significativamente en pacientes con ESQ en comparación con individuos control (Gawryluk, et al. 2011). Los hallazgos contradictorios que los investigadores han obtenido hasta ahora indican que otros factores, como la etnicidad, también deben tenerse en cuenta al evaluar los factores de riesgo de TP (Pejovic-Milovancevic, et al. 2016; Cătană, et al. 2013; Bhattacharjee, et al. 2013; Kim, et al. 2015)

1.10 GCLC

El gen *GCLC* codifica para la subunidad catalítica de GCL se encuentra en la región cromosómica 6p12.1, está compuesto por 16 exones y abarca aproximadamente 48 kb del DNA (Walsh, Feulner y Reilly 2001).

Se tiene gran interés por una variante de trinucleótidos repetidos GAG en la región 5'-UTR de este gen, debido a que existen estudios que confirman que el número de repetidos afecta tanto los niveles de GSH como la sensibilidad a fármacos en múltiples líneas celulares (Walsh, Feulner y Reilly 2001). Por otro lado, se ha encontrado que el número de repetidos está relacionado con la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística (McKone, et al. 2006); riesgo de enfermedad cardiovascular (Nakamura, et al. 2002); abuso de drogas (Hashimoto, et al. 2008); diabetes mellitus (Bekris, et al. 2007); asma (Polonikov, et al. 2007) y para interés de este trabajo, con ESQ y TB (Tosic, et al. 2006).

Los genotipos 7/8, 8/8, 8/9 y 9/9 (número de repetidos GAG) de *GCLC* suelen ser más abundantes en los pacientes en comparación con los sujetos control, por ello se denominan "genotipos de alto riesgo"; mientras que los genotipos 7/7 y 7/9 se presentan mayoritariamente en los sujetos control y se denominan "genotipos de bajo riesgo" (Gysin, Kraftsik y Boulat, y otros 2011).

Se ha evidenciado que esta variación en los repetidos GAG tiene consecuencias funcionales en cultivos de fibroblastos bajo condiciones de estrés oxidativo, los genotipos de alto riesgo presentaron menor expresión de *GCLC*, menor actividad de

GCLC, y niveles menores de GSH, contrario a lo observado en sujetos con los genotipos de bajo riesgo (Gysin, y otros, 2011; Schwab, y otros, 2000).

2 Planteamiento del problema

La CLZ es un antipsicótico altamente efectivo para pacientes con TP refractarios, quienes bajo tratamiento presentan una disminución notable en la agresión y riesgo suicida.

El uso de CLZ en la consulta de Psiquiatría del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS), se recomienda principalmente cuando los pacientes con TP no han tenido respuesta a dos antipsicóticos previos en un periodo mínimo de seis semanas cada uno, así como en casos de riesgo suicida y en pacientes que presentan síntomas extrapiramidales.

A pesar de las numerosas ventajas que tiene la terapia con CLZ, esta puede llegar a ocasionar RA de alto riesgo como la agranulocitosis, síndrome metabólico, obesidad, enfermedades cardiovasculares, entre otras.

Aunque se tiene un estricto monitoreo en los pacientes bajo esta terapia, el desarrollo de estudios que puedan relacionar la variabilidad genética de cada individuo con la respuesta a este fármaco y la presencia de RA en población mexicana permitirá llegar a tener un tratamiento personalizado para prevenir al máximo la aparición de RA y tener el efecto terapéutico deseado. A su vez, estudios de variabilidad genética relacionados con procesos bioquímicos en población mexicana podrían explicar de una mejor forma la fisiopatología de los TP, así como estimar el riesgo de desarrollo de TP.

3 Justificación

Los TP afectan a más de 21 millones de personas en el mundo y a más del 1% de la población mexicana, son más frecuentes en hombres que en mujeres y quienes los padecen tienen 2-2.5 veces más probabilidades de morir a una edad temprana en comparación con el resto de la población (OMS 2018), lo que representa un problema de salud pública.

En la actualidad, no se cuenta con marcadores biológicos que apoyen el diagnóstico clínico de los TP. Debido a que el diagnóstico de los TP se basa en el testimonio de los pacientes, de sus familiares y de la sintomatología que suele ser muy similar en todos los TP, la búsqueda de marcadores bioquímicos y genéticos es indispensable para un mejor diagnóstico y selección de terapia adecuada para prevenir al máximo la aparición de RA causadas por CLZ.

4 Hipótesis

Algunas de las variantes de los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *GCLC* se asociarán con desarrollo de TP y mayor gravedad del cuadro clínico debido a deficiencias en la desintoxicación del organismo, este perfil genético a su vez dirigirá al paciente a presentar mayor presencia de RA debidas a CLZ, una menor respuesta al tratamiento farmacológico y las variantes de riesgo encontradas tendrán una correlación bioquímica con niveles de GSH como marcador de estrés oxidativo.

Los niveles plasmáticos de GSH serán menores en pacientes que en controles, lo que sugiere la presencia de estrés oxidativo debido a deficiencia en defensas antioxidantes lo que implica un riesgo de desarrollo de TP y que a su vez estará relacionado con una mayor gravedad del cuadro clínico y presencia de RA.

5 Objetivo general.

Establecer una correlación entre las variantes de los genes *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GCLC* con los niveles de GSH plasmático para determinar si se asocian con riesgo de desarrollo de TP, sintomatología de la enfermedad, respuesta al tratamiento y/o aparición de RA.

6 Objetivos particulares.

- Evaluar la relación entre la dosificación de CLZ y la gravedad de la enfermedad, la mejora después del tratamiento y aparición de RA en los pacientes.
- Cuantificar niveles de GSH plasmático en pacientes y controles para determinar su asociación con riesgo de desarrollo de la enfermedad y establecer una correlación con las variantes genéticas estudiadas en este trabajo.
- Establecer una correlación entre los niveles de GSH plasmático con niveles de CLZ administrados, gravedad de la enfermedad, la mejora después del tratamiento y aparición de RA en pacientes.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las CNV de los genes *GSTM1*, *GSTT1* y combinadas de *GSTM1/GSTT1* en pacientes y controles mediante MLPA y PCR dúplex.
- Evaluar la relación de las CNV de los genes *GSTM1*, *GSTT1* con niveles de CLZ administrados, gravedad de la enfermedad, mejora después del tratamiento y aparición de RA en pacientes.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los repetidos GAG en *GCLC* en pacientes y controles mediante análisis de fragmentos por PCR fluorescente.
- Evaluar la relación de la variante de repetidos trinucleótido GAG en *GCLC* con niveles de CLZ administrados, gravedad de la enfermedad, mejora después del tratamiento y aparición de RA en pacientes.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante c.313A>G (rs1695; p.Ile105Val) de *GSTP1* en pacientes y controles mediante PCR en tiempo real.
- Evaluar la relación de la variante c.313A>G (rs1695; p.Ile105Val) de *GSTP1* con niveles de CLZ administrados, gravedad de la enfermedad, mejora después del tratamiento y aparición de RA en pacientes.

7 Sujetos y métodos

7.1 Pacientes

Para el presente estudio se incluyeron 46 pacientes con TP, de los cuales 29 (63.04%) fueron diagnosticados con ESQ, 11 (23.91%) con TB y 6 (13.04%) con TE. Todas las valoraciones clínicas las realizaron médicos psiquiatras del INNNMVS. El grupo de pacientes está conformado por 29 (63.04%) hombres y 17 (36.96%) mujeres, jóvenes, de 36.70 ± 12.36 años.

Los pacientes fueron reclutados en la consulta externa del INNNMVS con su aprobación, previa firma de una carta de consentimiento informado (Anexo A) que forma parte del protocolo No. 104/17 titulado "IMPACTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL EN LA FARMACOCINÉTICA DE CLOZAPINA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA CLÍNICA EN PACIENTES CON TRASTORNOS PSICÓTICOS", aprobado por el Comité de Investigación y el Comité de Bioética del INNNMVS.

7.1.1 Criterios de inclusión

Pacientes de población mestiza-mexicana (MM), mayores de edad, que se encuentren bajo tratamiento con CLZ, que tengan diagnóstico clínico de ESQ, TE o TB, que acepten participar voluntariamente en el estudio y firmen carta de consentimiento informado.

7.1.2 Criterios de exclusión

Pacientes de nacionalidad extranjera, pacientes con TP que no se encuentren actualmente bajo tratamiento de CLZ y/o pacientes que no acepten participar en el estudio.

7.2 Controles

Se incluyeron como controles a 46 personas MM que no presentaban algún TP, ni antecedentes de ello en su familia o de alguna enfermedad neurodegenerativa. Estos

fueron seleccionados pareados por edad y género con el grupo de pacientes. Al igual que los pacientes, firmaron una carta de consentimiento informado para el banco de DNA del Departamento de Genética, INNNMVS (Anexo B).

7.3 Toma de muestra biológica.

Se tomaron muestras de sangre periférica por punción venosa, recolectadas en tubos *Vacutainer™* (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) de 5ml con citrato de sodio (22mg/ml) como anticoagulante para extracción de DNA y un tubo con EDTA para medición de GSH. En caso de que el paciente no accediera a una toma de muestra sanguínea, se optó por toma de muestra de saliva, recolectada con el paquete comercial *Oragene-DNA OG 500* (DNA genotek, OraSure Technologies Inc. Belén, Pensilvania, Estados Unidos).

7.4 Tratamiento de la muestra.

7.4.1 Muestra sanguínea

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000rpm por 6 minutos a 4°C, se aislaron plasma y *Buffy coat* (capa leuco-plaquetaria), se alicuotaron en volúmenes de 500 µl y se almacenaron a -80°C.

7.4.1.2 Extracción de DNA por metodología de sales (modificada) (Gaaib, Nassief y Al-Assi 2011)

- I. Al volumen de sangre obtenido se agrega amortiguador de lisis de glóbulos rojos (BLGR; solución NH₄CL 0.155 mM, KHCO₃ 10 mM y EDTA 0.1 mM a pH=7.4) en proporción de 1:3 en tubo cónico de 15ml. Se homogeniza la mezcla por inversión hasta la lisis de los glóbulos rojos y se centrifuga a 3000 rpm por 6 minutos.
- II. El botón de células blancas obtenido en el paso anterior, se transfiere a tubos de 1.5 ml y se agregan 1 ml de BLGR para su fácil transferencia, se centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos. Se realizan 1-2 lavados adicionales del botón con BLGR para

- eliminar lo más posible los glóbulos rojos lisados, se centrifuga a la misma velocidad por el mismo tiempo y se descarta el sobrenadante en cada lavado.
- III. Al botón limpio se añaden 570 μ l de NaCl 5mM y se agita por 2 minutos para provocar una turgencia celular. Posteriormente, se adicionan 40 μ l de solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% p/v y se agita durante 5 minutos para la ruptura de membranas de las células blancas. Después se adicionan 200 μ l de NaCl 7M y se agita durante 10 minutos para la precipitación de proteínas. Consecutivo a esto, se centrifuga a 11500 rpm por 20 minutos a 4°C.
 - IV. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio de 1.5 ml. Se adicionan 600 μ l de mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1 v/v) para una extracción orgánica de componentes celulares no polares. Se centrifuga a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C.
 - V. La fase acuosa se transfiere a un tubo de 1.5 ml y se le adicionan 600 μ l de etanol absoluto a 4°C para la precipitación del DNA y separación de sales remanentes. Se centrifuga a 14000 rpm por 15 minutos y se realiza un lavado del precipitado con 600 μ l de etanol al 70% v/v para la eliminación de sales y se centrifuga a 14000 rpm por 15 minutos.
 - VI. Se descarta el sobrenadante y se seca la muestra por centrifugación al vacío, se agregan 200 μ l de agua inyectable para su rehidratación.
 - VII. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría con equipo *Nanodrop* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*), se realizaron las diluciones de trabajo correspondientes y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.4.1.3 Precipitación de proteínas en plasma.

- I. En un tubo ámbar de 2ml se realiza una dilución 1:1 de plasma (de muestras con anticoagulante EDTA) con ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v.
- II. Se mezcla con *vórtex* y se deja reposar en hielo por 10 minutos.
- III. Se centrifuga la muestra a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C.

- IV. Se transfirió el sobrenadante en tubos ámbar de 600 μ l, se mantienen a -80°C durante un día y se descarta el *pellet* de proteínas.

7.4.2 Muestra de saliva.

La extracción de DNA a partir de muestras de saliva se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante de OrangeTM (DNA genotek 2017). Únicamente se modificó el procedimiento con la introducción de extracción orgánica mediante cloroformo: alcohol isoamílico 49:1 para eliminación de componentes celulares no polares, previo a la precipitación de DNA con alcohol etílico absoluto.

7.5 Cuantificación de GSH

- I. Se prepararon los siguientes reactivos: Amortiguador de fosfatos 0.1M + EDTA 5mM, ortoftaldehído (OPA) 1mg/ml, GSH stock 1mg/ml y GSH solución de trabajo 5 μ g/ml.
- II. Se preparó 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, μ l)	Amortiguador (μ l)	Concentración (μ M)
Blanco	0	1000	0
1	120	880	0.975
2	240	760	1.95
3	480	520	3.9
4	960	40	7.8
5	9.6 *	990.4	15.6

*Se tomó volumen de solución *stock* de GSH.

- III. En placa protegida de la luz, se agregaron 122.7µl de amortiguador (paso I) a cada pozo, 13.6 µl de cada punto de la curva o plasma sin proteínas. Cada muestra se realizó por duplicado.
- IV. Se agregaron 13.6µl de OPA, se mezcló la reacción y la placa se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- V. La lectura de la placa se hizo por fluorimetría 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).

7.6 Reacción de amplificación dependiente de sondas de ligados múltiples (MLPA)

Se utilizó el panel SALSA MLPA P128-C1 ((#P128-100R, MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) para el estudio de variantes en el número de copias de varios genes de la familia de los citocromos P450 y de las Glutación S-transferasas. Contiene un par de sondas para cada uno de los siguientes genes: *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *GSTP1*, *GSTT1* y *GSTM1*. Además, el panel incluye 12 sondas de referencia autosómicas de genes de copia única (MRC-Holland 2015).

La reacción de MLPA (Tabla 2) se realizó siguiendo el protocolo general versión 005 (MRC-Holland 2017) publicado en septiembre de 2014 por el fabricante. Sólo se modificaron los volúmenes de reacción, incluyendo la concentración de DNA (25 ng).

7.6.1 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador de *Applied Biosystems*® (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*), modelo 3130 y 3500. Se utilizó 0.7 µl de la reacción de MLPA, 0.2 µl de estándar de tamaños LIZ 500 y 9 µl de formamida. La mezcla de reacción se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos y luego se llevó a 4°C. El analizador genético consta de un arreglo de 8 capilares de 50 cm de

Tabla 2. Volúmenes de reacción para MLPA

Reacción de hibridación	Volumen (μl)
DNA (5ng/ μ L)	5
Amortiguador de hibridación	0.75
Mezcla de sondas	0.75
Reacción de ligación	Volumen (μl)
Amortiguador A para ligación	1.5
Amortiguador B para ligación	1.5
DNA ligasa	0.5
H ₂ O	12.5
Amplificación por PCR	Volumen (μl)
Mezcla de PCR	1
DNA polimerasa	0.25
H ₂ O	3.75

longitud y utiliza polímero POP7 (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*). Las condiciones de corrida fueron: voltaje de inyección 1.2kV, tiempo de inyección 8s, voltaje de corrida 15 kV, tiempo de corrida 2000 s. Los datos crudos se

visualizaron con el programa *GeneMapper v5.0*. Los resultados se visualizaron en la nube de *ThermoFisher* con el programa *Peak scanner* (Figura 5).

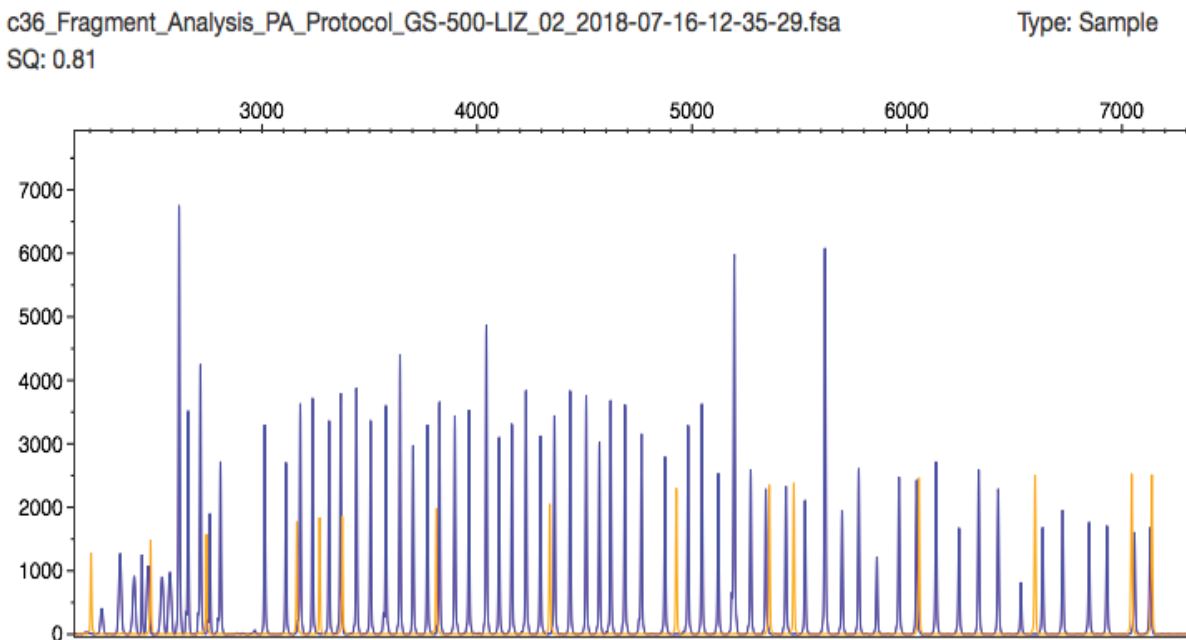


Figura 5. Visualización de datos crudos de MLPA para el panel P128-C1 con el programa de *Peak scanner*. Patrón de electroforesis capilar (azul) de las 54 sondas de MLPA incluidas las de referencia. En color naranja se observa el estándar de tamaños LIZ 500 (eje X, puntos de datos que puede ajustarse a tamaños en pares de bases; eje Y, emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias de fluorescencia (RFU)).

7.6.2 Análisis de datos con el programa *Coffalyzer.net*

Los datos obtenidos de la electroforesis capilar se analizaron con el programa *Coffalyser.Net*. El análisis de MLPA se realiza en dos pasos: análisis de fragmentos de DNA y análisis comparativo de muestras vs. control (normalización de los datos).

En el primer paso, se hace un ajuste entre los tamaños teóricos y los tamaños obtenidos experimentalmente para etiquetar cada sonda con la región génica asignada a cada amplicón. El programa cuenta con un margen de ± 3 nucleótidos para la búsqueda de sondas y asignación de etiquetas. Debido a que se ocuparon dos equipos distintos y condiciones de corrida diferentes, fue necesario hacer un ajuste manual en los tamaños

de los picos detectados según lo observado en los datos crudos obtenidos del equipo 3500 y 3130.

En el segundo paso, se establece cuáles son las muestras control; cuyas señales de fluorescencia se consideran dosis normales, posterior a esto las muestras de los pacientes se comparan con las muestras control (Figura 6). Las señales obtenidas inferiores a la dosis normal son denominadas como deleciones; mientras que las señales superiores se denominan duplicaciones. Se debe considerar que se hace un ajuste de 1 desviación estándar para poder considerarse como alteración estructural (duplicación o deleción).

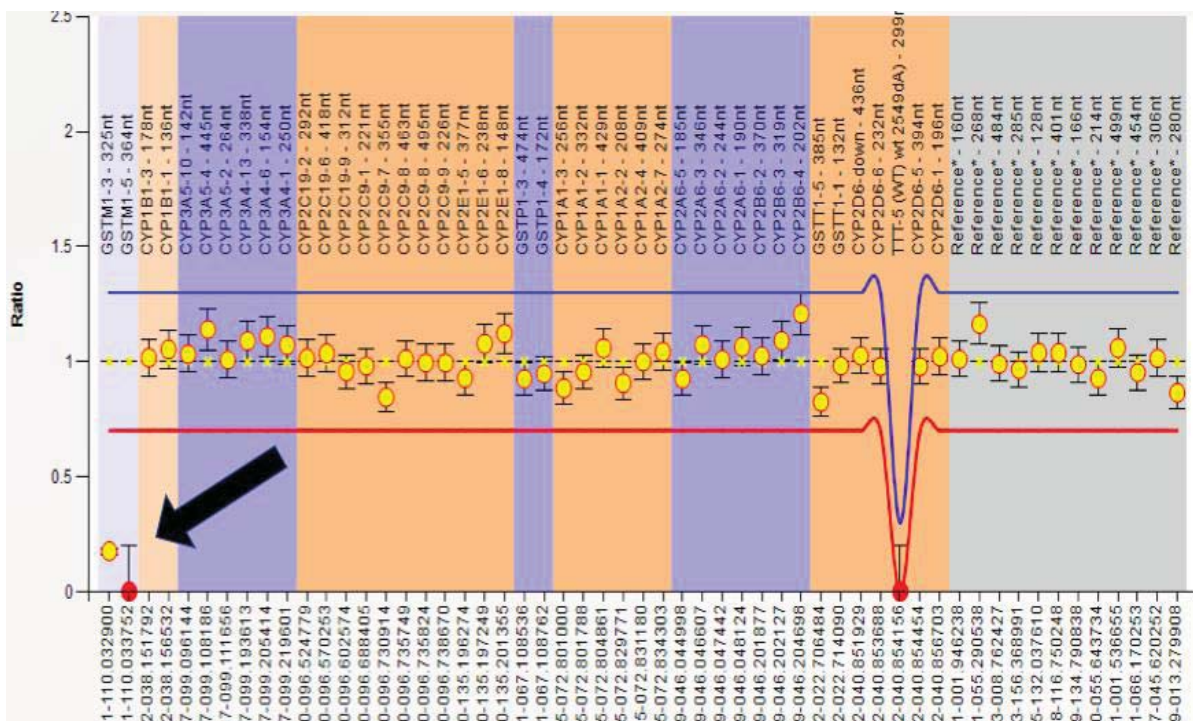


Figura 6. Ejemplo de análisis de datos con *Coffalyzer.Net*. Análisis de reacción de MLPA estandarizando el tamaño de las señales obtenidas a un control sano sin deleciones o duplicaciones (DNA comercial, CEPH1347-02, AB). En la parte superior del eje horizontal, puede observarse la región génica a la que pertenece cada punto, en el eje vertical se establece la dosis génica relativa, las líneas en azul y rojo señalan los límites superior e inferior, respectivamente de la dosis génica normal. En esta imagen, se puede apreciar una deleción homocigota para las sondas *GSTM1-3* y *GSTM1-5* que corresponden a los exones 3 y 5 del gen *GSTM1* (Flecha).

7.7 Confirmación de resultados de CNV de *GSTT* y *GSTM*.

7.7.1 Confirmación genotipos nulos mediante PCR dúplex punto final.

Se realizó una confirmación de los resultados obtenidos por MLPA para los genotipos nulos en 24 muestras (52.27%) de la población de controles para validar los resultados obtenidos, mediante una PCR dúplex en donde se utilizaron oligonucleótidos del proveedor *IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, Iowa, Estados Unidos)* (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados y características de la PCR dúplex para confirmación de resultados de MLPA.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Temperatura de fusión (Tm) (°C)
<i>GSTM1 F</i>	CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG	273	55.5
<i>GSTM1 R</i>	CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC		53.5
<i>GSTT1 F</i>	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	255	55.8
<i>GSTT1 R</i>	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA		61.7
<i>β-Globina F</i>	ACA CAA CTG TGT TCA GC	109	52.7
<i>β-Globina R</i>	AAC TTC ATC CAG GTT CAC C		52.7

Para la reacción de PCR punto final se utilizaron reactivos de *Thermo scientific* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) y los volúmenes de reacción expuestos en la Tabla 4. Para la amplificación se utilizaron las condiciones de la Tabla 5.

Posteriormente se analizaron 5 μ l de la reacción de PCR con 1 μ l de amortiguador de carga mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador de boratos por 40 minutos a 100V y teñido con bromuro de etidio al (0.5g/ml). La imagen de los resultados se capturó con el fotodocumentador *Gel Doc™ XR+* (*BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos*) y un ejemplo de estos resultados se puede apreciar en la Figura 7.

Tabla 4. Reacción de PCR dúplex.

Reactivo	Volumen (μl)
<i>Amortiguador Hot Start (Thermo scientific)</i>	5
MgCl₂ (25mM)	5
dNTP (100mM)	1
<i>Taq DNA Polimerasa (5U/ μl)</i>	0.3
Oligonucleótido β-Globina F (10μM)	1.5
Oligonucleótido β-Globina R (10μM)	1.5
Oligonucleótido (GSTM1/GSTT1) F (10μM)	1.5
Oligonucleótido (GSTM1/GSTT1) R (10μM)	1.5
H₂O	cbp 50
DNA (50ng)	2

F, *forward* o hebra sentido; R, *reverse* o hebra antisentido en el DNA.

Tabla 5. Condiciones de reacción PCR dúplex.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización	94	4
35 ciclos:		
Desnaturalización	94	1
Hibridación	52	1
Elongación	72	2
Elongación final	72	7

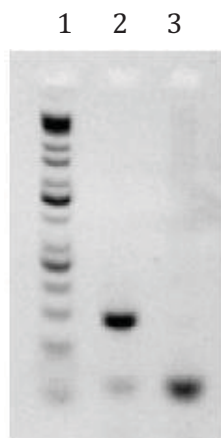


Figura 7. Confirmación de resultados de MLPA mediante PCR dúplex. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Marcador universal de pesos (100pb, *Invitrogen*) en el carril 1; PCR dúplex de muestra control, donde amplificó el gen de la β -Globina (109 pb) y el gen *GSTM1* (273 pb) en el carril 2; PCR dúplex de muestra de paciente con TP, donde puede apreciarse únicamente la amplificación de β -Globina y no hay producto de *GSTM1*, lo que confirmó una deleción homocigota de ese gen en la muestra (carril 3).

7.7.2 Confirmación de genotipos mediante PCR cuantitativa por SYBR Green.

Se realizó una confirmación de los resultados obtenidos de 10 muestras de pacientes (21.74%) para *GSTM1* y 5 muestras de controles (10.87%) para el mismo gen. Para *GSTT1* se confirmaron 6 muestras de pacientes (13.04%) y 8 muestras de controles (17.39%) mediante PCR cuantitativa por SYBR Green en equipo *StepOne™* de *Applied Biosystems®* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) en la que se utilizaron los volúmenes de reacción de la Tabla 6 para validar los resultados obtenidos, para cada gen analizado se utilizó de referencia el gen endógeno para *HSA* por triplicado y la dosis génica se comparó con DNA comercial (Human DNA Male; Part.360486; *Applied Biosystems®*). Posteriormente se realizó un ajuste de controles seleccionados en MLPA.

Tabla 6. Reacción de PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (μL)
<i>SYBR qPCR Master Mix (Kapa biosystems)</i>	2.5
Oligonucleótido (<i>GSTM1/GSTT1/HSA</i>) F (10μM)	0.4
Oligonucleótido (<i>GSTM1/GSTT1/HSA</i>) R (10μM)	0.4
H ₂ O	3.2
DNA (10 ng/μL)	3.0

Los resultados se analizaron con el programa *StepOne™ Software v2.0.2®* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) Se puede apreciar un ejemplo de los resultados en la Figura 8. Cada muestra se analizó por triplicado.

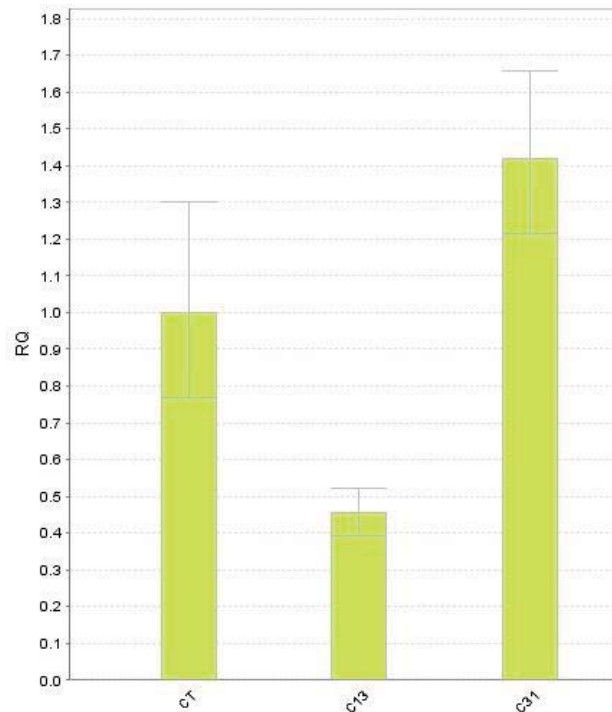


Figura 8. Confirmación de resultados mediante Sybr Green. Análisis de PCR cuantitativa del gen *GSTT1* tomando como dosis base a un control comercial denominado CT (*Human DNA Male*; Part.360486, AB) y el gen endógeno HSA. En el eje de las abscisas se encuentra cada una de las muestras y en el eje de las ordenadas se tiene la cuantificación relativa (RQ). La barra correspondiente a la muestra C13 corresponde a una delección heterocigota y la correspondiente a la muestra C31 a una duplicación heterocigota.

7.8 Análisis de fragmentos para repetidos GAG de *GCLC* mediante PCR fluorescente

Se realizó una PCR para amplificar la región de repetidos trinucleótidos GAG del gen que codifica para la subunidad catalítica de la enzima γ -glutamin cisteín ligasa (*GCLC*). Los oligonucleótidos, los volúmenes de reactivos y las condiciones se detallan para la PCR de *GCLC* se detallan en las Tablas 7, 8 y 9, respectivamente.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para análisis de repetidos GAG de GCLC

Oligonucleótido (marca <i>IDT</i>)	Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Temperatura de fusión (T_m) (°C)
<i>GCLC F</i>	/56-FAM/ CGG CTG AGT GTC CGT CTC GC	220	62.9
<i>GCLC R</i>	CCA CTT GAG AAC GTC CTT GTG CCG G		63.7

F, *forward* o hebra sentido; R, *reverse* o hebra antisentido en el DNA.

Tabla 8. Reactivos y volúmenes para PCR fluorescente de *GCLC*.

Reactivo	Volumen (μl)
Mezcla de reacción para PCR <i>Taq</i> <i>Master Mix (Qiagen)</i>	2.5
Oligonucleótido F	0.2
Oligonucleótido R	0.2
H₂O	1.6
DNA (5 ng/μL)	1.0

F, *forward* o hebra sentido; R, *reverse* o hebra antisentido en el DNA.

Tabla 9. 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

7.8.1 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador 3500 de *Applied Biosystems*[®] (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) utilizando 1 µl de reacción de PCR, 0.5 µl de estándar de tamaños LIZ 500 y 8.5 µl de formamida. Se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos y luego se llevó a 4°C. Las condiciones de corrida 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 *GeneMapper v5.0* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*) y en la nube de *ThermoFisher* con el programa *Peak scanner* (<https://apps.thermofisher.com>). Un ejemplo de los resultados se puede apreciar en la Figura 9.

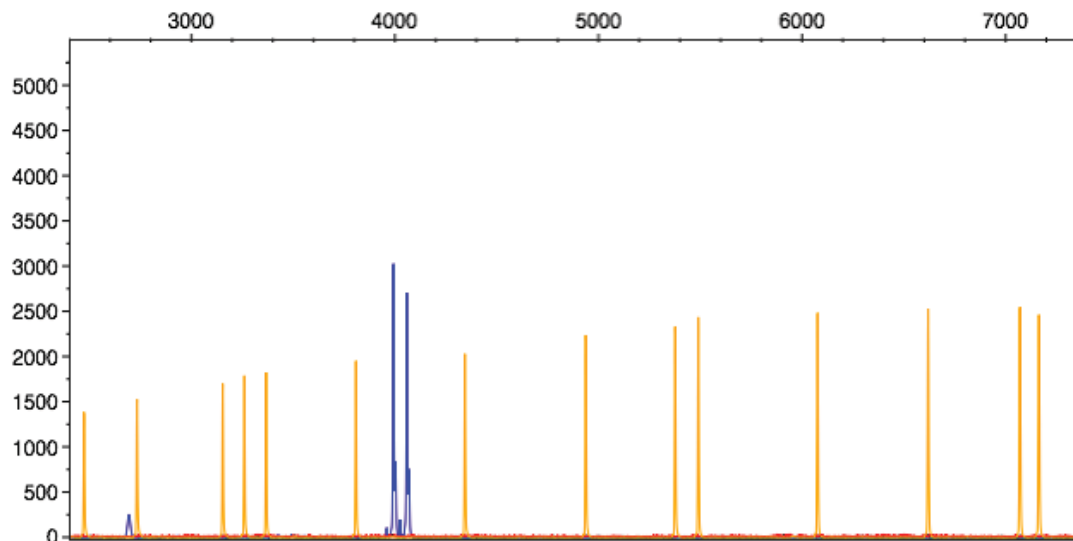


Figura 9. Análisis de fragmentos para repetidos GAG de *GCLC*. Ejemplo de genotipo heterocigoto 7/9 (azul) para la variante de repetidos GAG de *GCLC*; en naranja se aprecia el estándar de tamaños LIZ 500.

7.9 Confirmación de análisis de fragmentos para repetidos GAG de *GCLC* por medio de secuenciación Sanger.

Se realizó la confirmación de los resultados obtenidos por medio de análisis de fragmentos para repetidos GAG de *GCLC* por medio de reacción de secuenciación en 4 muestras (6.52%) de la población control y en 2 muestras (4.35%) de pacientes.

Los productos de la PCR fluorescente (sección 7.8) se corrieron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio para descartar la posibilidad de productos inespecíficos. Posteriormente se cortaron las bandas correspondientes y se purificaron mediante *Wizard® Gel and PCR clean-Up system* (Promega, Fitchburg, Wisconsin, Estados Unidos) bajo el procedimiento establecido por el fabricante (Promega 2017).

Posteriormente se realizó la reacción de secuenciación con los volúmenes y reactivos especificados en la Tabla 10 bajo las condiciones de reacción mencionadas en la Tabla 11.

Tabla 10. Reactivos y volúmenes para reacción de secuenciación de repetidos GAG de GCLC.

Reactivo	Volumen (μ l)
<i>Big dye (Applied Biosystem)</i>	1.5
Amortiguador 5x	2
Oligonucleótido R	1
PCR purificada	5.5

Tabla 11. Condiciones de reacción de secuenciación de repetidos GAG de GCLC.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización	96	60
25 ciclos:		
	96	10
	50	5
	60	240
Almacenamiento	4	600

Posterior a esto se realizó una purificación en columnas con sefarosa *sephadextm G-50 fine* (GE healthcareBio-sciences AB, Uppsala, Suecia) como indica el inserto del productor para posteriormente realizar una electroforesis capilar en secuenciador 3500 de Applied Biosystems® (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Los resultados fueron visualizados en *Sequencher 5.1* (Figura 10).

Los resultados de la variante c.313A>G (NM_000852.3, rs1695, p.Ile105Val) de *GSTP1* se analizaron con el programa *StepOne™ Software v2.0.2*® (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) Se puede apreciar un ejemplo de los resultados en la Figura 11. Cada muestra se analizó por duplicado.

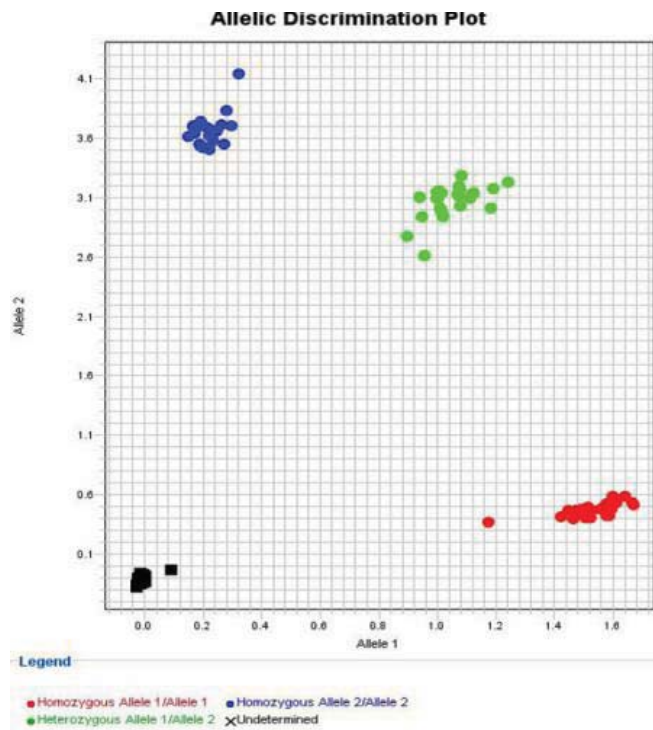


Figura 11. Gráfica polar de la genotipificación de la variante c.313A>G de *GSTP1* por PCR en tiempo real. En color azul se pueden apreciar las muestras que presentan el genotipo homocigoto A/A; en rojo las muestras que presentan el genotipo homocigoto G/G; en verde las muestras que presentan genotipo heterocigoto A/G y el color negro representa las muestras sin DNA o en las cuales no se obtuvo un genotipo.

8 Resultados y análisis.

Las características sociodemográficas de los 46 pacientes con TP incluidos en el presente trabajo se muestran en la Tabla 13.

La mayoría de los pacientes se encuentra en politerapia; ya que además del antipsicótico CLZ toma algún otro medicamento como ansiolítico, antidepresivo, anticonvulsivo, entre otros, para tratar distintas comorbilidades o bien, auxiliar a CLZ en el tratamiento de los síntomas del TP. Estos factores fueron considerados únicamente para el análisis multivariado, pero no se llegaron a apreciar diferencias estadísticamente significativas.

Las edades de los pacientes fueron de entre 18 y 73 años, todos los pacientes incluidos tuvieron al menos 18 semanas bajo tratamiento con CLZ, este es el tiempo en que el psiquiatra valora la respuesta al tratamiento farmacológico.

El hábito de consumo de tabaco, alcohol y drogas fue positivo en los porcentajes de la población estudiada presentados, sin embargo, el consumo de estos varía en periodo, cantidad y frecuencia además que muchos consumen más de una droga a la vez, estos factores no se consideraron para este estudio. En el caso de drogas, varía la naturaleza de la droga en cuestión, que puede ser cualquier droga psicoactiva, no se tomo distinción alguna entre las drogas consumidas por fines y objetivos de este trabajo.

En las Figuras 12 a 28 se presentan los diferentes análisis estadísticos descriptivos que se hicieron con los resultados obtenidos y en las tablas 14 y 20 se presentan los análisis multivariados.

Las escalas clínicas de los pacientes con TP son diferentes para cada enfermedad y los datos registrados en los expedientes clínicos respecto a esto son bastante heterogéneos. En el caso de los pacientes con ESQ se evalúa la escala PANSS. Debido a esto y a que 63.04% de los casos incluidos corresponde a ESQ; la correlación de esta escala clínica para evaluar la gravedad del cuadro clínico (al inicio y a las 18 semanas del tratamiento con CLZ), solo se realizó en el grupo de pacientes con ESQ.

Tabla 13. Características socio-demográficas de los pacientes con trastornos psicóticos estudiados

Característica	Pacientes n (%)
Edad (media)	36.54 (\pm 11.96)
Sexo	
Masculino	29 (63.04)
Femenino	17(36.96)
Trastorno psicótico	
Esquizofrenia	29 (63.04)
Trastorno Bipolar	11(23.91)
Trastorno Esquizoafectivo	6 (13.04)
Edad de inicio (media \pm DE*)	21(\pm 8)
Evolución de la enfermedad (media \pm DE*)	14.55 (\pm 9.25)
Pacientes en monoterapia	8 (17.40)
Pacientes en polifarmacia	38 (83.33)
Hábito de consumo	
Tabaco	33 (71.74)
Alcohol	19 (41.30)
Drogas	14 (30.43)
IMC (kg/m ² ; media \pm DE*)	29.19(\pm 6.36)

*DE= desviación estándar. n=46

8.1 Información clínica obtenida

A pesar de no haber encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre la dosis de CLZ y la gravedad del cuadro clínico (puntaje de la escala PANSS; Figura 12), se aprecia una tendencia, a dosis inferiores de la dosis estándar (DE; 200-400 mg/día) se tiene una menor gravedad del cuadro, a la vez, a dosis superiores de la DE se tiene una mayor gravedad.

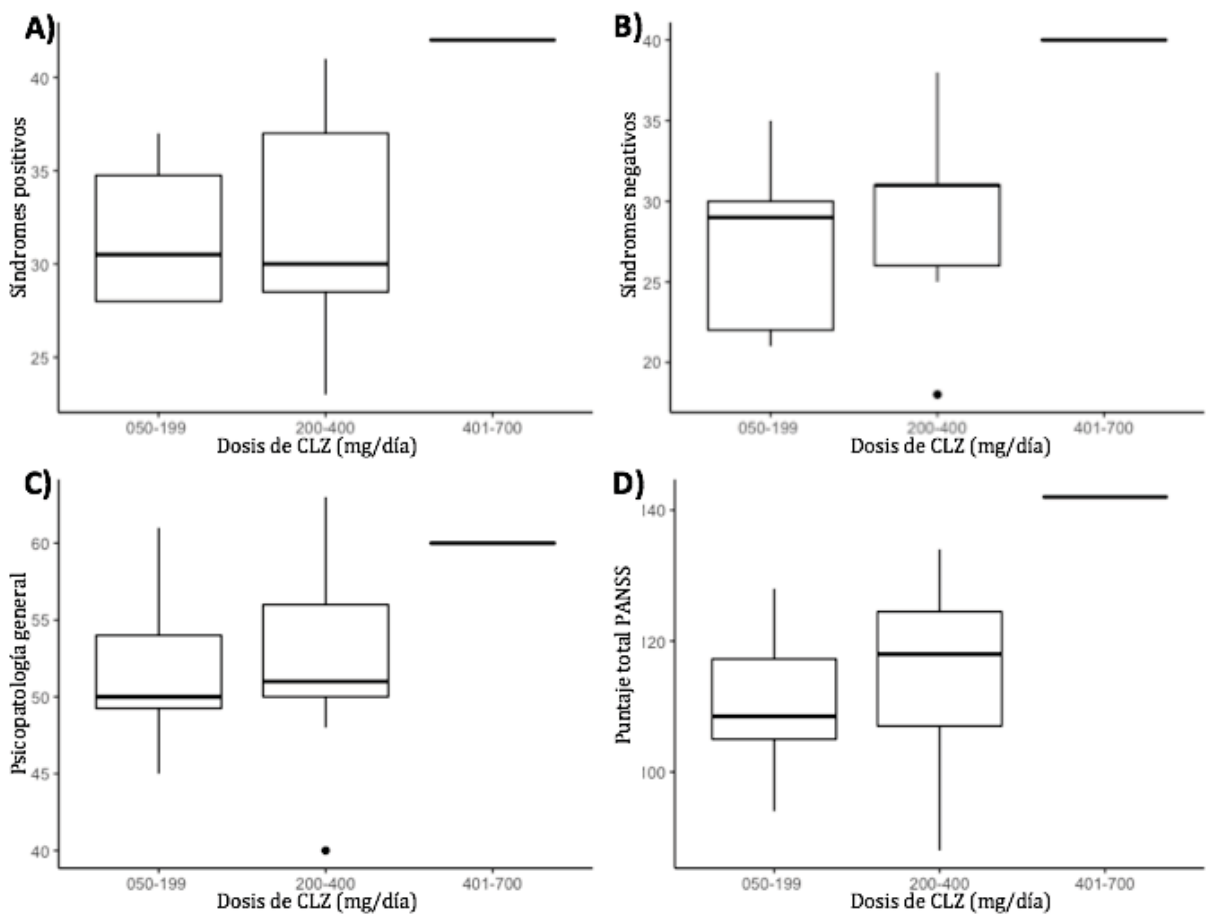


Figura 12. Relación entre dosis de CLZ y la escala PANSS. A) Relación entre la dosis de CLZ y la subescala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.13$). B) Relación entre la dosis de CLZ y la subescala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.13$). C) Relación entre la dosis de CLZ y la subescala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.38$). D) Relación entre la dosis de CLZ y la escala PANSS ($p= 0.08$).

La respuesta al tratamiento farmacológico fue valorada mediante la mejora en el cuadro clínico (disminución de escala PANSS) a la semana 18 tras comenzar el tratamiento con CLZ, a pesar de que todos los pacientes presentan una respuesta al tratamiento, no se observa una tendencia de una mayor mejora a mayores dosis de CLZ, por el contrario, a dosis superiores que la DE se tiene una menor mejora en el cuadro, a excepción del apartado B) en cuanto a la subescala de síndromes negativos, donde se aprecia una respuesta farmacológica similar en todas las dosis de CLZ. Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la escala PANSS, donde a dosis mayores que la DE se tiene una menor respuesta farmacológica por parte del paciente (D).

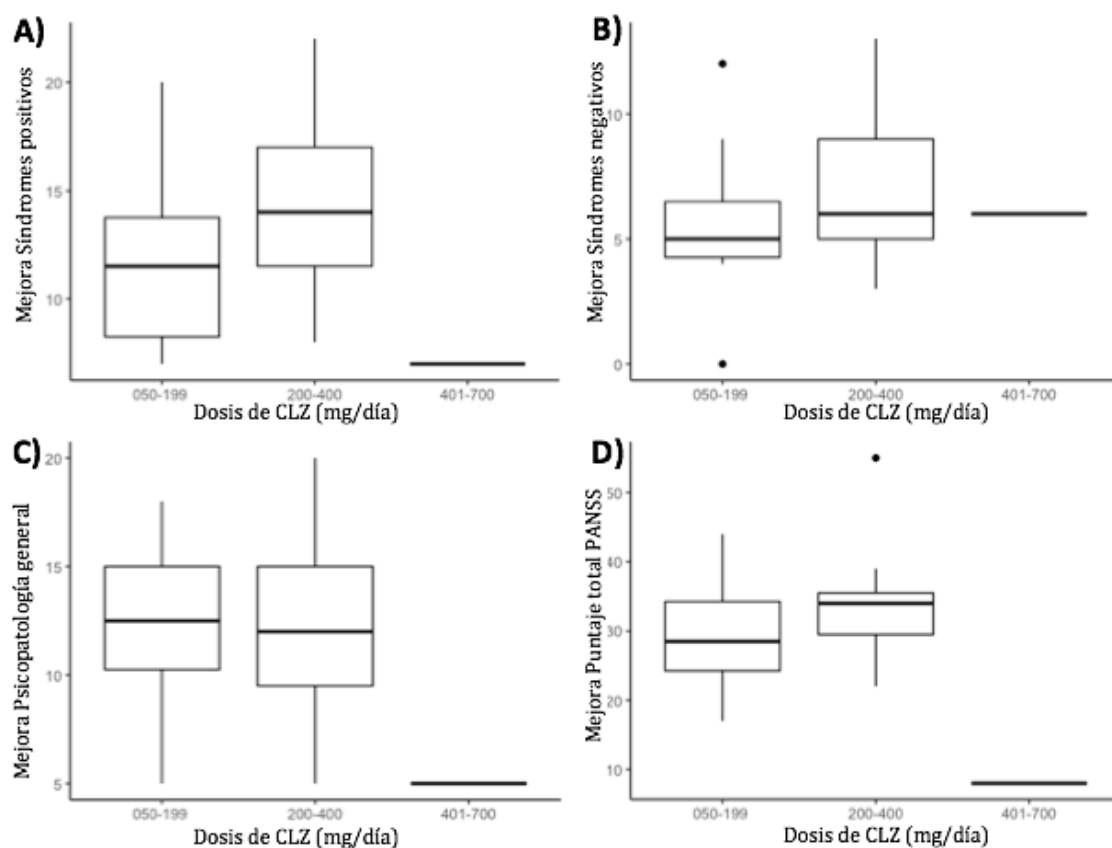


Figura 13. Relación entre dosis de CLZ y la mejora en el cuadro clínico a la semana 18 de tratamiento. A) Relación entre la dosis de CLZ y la mejora en la subescala de síndromes positivos de cada paciente ($p= 0.17$) B) Relación entre la dosis de CLZ y la mejora en la subescala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.58$) C) Relación entre la dosis de CLZ y la mejora en la subescala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.24$) D) Relación entre la dosis de CLZ y la mejora en la escala PANSS ($p= 0.02$ *; dosis: 401-700/200-400 $p= 0.02$ *).

A pesar de no obtener diferencias estadísticamente significativas, se aprecia que mayor dosis de CLZ hay menor presencia de RA, tanto en las RA totales (Figura 14 A) como en los subgrupos (Figura 14 B, C y D).

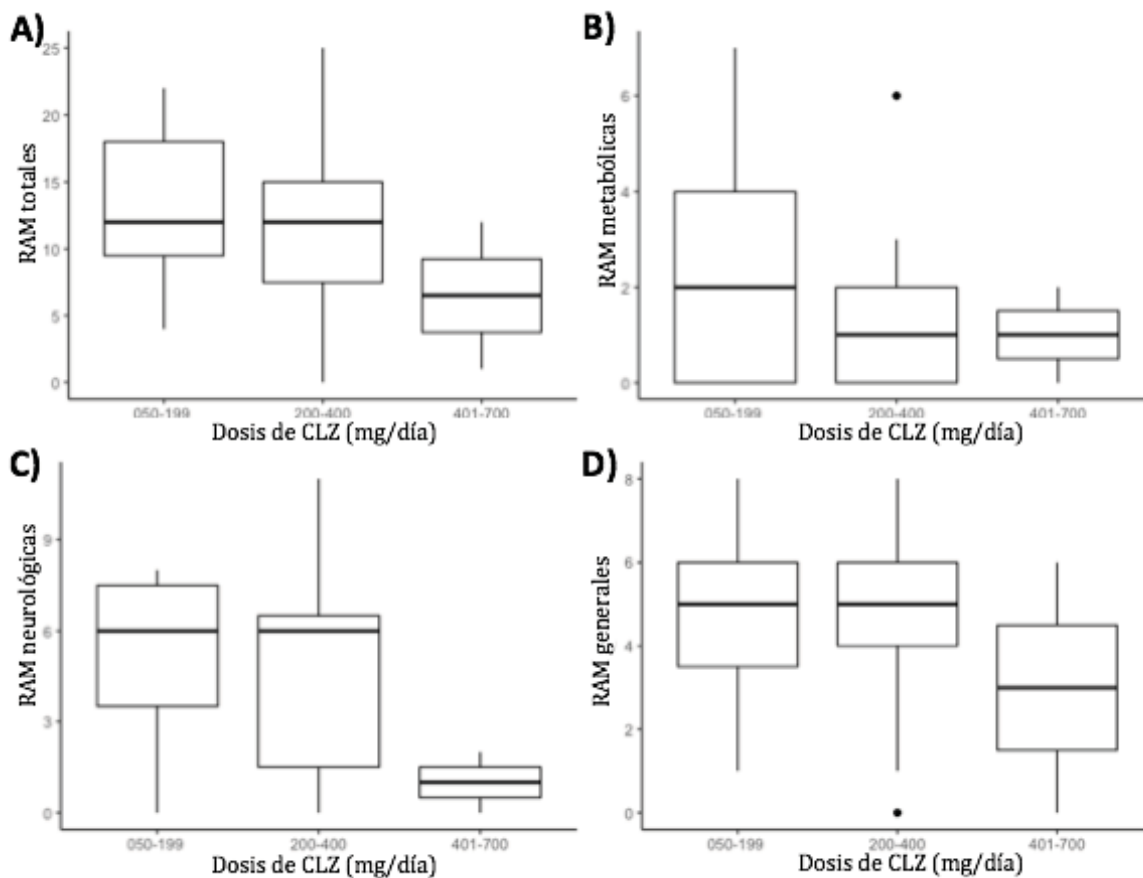


Figura 14. Relación entre dosis de CLZ y la presencia de RAM. A) Relación entre la dosis de CLZ y el número total de RAM que presentan los pacientes ($p= 0.42$). Relación entre la dosis de CLZ y el subgrupo de RAM “metabólicas” ($p= 0.53$) (B); con el subgrupo de RAM “neurológicas” ($p= 0.13$) (C); y con el subgrupo de RAM “generales” ($p= 0.41$) (D).

8.2 Niveles plasmáticos de GSH

Se encontró una disminución estadísticamente significativa de los niveles de GSH en plasma en el grupo de pacientes en contraste con el grupo control (Tabla 14 y Figura 15).

Por otro lado, se encontró que los resultados no fueron estadísticamente significativos ni ninguna tendencia aparente en cuanto a niveles de GSH con la evolución de la enfermedad y la dosis de CLZ administrada (Figuras 16 y 17).

Tabla 14. Cuantificación de niveles plasmáticos de GSH en pacientes con trastornos psicóticos (TP) y en controles (CT) mediante fluorometría.

GSH (μM)	TP (n=45)	CT (n=45)
Media \pm Desviación estándar	3.19 \pm 0.75	5.57 \pm 1.47
Rango	1.35-4.73	3.00-9.22

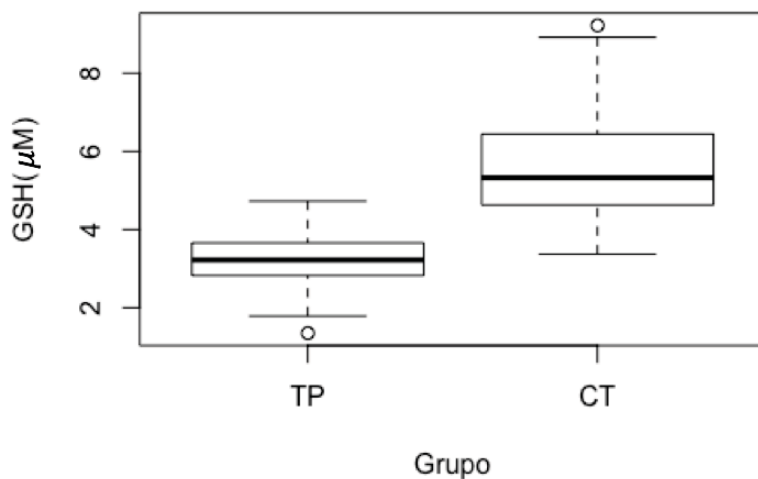


Figura 15. Niveles plasmáticos de GSH en pacientes con trastornos psicóticos (TP) y en controles (CT) mediante fluorometría. ($p=2.16\text{E-}12^{*}$)**

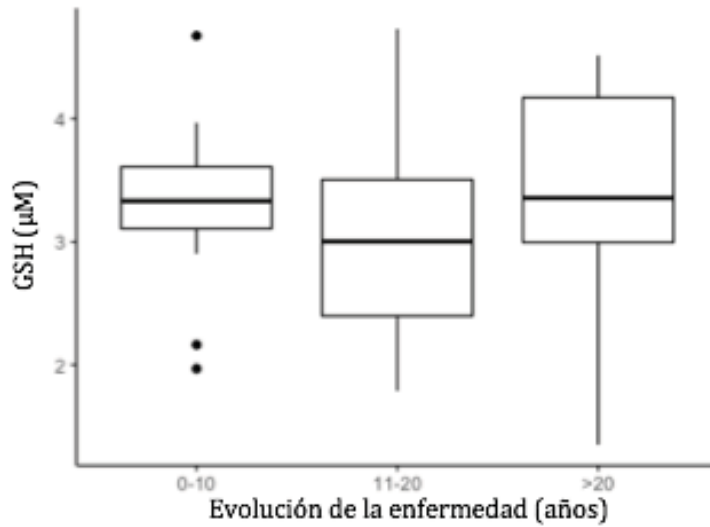


Figura 16. Niveles plasmáticos de GSH en pacientes en función de los años de evolución de la enfermedad (p=0.54).

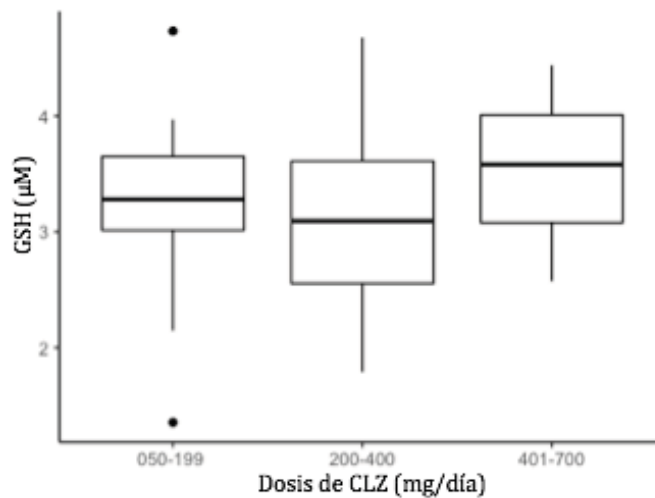


Figura 17. Relación entre dosis de CLZ y niveles de GSH en plasma (p= 0.72).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de RAM como se puede apreciar en la Tabla 15. Siendo el estimador con valor negativo en RAM Neurológicas y metabólicas, lo que implica que a menores niveles de GSH se tiene una mayor incidencia de RAM en estos subgrupos.

Tabla 15. Análisis multivariado de RAM y niveles de GSH.

Número de RAM	Estimador	Valor de p
Generales	-0.65	0.07
Neurológicas	-0.74	0.02*
Metabólicas	-0.72	0.03*
Número de RAM totales	0.35	0.03*

8.3 Resultados CNV de *GSTM1* y *GSTT1*

Se encontraron diferencias entre las frecuencias de las CNV de *GSTM1* y *GSTT1*, el genotipo silvestre (2 copias) de *GSTT1* tiene una mayor frecuencia en el grupo control comparado con el grupo de pacientes (OR=0.47), a su vez, el número de individuos con cero copias (delección homocigota o alelos nulos) de *GSTT1* es un poco más del doble comparado con los controles (OR= 2.56), en contraste, se tiene una mayor incidencia (OR=2.67) de las duplicaciones heterocigotas (3 copias) en el grupo de pacientes. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de copias de *GSTM1* y *GSTT1* presentes en pacientes y controles (Tabla 16).

En la Tabla 17 se presentan las frecuencias de los genotipos de riesgo, para los genes individuales de *GSTT1* y *GSTM1* se consideraron las deleciones heterocigotas y las deleciones homocigotas como genotipos de riesgo; para los genotipos combinados se consideraron como de riesgo a aquellos genotipos que presentaran menos de 4 copias al sumar los alelos presentes de ambos genes, es decir, que no presentan una compensación de una delección con alguna duplicación (ej. 0/2). No se encontraron diferencias significativas en la distribución de estos genotipos de riesgo en pacientes y controles, pero se observa mayor incidencia en genotipos de riesgo de *GSTT1* (OR=2.56).

Tabla 16. Frecuencias alélicas de *GSTM1*, *GSTT1* y genotipos combinados *GSTM1/GSTT1* encontrados en grupo control y grupo de pacientes.

No de copias								
<i>GTM1</i>	Pacientes	n	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
0	18	43	0.42	17	43	0.39	1.00	1.10
1	15	43	0.35	15	43	0.35	1.00	1.00
2	10	43	0.23	11	43	0.26	1.00	0.88
No de copias								
<i>GSTT1</i>	Pacientes	N	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
0	7	43	0.16	3	43	0.07	0.31	2.56
2	17	43	0.39	25	43	0.58	0.13	0.47
3	5	43	0.12	2	43	0.05	0.43	2.67
4	14	43	0.33	13	43	0.30	1.00	1.11
No de copias								
<i>GSTM1/GSTT1</i>	Pacientes	N	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
0/0	1	43	0.02	1	43	0.02	1.00	1.00
0/2	8	43	0.19	7	43	0.16	1.00	1.17
0/3	1	43	0.02	2	43	0.05	1.00	0.49
0/4	8	43	0.19	7	43	0.16	1.00	1.73
1/0	5	43	0.12	0	43	0.00	0.05	-
1/2	5	43	0.12	11	43	0.26	0.16	0.39
1/3	2	43	0.05	0	43	0.00	0.49	-
1/4	3	43	0.07	4	43	0.09	1.00	0.73
2/0	1	43	0.02	2	43	0.05	1.00	0.49
2/2	4	43	0.09	7	43	0.16	0.52	0.53
2/3	2	43	0.05	0	43	0.00	0.49	-
2/4	3	43	0.07	2	43	0.05	1.00	1.53

Número de copias *GSTM1* $\chi^2=0.08$, $p=1$; Número de copias *GSTT1* $\chi^2=4.45$, $p=0.24$. Número de genotipos combinados *GSTM1/GSTT1* $\chi^2=13.21$, $p=0.28$.

En las Figuras 18 a 24 se presentan la relación entre los genotipos de *GSTM1*, *GSTT1* y combinados con la escala PANSS y la respuesta al tratamiento farmacológico que se refleja por una mejora en el cuadro clínico, en ningún análisis estadístico de esta sección se encontraron resultados estadísticamente significativos, sin embargo, con fines de este trabajo se consideran algunas tendencias en los resultados con fin de estimar el comportamiento de los datos al incrementar la muestra. La mejora en el cuadro clínico se consideró como la disminución en la escala PANSS a la semana 18 de haber

comenzado la terapia con CLZ y los genotipos de riesgo y no riesgo se agruparon como se comentó previamente.

Tabla 17. Frecuencia de genotipos de riesgo y no riesgo de *GSTM1*, *GSTT1* y genotipos combinados de *GSTM1/GSTT1*.

Genotipo								
<i>GSTM1</i>	Pacientes	n	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
Riesgo	33	43	0.77	32	43	0.74	1.00	1.13
No riesgo	10	43	0.23	11	43	0.26	1.00	0.88
Genotipo								
<i>GSTT1</i>	Pacientes	n	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
Riesgo	7	43	0.16	3	43	0.07	0.32	2.56
No riesgo	36	43	0.84	40	43	0.93	0.31	0.39
Genotipo								
<i>GSTM1/GSTT1</i>	Pacientes	n	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
Riesgo	21	43	0.49	23	43	0.53	0.83	0.83
No riesgo	22	43	0.51	20	43	0.46	0.83	1.20

En la Figura 18 se aprecia una tendencia en cómo al disminuir el número de copias presentes en *GSTM1* se tiene una menor mejora en el cuadro clínico en la subescala de síndromes positivos, psicopatología general y la puntuación de la escala PANSS, al agrupar los genotipos (Figura 19) se dilucida el mismo comportamiento.

En cuanto a *GSTM1* se obtuvo una tendencia entre los genotipos de riesgo con la gravedad del cuadro clínico evaluado por la escala PANSS y todas sus subescalas el puntaje total de esta (Figura 20) en el cual estos genotipos tienen una mayor puntuación en la escala, a su vez, en cuanto a la respuesta al tratamiento farmacológico se observa que a medida que aumenta el número de alelos presentes se tiene una mayor mejora en el cuadro clínico en la subescala de síndromes positivos y negativos (Figura 21) y sucede el mismo fenómeno en cuanto a los genotipos de no riesgo (Figura 22).

En la Figura 23 se tiene una tendencia que muestra que los genotipos combinados de *GSTM1* y *GSTT1* de riesgo muestran una mayor gravedad de cuadro clínico debido a un alto puntaje en la subescala de psicopatología general y la escala PANSS que a su vez

presentan una menor mejora del cuadro clínico en síndromes positivos y negativos (Figura 24).

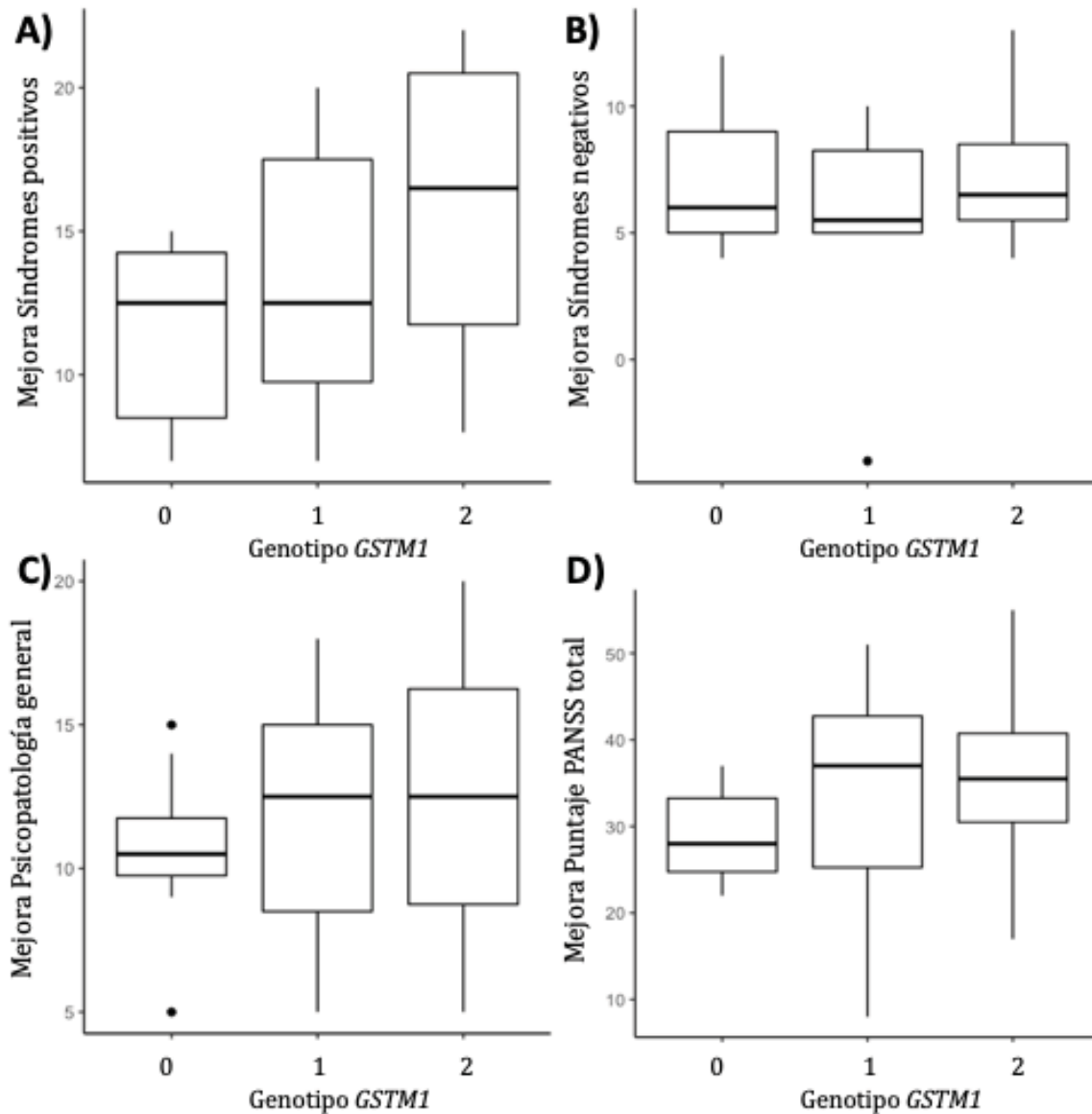


Figura 18. Relación entre genotipo de *GSTM1* y la mejora en la escala PANSS a la semana 18 de tratamiento. A) Relación entre el genotipo de *GSTM1* con la mejora en la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.37$). B) Relación entre el genotipo de *GSTM1* con la mejora en la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.58$). C) Relación entre el genotipo de *GSTM1* con la mejora en la escala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.78$). D) Relación entre el genotipo de *GSTM1* con la mejora en la escala PANSS ($p=0.62$).

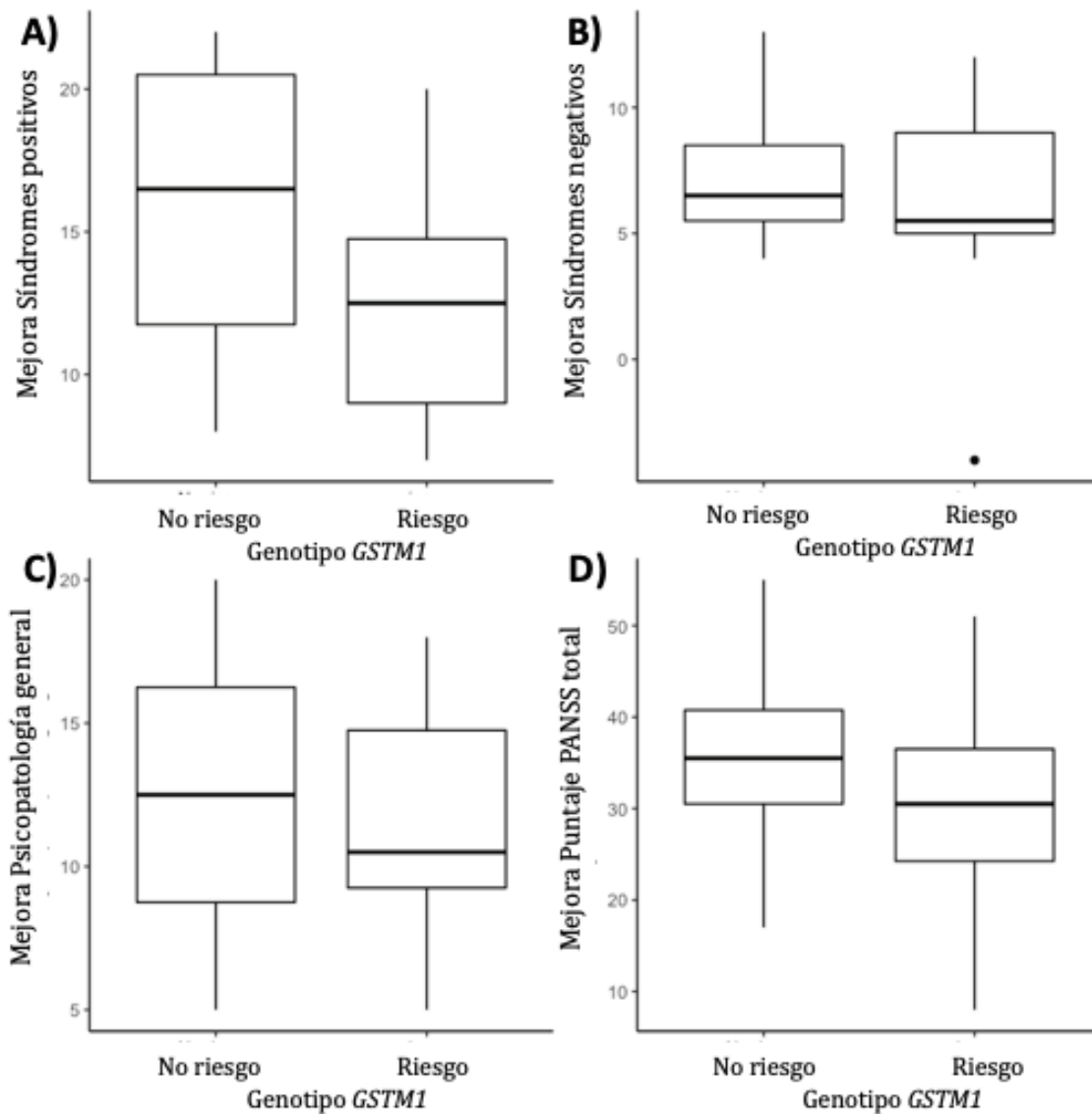


Figura 19. Relación entre genotipo riesgo de *GSTM1* y la mejora en la escala PANSS a la semana 18 de tratamiento. A) Relación entre el genotipo de riesgo de *GSTM1* con la mejora en la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.21$). B) Relación entre el genotipo de riesgo de *GSTM1* con la mejora en la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.56$). C) Relación entre el genotipo de riesgo de *GSTM1* con la mejora en la escala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.60$). D) Relación entre el genotipo de riesgo de *GSTM1* con la mejora en la escala PANSS ($p=0.57$).

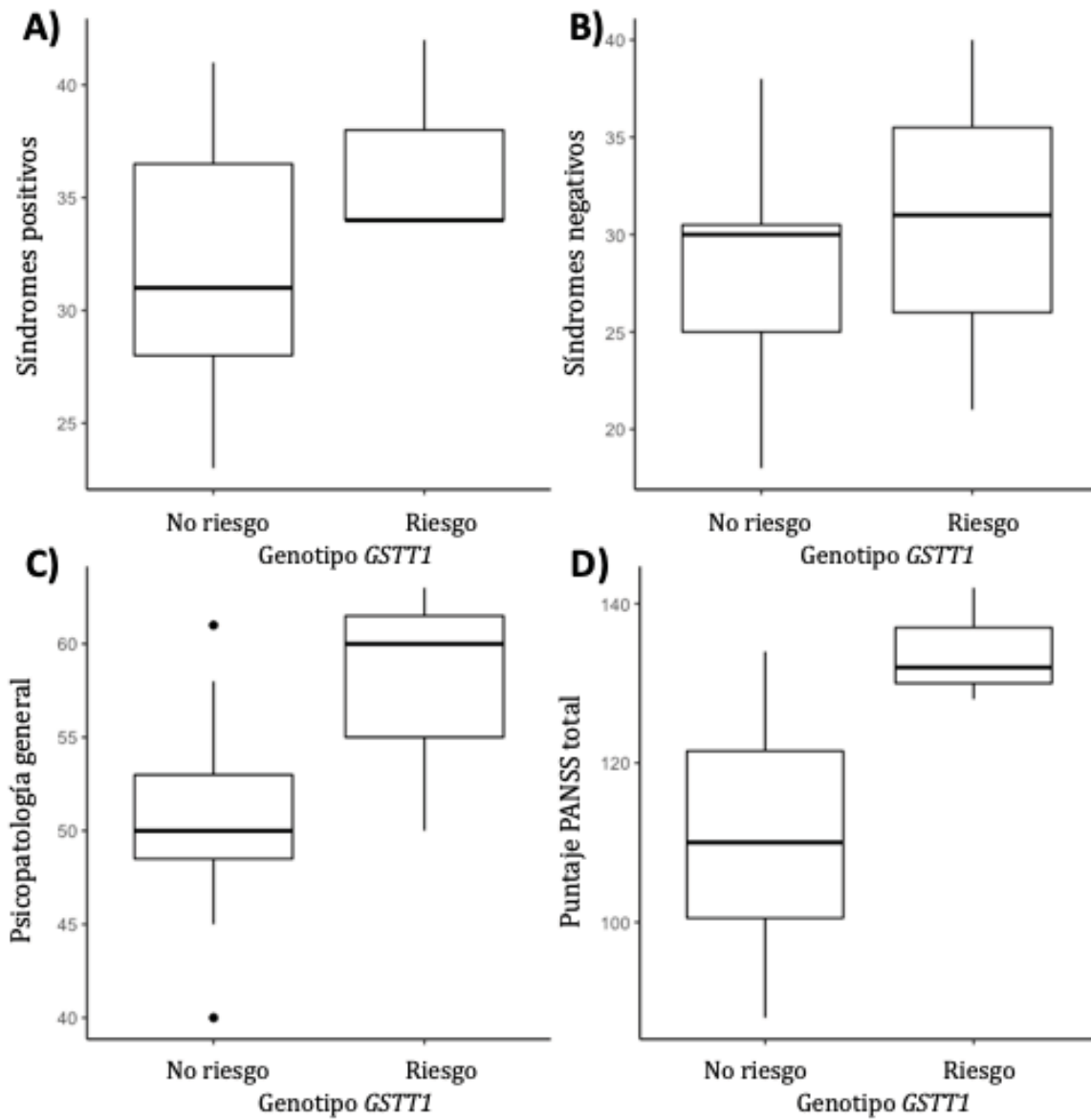


Figura 20. Relación entre genotipo de riesgo de *GSTT1* y la escala PANSS. A) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.23$). B) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.58$). C) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la escala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.06$). D) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la escala PANSS ($p= 0.02^*$).

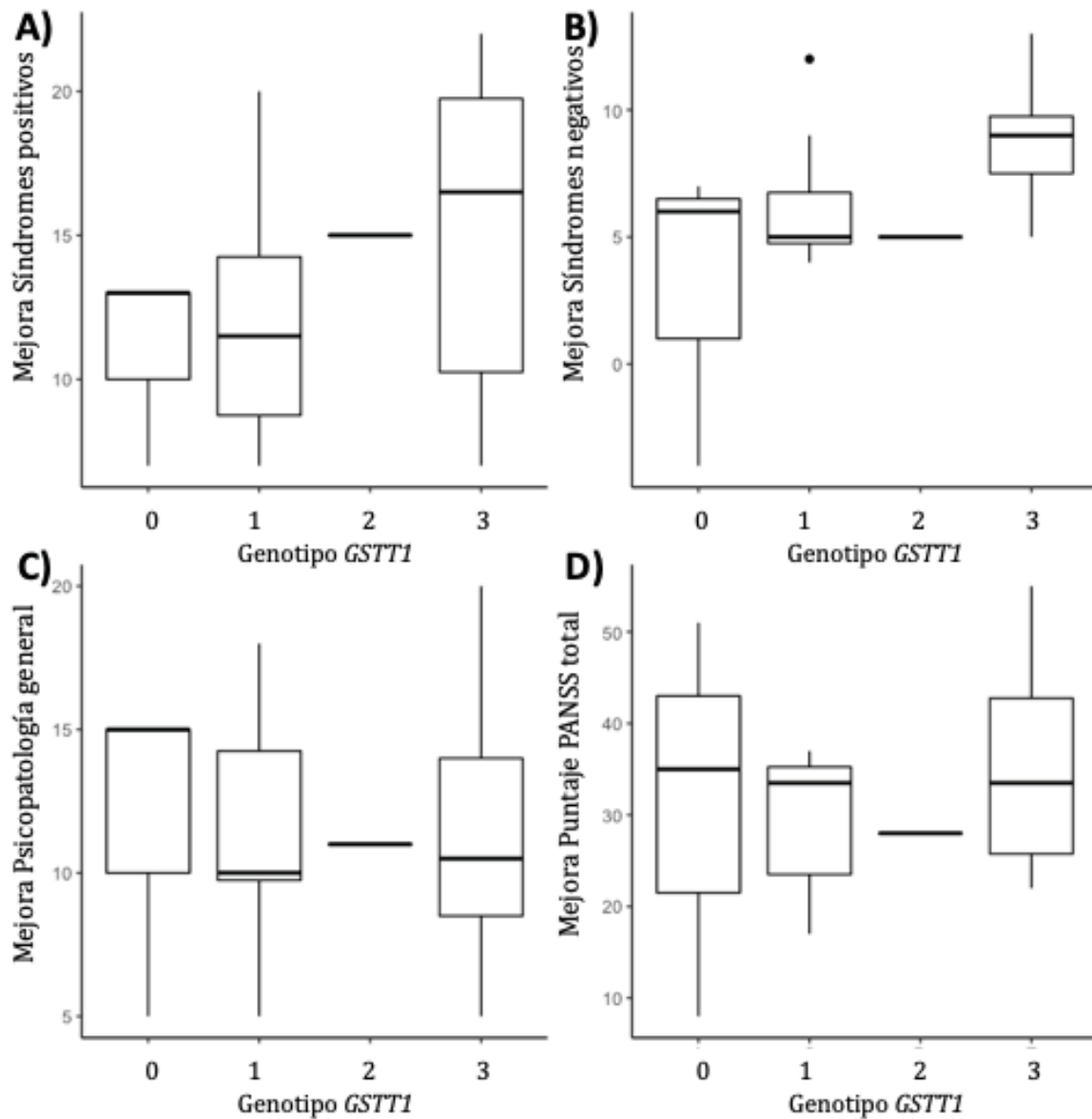


Figura 21. Relación entre genotipo de *GSTT1* y la mejora en la escala PANSS a la semana 18 de tratamiento. A) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.56$). B) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.16$). C) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.99$). D) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala PANSS ($p= 0.84$).

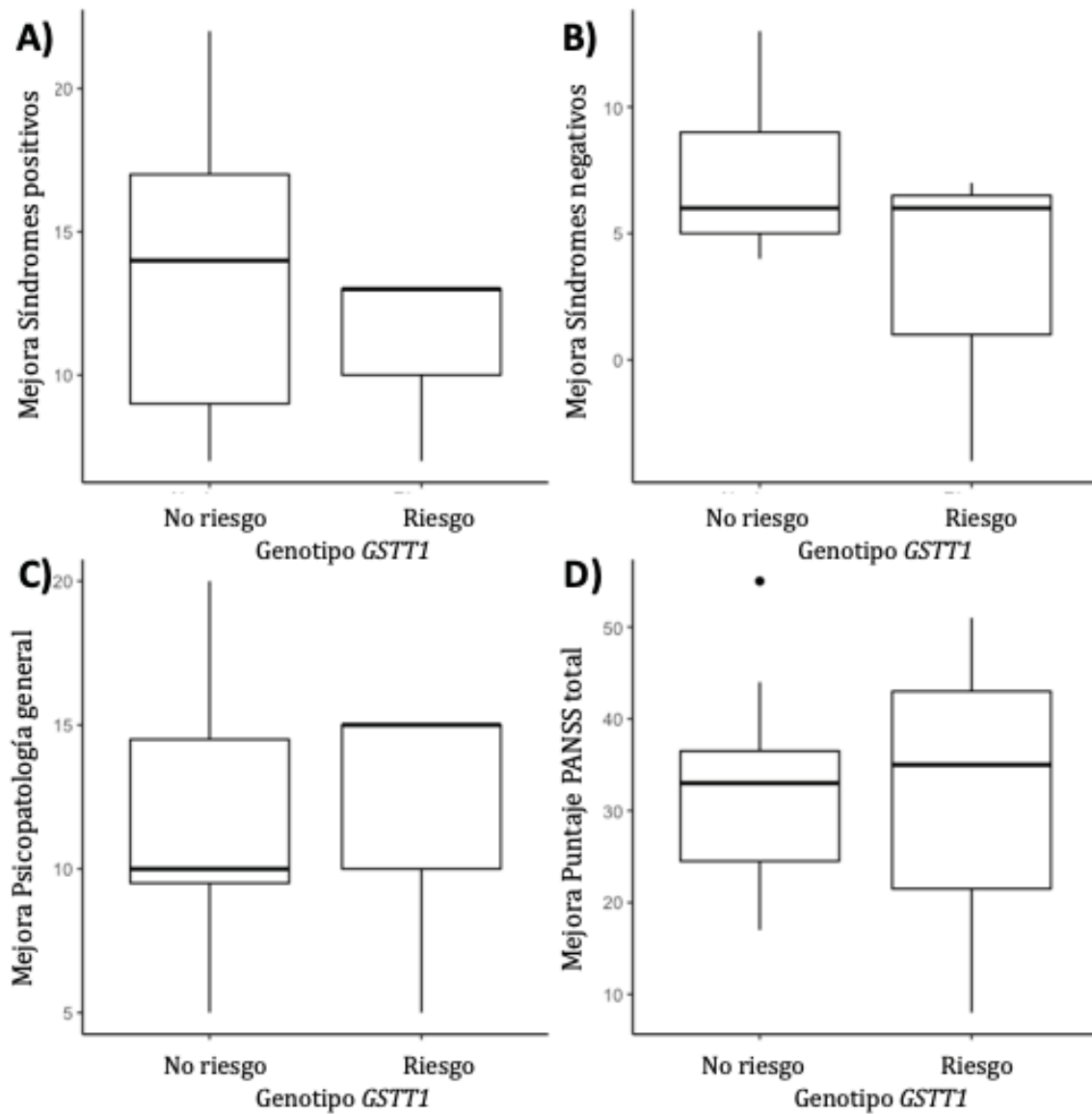


Figura 22. Relación entre genotipo de riesgo de *GSTT1* y la mejora en la escala PANSS a la semana 18 de tratamiento. A) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.44$). B) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.07$). C) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.93$). D) Relación entre el genotipo de *GSTT1* con la mejora en la escala PANSS ($p= 0.94$).

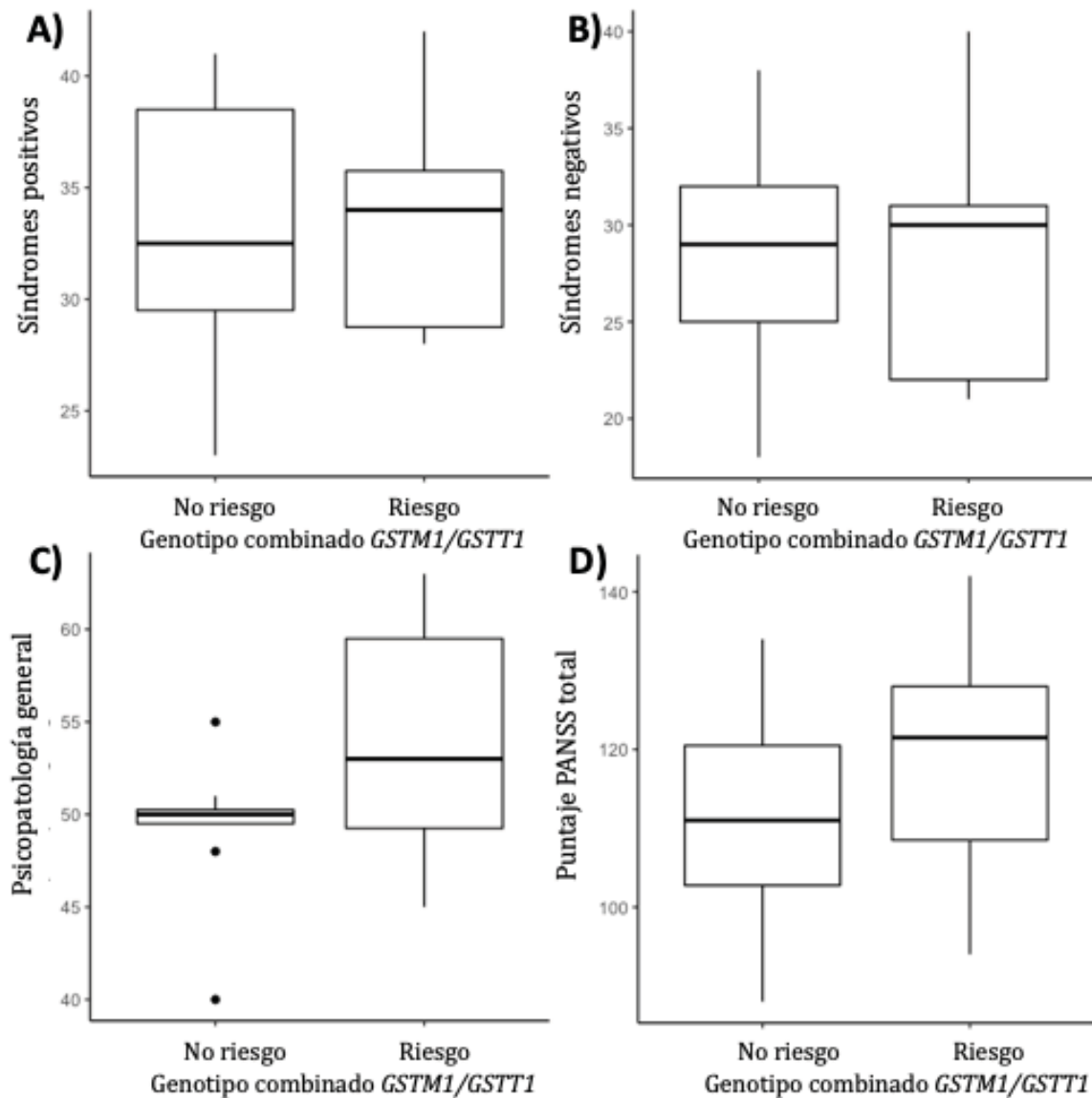


Figura 23. Relación entre genotipo combinados de riesgo de *GSTM1/GSTT1* y la escala PANSS. A) Relación entre el genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.95$). B) Relación entre genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p= 0.87$). C) Relación entre genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la escala de psicopatología general de la escala PANSS ($p= 0.12$). D) Relación entre genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la escala PANSS ($p= 0.40$).

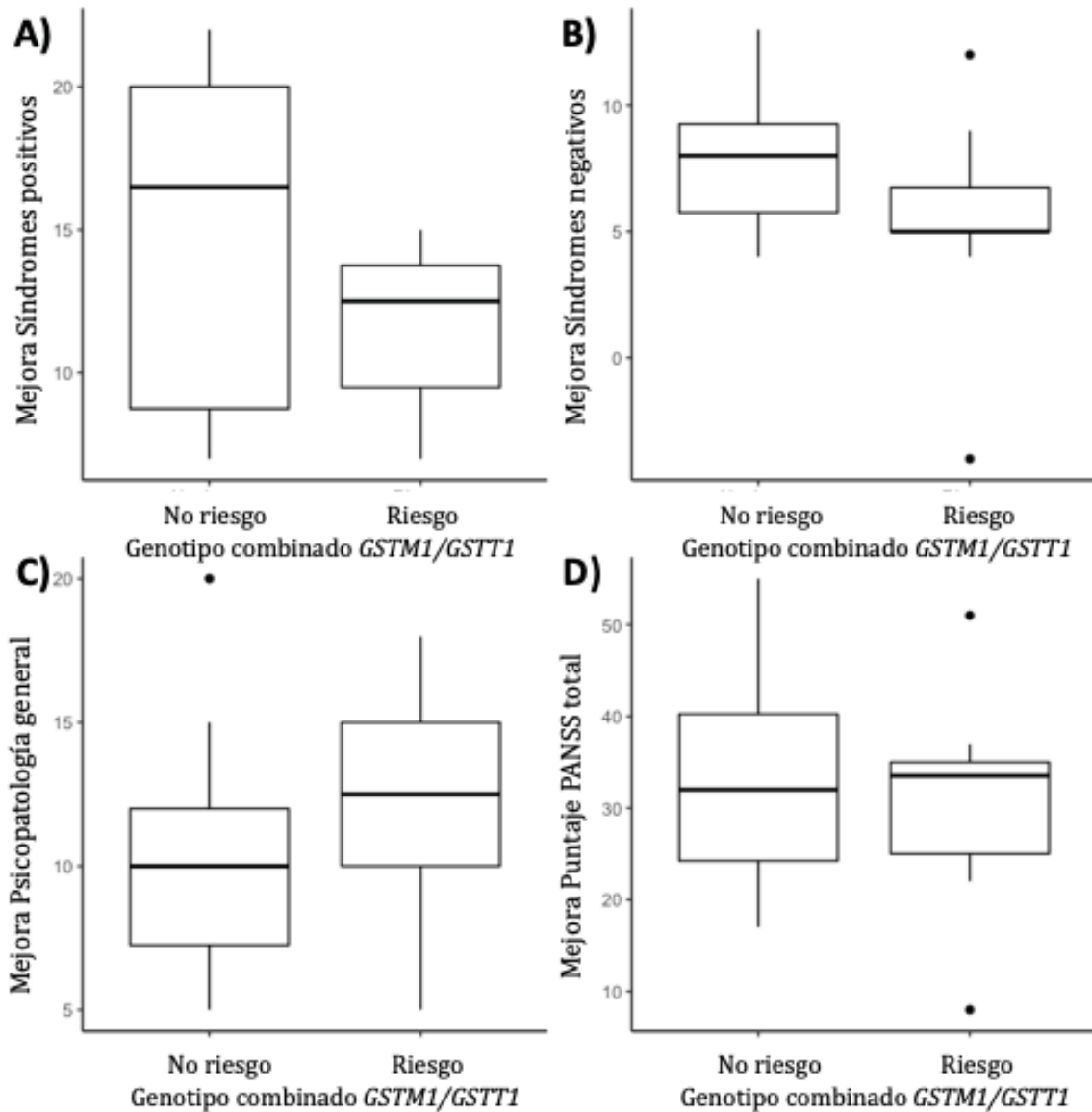


Figura 24. Relación entre genotipo combinados de riesgo de *GSTM1/GSTT1* y la mejora en la escala PANSS a la semana 18 de tratamiento. A) Relación entre el genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la mejora en la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p=0.16$). B) Relación entre genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la mejora en la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p=0.17$). C) Relación entre genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la mejora en la escala de psicopatología general de la escala PANSS ($p=0.43$). D) Relación entre genotipo combinado de *GSTM1/GSTT1* con la mejora en la escala PANSS ($p=0.66$).

8.4 Resultados de repetidos GAG en *GCLC*

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias encontradas de los genotipos para la variante de repetidos GAG en *GCLC* (Tabla 18), lo mismo sucedió al agrupar a los genotipos como de riesgo (genotipos 7/8, 8/8, 8/9, 9/9 y 9/10) y no riesgo (Tabla 19), obteniendo mismas frecuencias en ambos grupos.

Tabla 18. Frecuencias de genotipos de repetidos CAG en *GCLC* en grupo control y grupo de pacientes.

Genotipo CGCL	Pacientes	n	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
7/7	9	42	0.21	11	42	0.26	0.80	0.77
7/8	2	42	0.05	1	42	0.02	1.00	2.03
7/9	22	42	0.52	20	42	0.48	0.83	1.20
8/9	2	42	0.05	0	42	0.00	0.49	-
9/9	6	42	0.14	10	42	0.24	0.40	0.54
9/10	1	42	0.02	0	42	0.00	1.00	-

$\chi^2 = 4.62$, $p = 0.46$.

Tabla 19. Frecuencias de genotipos de riesgo de repetidos GAG de *GCLC* en grupo control y grupo de pacientes.

Genotipo CGCL	Pacientes	n	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	OR
Riesgo	11	42	0.26	11	42	0.26	1	1
No riesgo	31	42	0.74	31	42	0.74	1	1

En cuanto al análisis multivariado, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con relación al genotipo 9/10 de esta variante y los niveles de GSH en plasma (Tabla 20), al ser el estimador de signo negativo, sugiere que la presencia de este genotipo se asocia con menores niveles de GSH.

Tabla 20. Análisis multivariado de genotipos de repetidos GAG en *GCLC* y niveles de GSH en plasma.

Genotipo	Estimador	p
7/7	0.31	0.30
7/9	0.26	0.28
9/10	-1.71	0.01*
9/9	0.53	0.14
8/9	-0.31	0.52
7/8	0.85	0.12

* valor de $p < 0.05$.

8.5 Resultados de la variante c.313A>G (NM_000852.3, rs1695, p.Ile105Val) de *GSTP1*

En la Tabla 21 se aprecia que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles, sin embargo, se puede apreciar una mayor incidencia (OR=2.67) del genotipo A/A en pacientes.

Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante c.313A>G de *GSTP1* en grupo control y grupo de pacientes.

Genotipo	Pacientes			Controles			p	OR
<i>GSTP1</i>	n	Frecuencia	n	Frecuencia	n	Frecuencia		
A/A	15	46	0.33	7	46	0.15	0.08	2.67
A/G	22	46	0.48	26	46	0.56	0.52	0.71
G/G	9	46	0.20	13	46	0.28	0.46	0.62
Alelo	Pacientes	n	Frecuencia	Controles	n	Frecuencia	p	
A	52	92	0.43	40	92	0.43	0.10	1.68
G	40	92	0.56	52	92	0.56	0.10	0.59

Frecuencias genotípicas $\chi^2 = 3.96$, $p = 0.13$.

En la Figura 25 se aprecia que en genotipos G/G se asocian con mayor puntaje en la escala PANSS y sus subescalas, a excepción del apartado C para la subescala de

psicopatología general, a pesar de no tenerse resultados estadísticamente significativos, esta tendencia es apreciable, lo mismo sucede al agrupar los genotipos de riesgo (Figura 26).

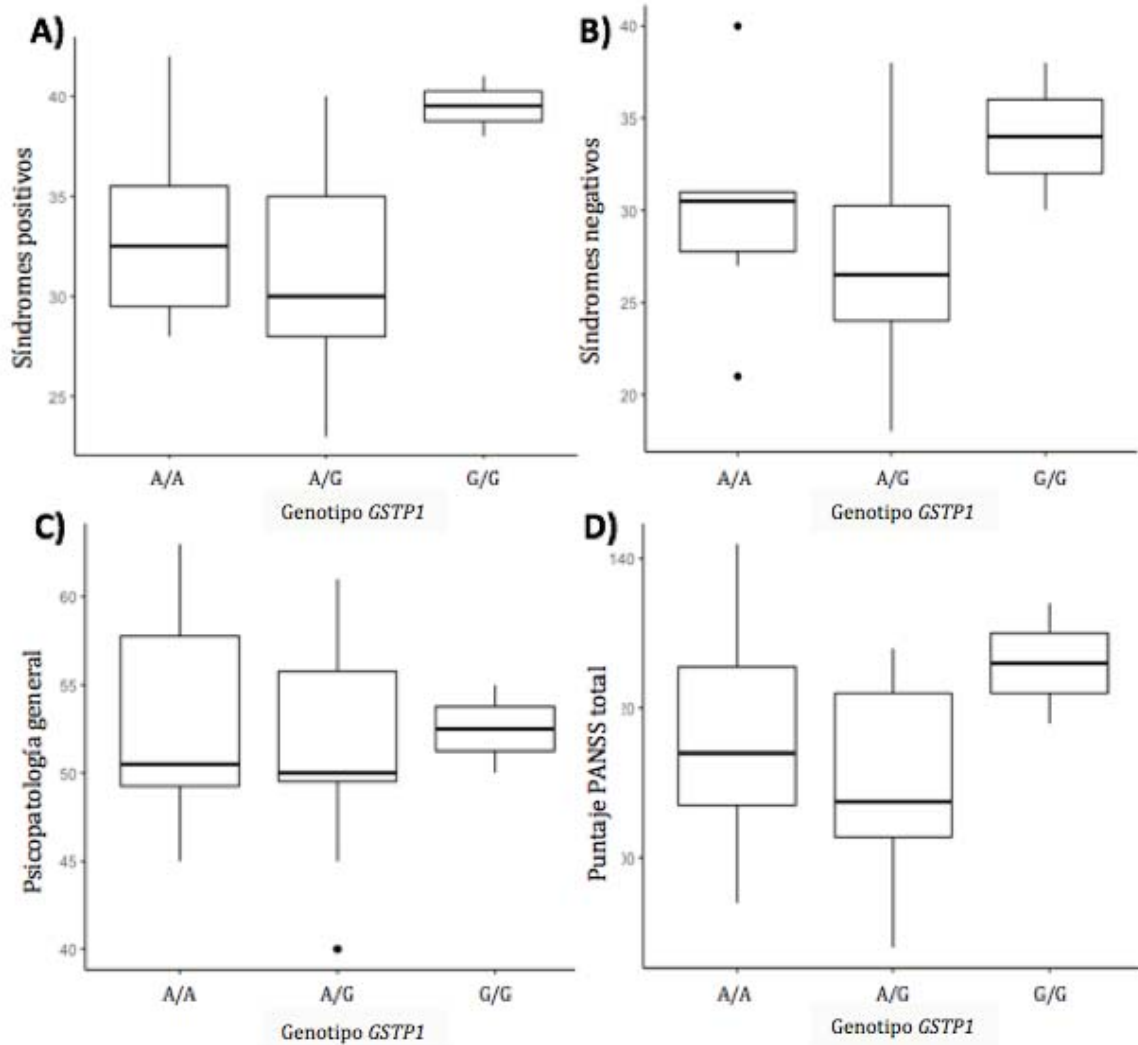


Figura 25. Relación entre la escala PANSS y el genotipo de la variante c.313A>G de *GSTP1*. A) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y el puntaje de la escala de síndromes positivos de la escala PANSS ($p= 0.11$). B) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y el puntaje de la escala de síndromes negativos de la escala PANSS ($p=0.30$). C) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y el puntaje de la escala de psicopatología de la escala PANSS ($p= 0.88$). D) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y puntaje total de escala PANSS ($p= 0.32$).

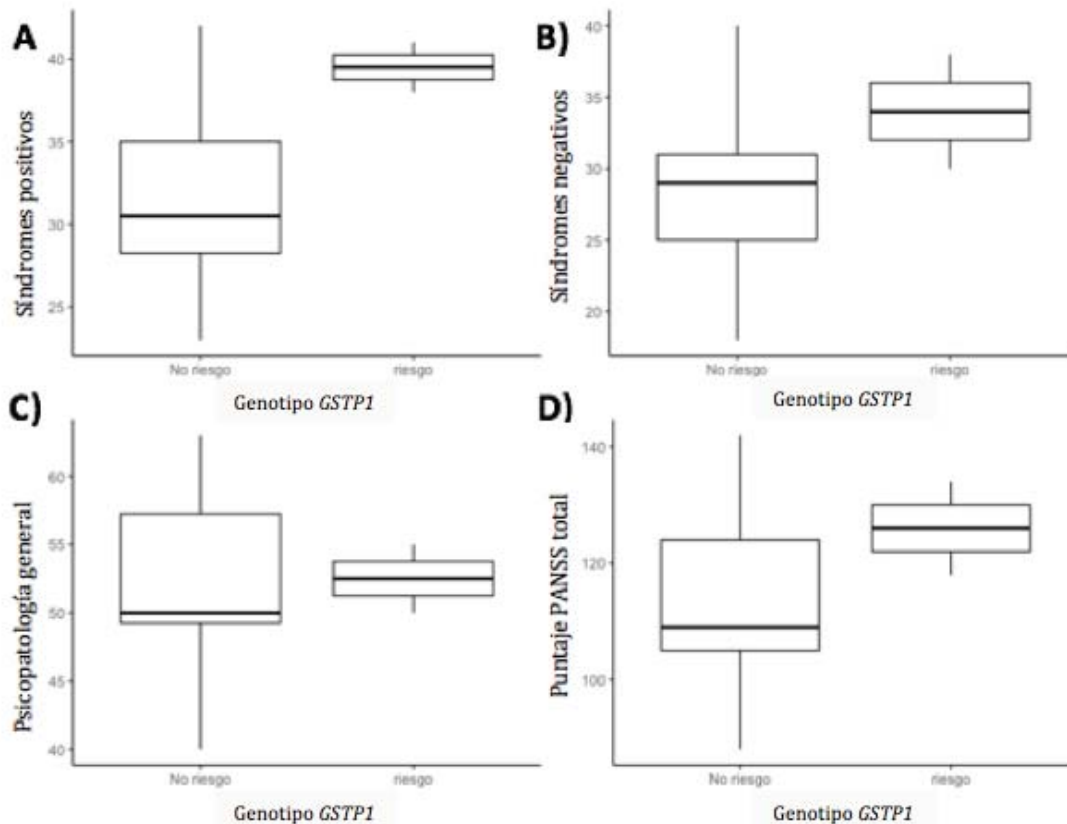


Figura 26. Relación entre la escala PANSS y los genotipos de riesgo de la variante c.313A>G de *GSTP1* A) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y puntaje total de escala PANSS ($p= 0.21$). B) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y el puntaje de la escala de síntomas positivos de la escala PANSS ($p= 0.05$). C) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y el puntaje de la escala de síntomas negativos de la escala PANSS ($p= 0.20$). D) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y el puntaje de la escala de psicopatología de la escala PANSS ($p= 0.91$).

En la Figura 27 se obtiene una tendencia a incrementar el número de RAM totales, neurológicas y generales en presencia del alelo G, a su vez se obtuvo un resultado estadísticamente significativo entre el genotipo A/A y A/G y la incidencia de RAM generales.

Al agrupar los genotipos de riesgo (G/G) y no riesgo (A/A y A/G) se sigue manteniendo la misma tendencia que en los genotipos no agrupados, es decir, en presencia de genotipo de riesgo, se tiene una mayor incidencia de RAM, aunque no se hayan obtenido resultados estadísticamente significativos, se puede apreciar esta tendencia (Figura 28).

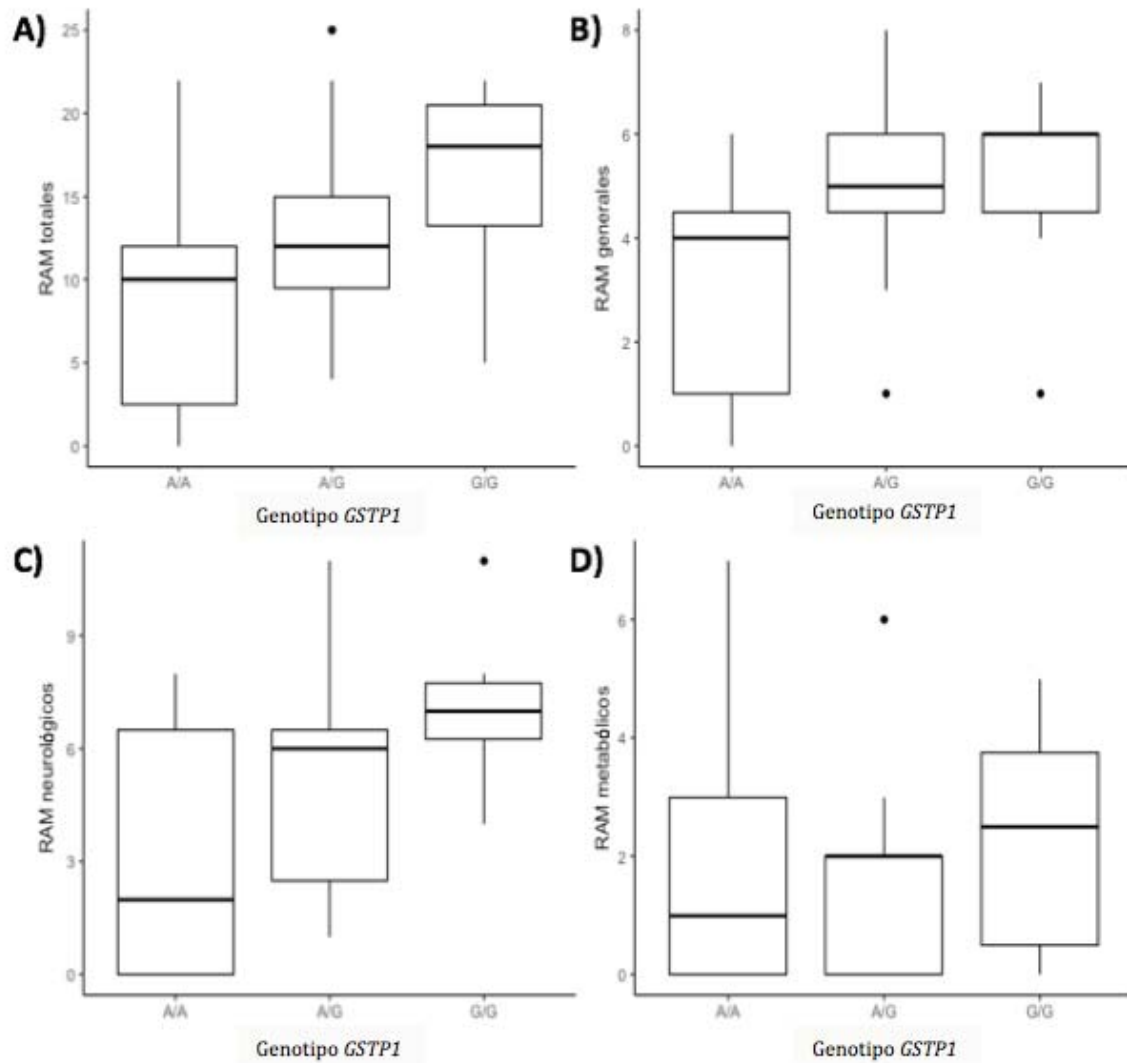


Figura 27. Relación entre RAM y el genotipo de la variante c.313A>G de *GSTP1*. A) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y la presencia de RAM totales ($p= 0.11$). B) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y la presencia de RAM “generales” (A/A - A/G $p=0.03^*$). C) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y la presencia de RAM neurológicas ($p= 0.20$). D) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y la presencia de RAM metabólicas ($p= 0.26$).

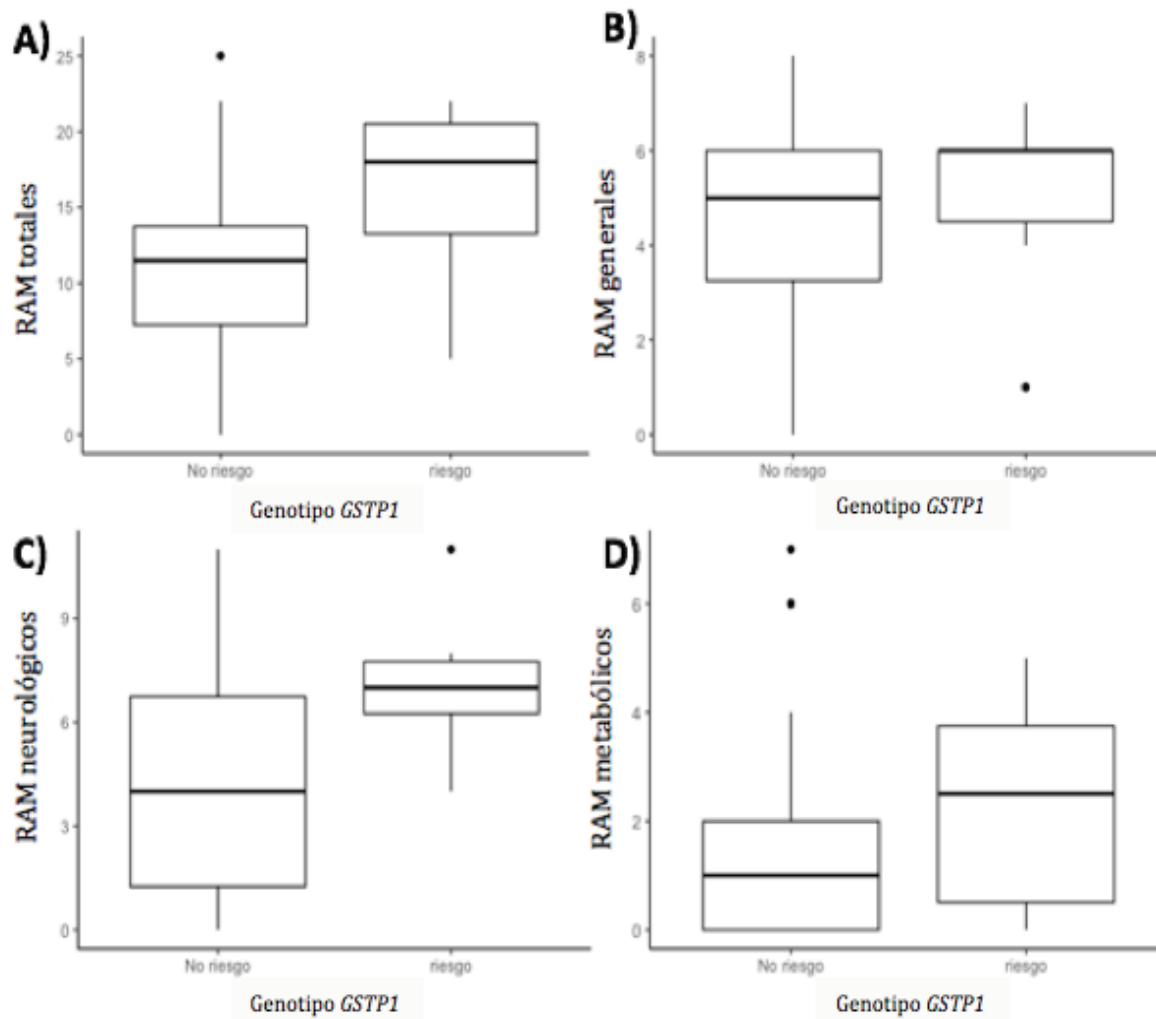


Figura 28. Relación entre RAM y genotipos de riesgo de la variante c.313A>G de *GSTP1*. A) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y la presencia de RAM totales ($p= 0.12$). B) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y RAM “generales” ($p= 0.27$). C) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y RAM neurológicas ($p= 0.55$). D) Relación entre genotipos de la variante c.313A>G de *GSTP1* y RAM metabólicas ($p= 0.37$).

9 Discusión

A pesar de que los TP representan un importante problema a la salud pública, no se cuenta con marcadores biológicos que apoyen el diagnóstico clínico de los TP. Al tratarse de enfermedades multifactoriales, es importante conocer los factores de riesgo para el desarrollo de estos trastornos, factores que en la actualidad no se han dilucidado en su totalidad debido a que se tienen resultados contradictorios en diferentes estudios.

En este trabajo se realizó un análisis multivariado con las características sociodemográficas de los pacientes (Tabla 13) y no se encontraron resultados estadísticamente significativos, lo que descarta a la información aquí descrita como un factor importante para el desarrollo de TP.

Por otro lado, sería conveniente realizar un trabajo donde la selección de controles sea pareada con hábito de consumo de tabaco, alcohol y drogas, pues gran parte de la población estudiada presenta un consumo importante de estas sustancias y estas suelen ser factores importantes en este tipo de estudios pues muchas de estas están implicadas directamente con el metabolismo de CLZ, especialmente el tabaco, pues se tiene evidencia que este disminuye las concentraciones plasmáticas de este fármaco teniendo un impacto directo en la respuesta al tratamiento (Šagud, et al. 2018). Se tiene bien estudiado que el abuso de algunas sustancias puede conducir a desarrollo de psicosis, generando duda si el estado psicótico es debido al TP o por el mismo abuso de la droga (APA 2014), esto no se puede comprobar con este estudio debido a que la población control no tiene los mismos hábitos de consumo de drogas que el grupo de pacientes .

En promedio, la población sufre de sobrepeso, cercano a la obesidad (Tabla 13), por lo que los procesos metabólicos se ven alterados y se esperaría que la presencia de RAM estuviera asociado al IMC (Raedler 2010), sin embargo, el análisis multivariado no mostró una asociación significativa, a pesar de ello debe de considerarse para las asociaciones de GSH y variantes genéticas estudiadas en este estudio pues el grupo

control no está pareado por IMC y no se conoce el IMC previo al tratamiento con CLZ de los pacientes.

Al inicio de la terapia con CLZ el psiquiatra comienza la dosificación del fármaco a dosis inferiores de la DE por cuestiones de seguridad del paciente; según su requerimiento y su respuesta a CLZ, la dosis se va incrementando. Los resultados obtenidos (Figura 12) indican que la gravedad del cuadro clínico inicial (escala PANSS previo al tratamiento) puede predecir la dosificación adecuada de CLZ, siendo que, a mayor gravedad, mayor será la dosis requerida para llegar a un efecto terapéutico, contradictorio a lo que se ha encontrado en otros estudios donde no se encuentran asociación alguna (Subramanian, Völlm y Huband 2017). Esto puede otorgar al psiquiatra un panorama de cómo será la evolución del trastorno del paciente ante el tratamiento, así como el dar a conocer esto al paciente para evitar desapego al tratamiento por no llegar al efecto terapeutico al inicio de este

Después de 18 semanas de tratamiento, todos los pacientes presentaron una disminución en la escala PANSS, lo que se considera como respuesta al tratamiento farmacológico y mejora en el cuadro clínico. Esta mejora no es dependiente de la dosis (Figura 13) pues a pesar de presentar una mejora en todos los pacientes como se ha reportado en algunos estudios (Subramanian, Völlm y Huband 2017), se tiene una mayor mejora en el cuadro clínico en pacientes a DE o a dosis inferiores a la DE, siendo los pacientes administrados con una mayor dosis los que tienen una menor mejora.

Las RA presentes no fueron dependientes de la dosis de CLZ (Figura 14) y otros procesos podrían ser determinantes para su aparición, si bien Subramanian, et al. (2017) encontraron algunas asociaciones de que a dosis inferiores a la DE se tiene una menor incidencia de algunas RA, especialmente el aumento de peso, en este estudio no se encontró dicha asociación. Debe considerarse que el número de pacientes que tiene una dosificación de CLZ mayor a DE no es representativo, además de que los pacientes pueden atribuir el aumento de peso a cambios en estilo de vida y no al consumo de CLZ.

Con relación a la mejora en el cuadro clínico de los pacientes y para la evaluación de RA en función de la dosis de CLZ es necesaria la cuantificación de los niveles de CLZ y sus metabolitos en plasma, no se pueden hacer conclusiones basadas únicamente en la dosis administrada, sin embargo, esto aporta un panorama general de la respuesta.

En cuanto a los niveles de GSH, este trabajo se confirmó que los niveles de esta molécula en pacientes son significativamente menores que en controles (Figura 15), lo que confirma que la regulación de GSH está involucrada en la fisiopatología de los TP al igual que en estudios previos y en diferentes poblaciones en pacientes con ESQ y TB, así como en modelos animales (Nucifora, et al., 2017; Johnson, et al., 2013; Wood, et al., 2009).

Con este estudio se confirmaría ese hallazgo en la población estudiada y se podría incluir al TE dentro de los trastornos que presentan niveles bajos de GSH debido a que no se tienen estudios reportados para este trastorno, además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de GSH entre los diferentes TP estudiados.

Si bien los TP tienen diferencias clínicas marcadas, como se explica en la sección 2.2 de este trabajo, se podría asumir que los niveles disminuidos de GSH se puede deber al punto de convergencia entre estas tres afecciones, que es la psicosis (Nucifora, et al. 2017). Para validar esta hipótesis deben documentarse el número de episodios psicóticos y así buscar una correlación con niveles plasmáticos de GSH como en otros reportes (Micó, et al. 2011).

Es importante mencionar que el GSH no es la única defensa antioxidante que tiene el cuerpo, por lo que sería apropiado estudiar otros factores que puedan llegar a ser determinantes en la misma vía o en otras vías, por ejemplo, se han reportado estudios en donde el antiportador de glutamato-cistina (xCT) está relacionado con la fisiopatología de ESQ, pues este se encarga de importar cistina y exporta glutamato en una proporción de 1: 1, la cistina intracelular se reduce fácilmente a cisteína, que es el precursor limitante de la síntesis de GSH (Fournier, et al. 2017).

Por otra parte, se realizó un análisis estadístico con los años de evolución de la enfermedad (Figura 16) para evaluar si las defensas antioxidantes que otorga el GSH disminuyen en función del deterioro provocado por la misma enfermedad en los pacientes. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los años de evolución de la enfermedad y los niveles de GSH. A su vez, se evaluó la gravedad del cuadro clínico, llegando a la conclusión de que los niveles de GSH no son un marcador de gravedad de la enfermedad ni de deterioro por parte de esta en la población estudiada. Probablemente, como se ha observado en otros estudios, los niveles bajos de GSH son independientes de la etapa de la enfermedad, pero sí por el desarrollo de esta (Do et al., 2000; Micó et al., 2011; Raffa et al., 2011).

Los fármacos figuran como factores de riesgo para la disminución de GSH (Micheli, et al. 1992), a pesar de esto, los niveles de GSH no están relacionados con la dosis de CLZ administrada (Figura 17) como se ha encontrado en otros estudios publicados (Raffa, et al., 2011; Do, et al., 2000). Se debe de considerar que la gran mayoría de los pacientes se encuentran en politerapia (Tabla 13), incluyendo antidepresivos, ansiolíticos, anticolinérgicos, anticonvulsivos, entre otros, para tratar las manifestaciones y comorbilidades de cada paciente (hiperlipidemia, diabetes mellitus, epilepsia), por lo que la baja en niveles de GSH puede ser debido al uso de otro medicamento (que no sea CLZ), a alguna interacción entre estos., o bien, al trastorno en sí como ya se ha comentado previamente.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de GSH y la aparición de RAM (a excepción de las RAM generales, $p > 0.05$), donde menores niveles de GSH se asociaron con mayor número de RAM neurológicas y metabólicas (Tabla 15), esto puede explicarse por la participación que tiene el GSH en la inactivación de metabolitos activos como es el caso del ión nitrenio (Dragovic, Boerma, et al. 2010) previniendo la aparición de RAM, y en el caso de su deficiencia, se tendría una mayor incidencia de estas. Sin embargo, este proceso de inactivación de metabolitos activos no solo está determinado por las concentraciones de GSH, sino también por la actividad

de las GST (Dragovic, Boerma, et al. 2010) que más adelante se discutirá desde una perspectiva genética.

Se debe de considerar que los niveles de GSH son modulados por diversos factores como fármacos (Micheli, et al. 1992), consumo de tabaco (Gould, et al. 2015), alcohol (Vogt y Richie 2007) dieta (Sekhar, et al. 2011), entre otros. Como ya se mencionó, la mayoría de los pacientes se encuentran en politerapia, a su vez, la mayoría de los pacientes son fumadores y gran porcentaje de estos consume alcohol y distintas drogas (Tabla 13), si bien, no se encontraron resultados relevantes entre estos datos y los niveles de GSH en el análisis estadístico, la suma de todos estos factores podría tener un impacto en la disminución de GSH plasmático (Gysin, Kraftsik y Sandell, y otros 2007).

Por otro lado, sería conveniente estudiar el impacto en la aparición de RAM de otros marcadores de estrés oxidativo como es el caso del malondialdehído (MDA), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), GPx, peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, entre otros, para comprender mejor este fenómeno (Tunçel, et al. 2015). Se tienen fuertes evidencias que MDA se encuentra relacionado con la aparición de RAM metabólicas, especialmente la obesidad, y con la puntuación de la puntuación de psicopatología general de la escala PANSS como indicador de gravedad clínica (An, et al. 2018) así como con una asociación con el primer episodio psicótico (Sarandol, et al. 2015).

Al respecto, existe un estudio clínico piloto que aún no publica resultados donde se está utilizando N-acetilcisteína, precursor de GSH, como coadyuvante de CLZ en pacientes con ESQ refractaria a este fármaco (Rossell, et al. 2016). Será importante seguir los resultados de este trabajo. Este mismo grupo de investigadores publicó una revisión teórica donde se asocia el consumo de este suplemento con una mejora en el funcionamiento cognitivo de pacientes con ESQ (Yolland, et al. 2018).

Se tienen muchas inconsistencias en la literatura en cuanto a las CNV de *GSTM* y *GSTT*, pues algunos autores han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre

pacientes y controles en cuanto a los genotipos nulos, teniendo mayor incidencia en los pacientes (Pinheiro, et al., 2017; Cătană, et al., 2013), otros en los cuales obtienen resultados que indican la compensación de deleciones homocigotas con duplicaciones en otra GST (Bhattacharjee, et al. 2013), o bien, que sólo alguna GST esté involucrada en la patogénesis de los TP (Kim, et al. 2015).

En el caso de los resultados obtenidos en este trabajo, a pesar de que no se encontraron resultados estadísticamente significativos, observamos que los genotipos nulos de *GSTT1* son más frecuentes en pacientes que en controles (OR= 2.76; Tabla 16) y una mayor incidencia de genotipos de riesgo en el grupo de pacientes en el caso de *GSTT1* (OR=2.76; Tabla 17), estos resultados dan un panorama general donde genotipos de riesgo de *GSTT1* es factor de riesgo para el desarrollo de TP. Como el oxígeno de las células cerebrales es muy alto, esto puede llevar a la generación de niveles incrementados de especies reactivas de oxígeno en el cerebro, exponiendo las neuronas al estrés oxidativo (Boskovic, et al. 2011), sumado a los estudios que evidencian la presencia de estrés oxidativo en pacientes con ESQ ,incluido este trabajo, tema que se ha comentado previamente, una deficiencia en las defensas antioxidantes como el que se está observando con estos resultados involucra un riesgo del desarrollo de TP (Pinheiro, et al. 2017).

Actualmente no existen estudios en población mexicana que determinen los diferentes genotipos de la CNV de GST estudiada, sin embargo, existen unos pocos que presentan las frecuencias de los genotipos nulos tanto para *GSTM1* como para *GSTT1*. Tal es el caso del realizado por Montero, et al., 2007, quienes determinaron la frecuencia de estos genotipos en 150 individuos sanos, obteniendo que el genotipo nulo de *GSTM1* tiene una frecuencia del 45% y el de *GSTT1* de 9.7%, a la par, Palma-Cano, et al., 2017 y Pérez-Morales, et al., 2008 obtuvieron resultados similares, ambos estudios realizados en población mexicana. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en frecuencias de genotipos nulos encontradas en este estudio, con los reportes previos, lo que podría indicar que las frecuencias encontradas son representativas de la población mexicana.

Las frecuencias obtenidas de genotipos nulos para *GSTM1* (Tabla 16) son similares ($p=0.46$) a las frecuencias obtenidas en población africana (Dandara, et al. 2002) debido a que encontraron que el 33% de población sana presenta una delección homocigota para este gen. En contraste, las frecuencias de genotipos nulos para *GSTT1* encontrados son significativamente inferiores ($p=0.02^*$), debido a que en población africana (Dandara, et al. 2002) se encontró que un 25% de la población sana presenta este genotipo.

Comparando los genotipos nulos obtenidos (Tabla 16) con población japonesa (Nissar, et al. 2016) se obtuvo que la muestra estudiada presenta una mayor frecuencia (0.01^*) en genotipos nulos en *GSTM1* debido a que se tiene que un aproximado de 18.5% de la población japonesa presenta esta delección. En cuanto al gen *GSTT1*, la muestra estudiada presenta una menor frecuencia ($p=0.02^*$) para los genotipos nulos, debido a 22.5% de la población japonesa presenta una delección homocigota para este gen.

Los pacientes que presentan el genotipo de riesgo de *GSTT1* presentan significativamente un mayor puntaje en la escala PANSS inicial, lo que indica una mayor gravedad del cuadro clínico previo al tratamiento con CLZ (Fig. 19). Este fenómeno podría explicarse debido a que las GST se encargan de la desintoxicación del organismo de xenobióticos electrófilos y compuestos endógenos (Armstrong 1991), por lo que, al presentar un genotipo nulo homocigoto (ausencia del transcrito y del producto proteico), hay una pérdida de función (Strange y Fryer 2000). En otras palabras, se tiene una deficiencia en esta desintoxicación lo que favorece el estrés oxidativo, mismo que se ha involucrado en la fisiopatología de los TP (Bitanhirwe y Woo 2011). Es importante remarcar que esta relación con la escala PANSS no se encontró para los genotipos nulos de *GSTM1*. Para los genotipos combinados de ambas GST no se encontraron resultados estadísticamente significativos, pero se obtuvo una tendencia tanto para la subescala de psicopatología general y la escala PANSS.

Las tendencias observadas del genotipo y la mejora en la escala PANSS sugieren que tanto para los síndromes positivos y psicopatología general (Figura 18) hay una mayor mejora a mayor número de alelos de *GSTM1*, pasa algo similar en la Figura 21 entre el

gen *GSTT1* y la mejora en síndromes positivos y negativos, que indica que las duplicaciones en *GSTT1*, *GSTM1* o en ambos genes se relacionan con una protección como se reporta en la bibliografía (Bhattacharjee, et al. 2013), esto al tener una mayor expresión se tiene una desintoxicación del organismo más eficiente, pudiendo así lograr el efecto terapéutico deseado debido al tratamiento con CLZ. Para comprobar esta hipótesis sería conveniente realizar un ensayo de medición de actividad de GST como se ha realizado en otros estudios (Jordan, et al. 2018) y evaluar las actividades en función a los genotipos obtenidos.

En cuanto a los genotipos agrupados como de riesgo, identificamos una mayor mejora clínica en los pacientes que no tienen los genotipos de riesgo de *GSTM1* para los síndromes positivos principalmente (Figura 19) y de *GSTT1* para los síndromes negativos (Figura 22), esto puede deberse a la misma protección antioxidante que ofrecen las GST, desintoxicar más eficientemente el organismo permite la mejora debido al tratamiento, a la vez que previene el surgimiento de RAM y efectos tóxicos debido a la eliminación de CLZ y sus metabolitos (Dragovic, Boerma, et al. 2010). Además, en la Figura 24, en donde se tienen los genotipos combinados de ambas GST (*GSTT1* y *GSTM1*), a pesar de no tener diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, la tendencia encontrada en la mejora en los síndromes negativos sugiere una relación entre la mejora clínica ante CLZ y las CNV estudiadas en GST, sin embargo, se encontraron resultados contradictorios para la mejora en la psicopatología general, por lo que sería importante replicar estos resultados en una muestra de más pacientes.

En contraste a la hipótesis planteada, no se encontró ninguna relación o tendencia entre las CNV de estas dos GST con las RAM presentadas por los pacientes, esto se puede deber a la eficiencia de la actividad enzimática de cada GST, es decir, a pesar de tener una duplicación en el gen, la actividad de la enzima sea semejante a la actividad de aquella con genotipo silvestre, que sería contrario a lo que se ha encontrado en otros estudios que relacionan genotipo con actividad de GST (Karam, et al. 2012); o bien, que exista un efecto compensatorio por alguna otra GST u otra vía de desintoxicación, debido a que no es la única vía involucrada (Figura 3).

A pesar de no presentar una relación con la presencia de RAM, estas se encuentran presentes en todos los pacientes. Se debe considerar que el papel desintoxicante de las GST va de la mano con el GSH (Dragovic, Boerma, et al. 2010), que en caso de todos los pacientes se encuentra disminuido presentando un estrés oxidativo en todos los pacientes.

Cabe destacar que se evaluó la dependencia de los genotipos para ambas GST con la dosis administrada de CLZ necesaria para obtener el efecto terapéutico deseado y no se obtuvieron resultados concluyentes, lo mismo sucedió con la relación con niveles de GSH en plasma.

No se encontraron diferencias significativas para la variante estudiada del gen *GCLC* (Tabla 18), lo que implica que el número de repetidos de GAG de *GCLC* no es una variante de riesgo para desarrollo de TP en la muestra estudiada. A pesar de esto se agruparon los genotipos como de riesgo y de no riesgo según estudios previos (Gysin, Kraftsik y Boulat, y otros 2011) y como se describe en la sección 1.6 de este trabajo, se obtuvieron las frecuencias genotípicas reportadas en la Tabla 19, que resultaron ser iguales entre pacientes y controles, por lo que aparentemente no es un factor de riesgo para desarrollo de estos trastornos en la muestra estudiada.

Actualmente no se tienen frecuencias de esta variante de *GCLC* de población mexicana reportadas. Se encontraron frecuencias significativamente menores del genotipo de riesgo 7/8 (Tabla 18) en contraste con población estadounidense (Nichenametla, et al. 2013), debido a que la frecuencia de este genotipo en dicha población es del 14.7% ($p=0.02^*$).

Se encontró un resultado estadísticamente significativo en el cual se relaciona niveles más bajos de GSH en plasma corresponden con el genotipo 9/10 (Tabla 20), que es un genotipo de riesgo, sin embargo, como se ha comentado previamente, se debe de ampliar el tamaño de la población estudiada, pues la frecuencia de incidencia de este genotipo es muy pequeña y no es una muestra representativa.

Debido a que la enzima GCL es la enzima limitante en la biosíntesis del GSH (Shelly 2013), al presentar genotipos de riesgo de la variante en cuestión, se esperaría el tener niveles disminuidos de GSH en plasma, hipótesis fundamentada en estudios previos que confirman este supuesto (Walsh, Feulner y Reilly 2001).

Se encontró un resultado estadísticamente significativo en el cual se relaciona niveles más bajos de GSH en plasma corresponden con el genotipo 9/10 (Tabla 20), que es un genotipo de riesgo, comprobando la hipótesis mencionada, sin embargo, como se ha comentado previamente, se debe de ampliar el tamaño de la población estudiada, pues la frecuencia de incidencia de este genotipo es muy pequeña y no es una muestra representativa.

Además, se han publicado trabajos que relacionan esta variante con la sensibilidad a fármacos en múltiples líneas celulares (Walsh, Feulner y Reilly 2001), sin embargo, no se encontraron resultados concluyentes en cuanto a la dosis de CLZ necesaria para obtener un efecto terapéutico, en la gravedad de la enfermedad antes y después del tratamiento con CLZ ni con presencia de RA.

Si bien, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para la variante c.313A>G de *GSTP1*, se obtiene que la frecuencia del alelo G, que es el alelo de riesgo (Dragovic et al. 2014), es mayor en el grupo control (Tabla 21), contrario a los resultados esperados, lo mismo sucede con el genotipo G/G, lo que indicaría que este alelo no representa un riesgo de desarrollo de la enfermedad en la población estudiada.

Comparando las frecuencias genotípicas obtenidas con las frecuencias de población mestizo-mexicana publicadas en la base de datos de SNV por el Centro Nacional de Información Biotecnológica de EUA, se obtuvieron frecuencias significativamente menores del genotipo G/G (NCBI 2012), se debe de considerar que para estas frecuencias reportadas se tomó como población mexicana a población con ancestría

mexicana residente de Los Ángeles California, puede que estas diferencias en la etnicidad afecten en las diferencias estadísticas obtenidas. En cuanto a la población mestizo-mexicana con residencia en la República Mexicana, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Coral-Vázquez, et al. 2013). Estas frecuencias no muestran una diferencia estadísticamente significativa con población asiática, africana u europea (NCBI 2012) por lo que esta variante no refleja un riesgo incrementado o disminuido en población mexicana.

A pesar de esto, la gravedad del cuadro antes del tratamiento con CLZ es mayor en pacientes con el genotipo G/G (Figura 25), esta información sumada a lo que se discutió previamente, se podría decir que el alelo G no implica un riesgo de desarrollo de TP, pero sí se podría catalogar como un factor determinante para la gravedad de la enfermedad una vez desarrollada, a su vez, se obtiene la misma tendencia al agrupar los genotipos como genotipos de riesgo y no riesgo (Figura 26).

La presencia del alelo G se asoció con mayor incidencia de RAM (Figura 27), como ya se ha comentado previamente, al igual que los genotipos de riesgo de esta misma variante (Figura 28). Las GST se encargan de desintoxicar el organismo, especialmente la isoforma pi, esta es la isoforma más activa teniendo una tasa de conjugación de 3.7 veces más en comparación al resto de las GST (Dragovic, Boerma, et al. 2010), puede deberse a esto que no se hayan encontrado resultados concluyentes en cuanto a aparición de RAM en el resto de las variantes estudiadas de GST en este trabajo, siendo la variante c.313A>G de *GSTP1* la responsable de la aparición de RAM por disminución en la tasa de desintoxicación del organismo.

Se realizaron análisis estadísticos de la presencia de esta variante y la mejora clínica en el paciente sin llegar a tener resultados concluyentes.

Los resultados reportados en este trabajo son de alta importancia clínica para los pacientes, así como para el campo de genética de poblaciones. Pueden auxiliar con el diagnóstico temprano de los TP así como la respuesta a la medicación con CLZ lo que conlleva a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

10 Conclusiones

La dosificación de CLZ y la gravedad del TP previo al tratamiento con este fármaco, presentan una relación directamente proporcional, lo que puede auxiliar en la elección de dosis inicial del tratamiento. No se encontró una relación de la dosificación de CLZ con la mejora del cuadro clínico ni presencia de RA, lo que indica que estas variantes podrían ser dependientes de otros factores; como procesos metabólicos de cada organismo.

Los niveles de GSH figuran como potencial marcador de riesgo de desarrollo de psicosis debido a que los pacientes presentan una disminución significativa de esta molécula en plasma en comparación con los controles. Una mayor disminución en los niveles de GSH es provocada por el genotipo de riesgo 9/10 en la variante estudiada en *GCLC*. Los pacientes que se encontraron con niveles por debajo de la media del grupo de pacientes serán considerados para someterse a una dieta especial con antioxidantes esperando que con la dieta se restablecen las defensas antioxidantes a niveles normales.

Las frecuencias de genotipos nulos de *GSTM1* y *GSTT1* fueron similares a publicaciones previas de estudios realizados en población mestizo-mexicana. Sin embargo, presentaron una mayor incidencia en contraste con población japonesa en *GSTM1* y una menor incidencia en *GSTT1*. No se encontraron diferencias entre grupo de pacientes y grupo de controles.

Los genotipos de riesgo de *GSTM1* y *GSTT1* figuran como posibles candidatos como marcadores de riesgo para gravedad de la enfermedad (especialmente *GSTT1*) y para menor mejora clínica (evaluada con la escala PANSS) ante el tratamiento con CLZ, tanto como marcadores individuales, como agrupados por genotipo combinado y a su vez, duplicaciones en estos genes generan una mayor mejora tras el tratamiento fungiendo como genotipos de protección antioxidante.

Las frecuencias de la variante repetidos GAG en *GCLC* fueron similares entre pacientes y controles. El genotipo de riesgo 7/8 fue inferior a las frecuencias reportadas en población estadounidense.

Los genotipos de riesgo de repetidos GAG en *GCLC* no presentaron relación con gravedad de la enfermedad, mejora del cuadro clínico ni presencia de RA debidas a CLZ.

Las frecuencias obtenidas de la variante c.313A>G de *GSTP1* fueron similares en pacientes y controles, no presentaron diferencias con otras publicaciones de población mestizo-mexicana pero sí una menor incidencia del genotipo de riesgo en población mestizo-mexicana que habita en Los Ángeles – EUA.

La variante estudiada de *GSTP1* es la variante genética analizada en este estudio que figura como factor de riesgo para desarrollo de RA debido a CLZ, a su vez, al igual que las CNV estudiadas, es un candidato como factor de riesgo a mayor gravedad de la enfermedad. No presentó relación con la mejora del cuadro clínico.

11 Perspectivas

- Parear el grupo control con el grupo de pacientes tomando en cuenta no solo edad y sexo, sino hábitos de consumo de tabaco, alcohol y drogas, así como IMC. Es deseable conocer el IMC de los pacientes antes y después de la terapia con CLZ para así poder atribuirlo o no al medicamento.
- Ampliar el tamaño de la muestra de estudio para saber si los resultados encontrados en este trabajo se mantienen o cambian, así como buscar resultados estadísticamente significativos.
- Medir CLZ y sus metabolitos en plasma.
- Documentar el número de eventos psicóticos de los pacientes, así como la edad a la que se tuvo el primer evento.
- Realizar un estudio longitudinal.
- Analizar otros marcadores de estrés oxidativo como MDA, SOD, CAT, GPx, peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, entre otros.

12 Bibliografía

- Cătană, IV, RA Popp, VP Ioan, A Cătană, D Rădeanu, A Maniu, y M Cosgarea. 2013. "Comparative analysis of GSTM1/GSTT1 null alleles and Ile105Val GSTP1 variant in patients with Nasal Polyposis and hyposmia in a Romanian population group." *Versita* 21 (24): 189-196.
- Cabungcal, JH, DS Counotte, E Lewis, HA Tejada, P Piantadosi, C Pollock, GG Calhoun, et al. 2014. "Juvenile antioxidant treatment prevents adult deficits in a developmental model of schizophrenia." *Neuron* 83 (5): 1073-1084.
- Laheraa, G, N Freunda, y J Sáiz-Ruiz. 2013. "Asignación de relevancia (saliencia) y desregulación del sistema dopaminérgico." *Rev Psiquiatr Salud Ment* 6 (1): 45-51.
- Lambert, M, P Conus, DI Lubman, D Wade, H Yuen, S Moritz, D Naber, PD McGorry, y BG Schimmelman. 2005. "The impact of substance use disorders on clinical outcome in 643 patients with first-episode psychosis." *Acta Psychiatr Scand* 112 (2): 141-148.
- Carlsson, A, y M Lindqvist. 1963. "Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-Methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain." *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 20: 140-144.
- Lehman, AF, JA Lieberman, LB Dixon, TH McGlashan, AL Miller, DO Perkins, J Kreyenbuhl, American Psychiatric Association, and Steering Committee on Practice Guidelines. . 2004. "Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition." *Am J Psychiatry* 161 (2): 1-56.
- Lewis, DA, AA Curley, JR Glausier, y DW Volk. 2012. "Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia." *Trends Neurosci* 35 (1): 57-67.

- Lieberman , Jeffrey A. , y Michael B. First. 2018. "Psychotic Disorders." *N Engl J Med medicine* 379: 270-280.
- Coral-Vázquez, RM, JF Romero Arauz, S Canizales-Quinteros, A Coronel, EY Valencia Villalvazo, J Hernández Rivera, B Ramírez Regalado, D Rojano Mejía, y P Canto. 2013. "Analysis of polymorphisms and haplotypes in genes associated with vascular tone, hypertension and oxidative stress in Mexican-Mestizo women with severe preeclampsia." *Clin Biochem.* 46 (7-8): 627-632.
- Crismon, ML, TR Argo, y PF Buckley. 2014. "Chapter 50. Schizophrenia." In *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, edited by JT DiPiro, RL Talbert, GC Yee , GR Matzke, BG Wells y LM Posey, 1019–1046. New York, New York: McGraw-Hill.
- Lu, SC. 2009. "Regulation of glutathione synthesis." *Mol Aspects Med* 30 (1-2): 42-59.
- Šagud, M, B Vuksan-Ćusa, N Jakšić, A Mihaljević-Peleš, M Rojnić Kuzman, y N Pivac. 2018. "Smoking in Schizophrenia: an Updated Review." *Psychiatr Danub* 30 (4): 216-223.
- An, H, X Du, X Huang, L Qi, Q Jia, G Yin, C Xiao, et al. 2018. "Obesity, altered oxidative stress, and clinical correlates in chronic schizophrenia patients." *Transl Psychiatry* 8 (1): 258.
- APA. 2014. *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM5*. Washington, DC: American Psychiatric Publishing.
- Armstrong, RN. 1991. "Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function." *Chem Res Toxicol.* 4 (2): 131-140.
- Behrens, MM, SS Ali, DN Dao, J Lucero, G Shekhtman, KL Quick, y LL Dugan. 2007. "Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase." *Science* 318 (5856): 1645-1647.

- Bekris, LM, C Shephard, M Janer, J Graham, B McNeney, J Shin, M Zarghami, et al. 2007. "Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels." *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 115 (4): 221-228.
- Bhattacharjee, P, S Paul, M Banerjee, D Patra, P Banerjee, y N Ghoshal. 2013. "Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2." *Sci Rep* 3 (2704).
- Bitanhirwe, BK, y TU Woo. 2011. "Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach." *Neurosci Biobehav Rev.* 35 (3): 878-893.
- Board, P, M Coggan, P Johnston, V Ross, T Suzuki, y G Webb. 1990. "Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families." *Pharmacol Ther* 48 (3): 357-369.
- Boskovic, M, T Vovk, B Kores Plesnicar, y I Grabnar. 2011. "Oxidative Stress in Schizophrenia." *Curr Neuropharmacol* 9 (2): 301-312.
- Brekke, JS, C Prindle, SW Bae, y JD Long. 2001. "Risks for individuals with schizophrenia who are living in the community." *Psychiatr Serv* 52: 1358-1366.
- Buchanan, RW, A Breier, B Kirkpatrick, P Ball, y WT Jr. Carpenter. 1998. "Positive and negative symptom response to clozapine in schizophrenic patients with and without the deficit syndrome." *Am J Psychiatry* 155 (6): 751-760.
- Burton, GJ, y E Jauniaux. 2011. "Oxidative stress." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 25 (3): 287-299.
- Dandara, C, J Sayi, CM Masimirembwa, A Magimba, S Kaaya, K De Sommers, JR Snyman, y JA Hasler. 2002. "Genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) and glutathione transferases (M1, T1 and P1) among Africans." *Clin Chem Lab Med* 40 (9): 952-957.

- Davis, KL, RS Kahn, G Ko, y M Davidson. 1991. "Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization." *Am J Psychiatry* 148 (11): 1474-1486.
- Demjaha, A, RM Murray, PK McGuire, S Kapur, y OD Howes. 2012. "Dopamine synthesis capacity in patients with treatment-resistant schizophrenia." *AM J Psychiatry* 169 (11): 1203-1210.
- Di Pietro, G, LA Magno, y F Rios-Santos. 2010. "Glutathione S-transferases: an overview in cancer research." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6 (2): 153-170.
- DNA genotek. 2017. *Oragene•DNA / OG-500/OG-600*. Agosto 21. <https://www.dnagenotek.com/ROW/support/collection-instructions/oragene-dna/OG-500andOG-600.html>.
- Do, KQ, AH Trabesinger, M Kirsten-Krüger, CJ Lauer, U Dydak, y D Hell. 2000. "Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo." *Eur J Neurosci* 12 (10): 3721-3728.
- Douglas, KS, LS Guy, y SD Hart. 2009. "Psychosis as a risk factor for violence to others: a meta-analysis." *Psychol Bull.* 135 (5): 679-706.
- Dragovic, S, H Venkataraman, S Begh, NPE Vermeulen, y JNM Commandeur. 2014. "Effect of human glutathione S-transferase hGSTP1-1 polymorphism on the detoxification of reactive metabolites of clozapine, diclofenac and acetaminophen." *Toxicology Letters* 224 (2): 272-281.
- Dragovic, S, JS Boerma, L van Bergen, NP Vermeulen, y JN Commandeur. 2010. "Role of human glutathione S-transferases in the inactivation of reactive metabolites of clozapine." *Chem Res Toxicol* 23 (9): 1467-1476.
- Emeville, E, C Broquère, L Brureau, S Ferdinand, P Blanchet, L Multigner, y M Romana. 2014. "Copy Number Variation of GSTT1 and GSTM1 and the Risk of Prostate Cancer in a Caribbean Population of African Descent." *PLoS One* 9 (9): 107275.

FDA. 2015. Accessed Julio 14, 2018. <https://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatientsandproviders/ucm497790.htm>.

Folsom, DP, W Hawthorne, L Lindamer, T Gilmer, A Bailey, S Golshan, P Garcia, J Unützer, R Hough, y DV Jeste. 2005. "Prevalence and risk factors for homelessness and utilization of mental health services among 10,340 patients with serious mental illness in a large public mental health system." *Am J Psychiatry* 162 (2): 370-376.

Forman, HJ, H Zhang, y A Rinna. 2009. "Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis." *Mol Aspects Med.* 30 (1-2): 1-12.

Fournier, M, A Monin, C Ferrari, PS Bauma, P Conus, y K Do. 2017. " Implication of the glutamate–cystine antiporter xCT in schizophrenia cases linked to impaired GSH synthesis." *NPJ Schizophr* 3: 31.

Fromer, M, AJ Pocklington, DH Kavanagh, HJ Williams, S Dwyer, P Gormley, L Georgieva, E Rees, y P Palta. 2014. "De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks." *Nature* 506 (7487): 179-184.

Fung, WL, NJ Butcher, G Costain, DM Andrade, E Boot, EW Chow, B Chung, et al. 2015. "Practical guidelines for managing adults with 22q11.2 deletion syndrome." *Genet Med* 17 (8): 599-609.

Gaaib, J.N., A.F. Nassief, y A.H. Al-Assi. 2011. "Simple salting – out method for genomic DNA extraction from whole blood." *TJPS* 16 (2): 9-11.

Gawryluk, JW, JF Wang, AC Andrezza, L Shao, LN Yatham, y LT Young. 2011. "Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia." *Int J Neuropsychopharmacol* 14 (8): 1069-1074.

Gila, D, R Bengocheab, M Arrieta, M Mar Fernández, A Álvarez, R Sánchez , R Prat, y A Arce. 2009. "Validez del factor cognitivo de la PANSS como medida del

- rendimiento cognitivo en esquizofrenia." *Revista de Psiquiatría y Salud Mental* 2 (4).
- Gould, NS, E Min, J Huang, H Wei, J Good, y RJ Martin. 2015. "Glutathione Depletion Accelerates Cigarette Smoke-Induced Inflammation and Airspace Enlargement." *Toxicol Sci.* 147 (2): 466–474.
- Gysin, R, R Kraftsik, J Sandell, P Bovet, C Chappuis, P Conus, P Deppen, M Preisig, M Preisig, y V Ruiz. 2007. "Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (42): 16621-16626.
- Gysin, R, R Kraftsik, O Boulat, P Bovet, P Conus, E Comte-Kriege, A Polari, et al. 2011. "Genetic Dysregulation of Glutathione Synthesis Predicts Alteration of Plasma Thiol Redox Status in Schizophrenia ." *Antioxid Redox Signal.* 15 (7): 2003-2010.
- Hashimoto, T, K Hashimoto, R Miyatake, D Matsuzawa, Y Sekine, T Inada, N Ozaki, et al. 2008. "Association study between polymorphisms in glutathione-related genes and methamphetamine use disorder in a Japanese population." *Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet* 147B (7): 1040-1046.
- Hayes, JD, y RC Strange. 2000. "Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences." *Pharmacology.* 61 (3): 154-166.
- Heilä, H, J Haukka, J Suvisaari, y J Lönnqvist. 2005. "Mortality among patient with schizophrenia and reduced psychiatric hospital care." *Psychol. Med* 35 (5): 725–732.
- Henderson, CJ, y CR Wolf. 2011. "Knockout and transgenic mice in glutathione transferase research." *Drug Metab Rev.* 43 (2): 152-64.
- Homayoun, H, y B Moghaddam. 2007. "NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons." *J Neurosci.* 27 (43): 11496-11500.

- Howes, Oliver D. , y Shitij Kapur. 2009. "The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway." *Schizophr Bull.* 35 (3): 549–562.
- Howes, O, R McCutcheon, y James Stone. 2015. "Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century." *J Psychopharmacol* 29 (2): 97-115.
- Hwang, C, AJ Sinskey, y HF Lodish. 1992. "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." *Science* 257 (5076): 1496-1502.
- Johnson, AW, H Jaaro-Peled, N Shahani, TW Sedlak, S Zoubovsky, D Burruss, F Emiliani, A Sawa, y M Gallagher. 2013. "Cognitive and motivational deficits together with prefrontal oxidative stress in a mouse model for neuropsychiatric illness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (30): 12462-12467.
- Jordan, W, H Dobrowolny, S Bahn, HG Bernstein, T Brigadski, T Frodl, B Isermann, et al. 2018. "Oxidative stress in drug-naïve first episode patients with schizophrenia and major depression: effects of disease acuity and potential confounders." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 268 (2): 129-143.
- Kaplan, HI, BJ Sadock, y VA Sadock. 2009. *Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry*. 10th. Indian J Psychiatry.: Published by Lippincott Williams and Wilkins and Wolter Kluwer Health, Philadelphia Indian Reprint.
- Karam, RA, HF Pasha, AS El-Shal, HM Rahman, y DM Gad. 2012. "Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children." *Gene* 497 (2): 314-319.
- Kawanishi, Y, H Tachikawa, y T Suzuki. 2000. "Pharmacogenomics and schizophrenia." *Eur J Pharmacol.* 410 (2-3): 227-241.
- Kay , SR, A Fiszbein, y A Opler. 1987. "The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia." *Schizophr Bull* (Schizophr Bull) 13 (2): 261-276.

- Kim, SK, SW Kang, JH Chung, HJ Park, y KB Cho. 2015. "Genetic Polymorphisms of Glutathione-Related Enzymes (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) and Schizophrenia Risk: A Meta-Analysis." *Int J Mol Sci* 16 (8): 19602-19611.
- Krystal, JH, LP Karper, JP Seibyl, GK Freeman, R Delaney, JD Bremner, GR Heninger, MB Jr Bowers, y DS Charney. 1994. "Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. ." *Arch Gen Psychiatry*. 51 (3): 199-214.
- McDonald-McGinn, DM, KE Sullivan, B Marino, N Philip, A Swillen, JA Vorstman, EH Zackai, et al. 2015. "22q11.2 deletion syndrome." *Nat Rev Dis Primers* 1: 1-46.
- McGuire, P, OD Howes, J Stone, y P Fusar-Poli. 2008. "Functional neuroimaging in schizophrenia: diagnosis and drug discovery." *Trends Pharmacol Sci*. 29 (2): 91-98.
- McKone, EF, J Shao, DD Frangolias, CL Keener, CA Shephard, FM Farin, MR Tonelli, et al. 2006. "Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease." *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 174 (4): 415-419.
- Mannervik, B, PG Board, JD Hayes, I Listowsky, y WR Pearson. 2005. "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases." *Methods Enzymol* 401: 1-8.
- Meltzer, HY. 1994. "An overview of the mechanism of action of clozapine." *J Clin Psychiatry* 55: 47-52.
- Micheli, L, AI Fiaschi , G Giorgi, y D Cerretani. 1992. "Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on glutathione levels in various organs of rat." *Agents Actions*. 106-108.
- Miller, DW, y ED Abercrombie. 1996. "Effects of MK-801 on spontaneous and amphetamine-stimulated dopamine release in striatum measured with in vivo microdialysis in awake rats." *Brain Res Bull*. 40 (1): 57-62.

- Micó, JA, MO Rojas-Corrales, JG Rahola, M Parellada, y D Moreno. 2011. "Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: a case-control study." *BMC Psychiatry* 14: 11-26.
- Montero, R, A Araujo, P Carranza, V Mejía-Loza, L Serrano, A Albores, JE Salinas, y R Camacho-Carranza. 2007. "Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans." *Hum Biol* 79 (3): 299-312.
- MRC-Holland. 2017. *MLPA® General Protocol*. Agosto 25. https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_g2hKwvshD9I.
2015. *SALSA MLPA P128-C1 Cytochrome P450 probemix*. Marzo 16. http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_kh693Rn70.
- Mukerjee, S, SP Mahadik, R Scheffer, EE Correnti, y H Kelkar. 1996. "Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis." *Schizophr Res*. 19 (1): 19-26.
- Murphy, KC, and MJ Owen. 2001. "Velo-cardio-facial syndrome: a model for understanding the genetics and pathogenesis of schizophrenia." *Br J Psychiatry*. 179: 397-402.
- NCBI. 2012. *dbSNP*. Último acceso: 9 de Noviembre de 2018. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1695.
- Nakamura, S, K Kugiyama, S Sugiyama, S Miyamoto, S Koide, H Fukushima, O Honda, M Yoshimura, y H Ogawa. 2002. "Polymorphism in the 5'-flanking region of human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with myocardial infarction." *Circulation* 105 (25): 2968-2973.
- Nichenametla, SN, JE Muscat, JG Liao, P Lazarus, y JP Richie. 2013. "A functional trinucleotide repeat polymorphism in the 5'-untranslated region of the

glutathione biosynthetic gene GCLC is associated with increased risk for lung and aerodigestive tract cancers." *Mol Carcinog* 52 (10): 791-799.

Nissar, S, AS Sameer, R Rasool, NA Chowdri, y F Rashid. 2016. "Evaluation of deletion polymorphisms of glutathione S-transferase genes and colorectal cancer risk in ethnic Kashmiri population: A case-control study." *Indian J Cancer* 53 (4): 524-528.

Nucifora, LG, T Tanaka, LN Hayes, M Kim, BJ Lee, T Matsuda, FC Nucifora Jr, et al. 2017. "Reduction of plasma glutathione in psychosis associated with schizophrenia and bipolar disorder in translational psychiatry." *Transl Psychiatry* 7 (8): 1215.

Olney, JW, y NB Farber. 1995. "Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* 52 (12): 998-1007.

OMS. 2018. «Esquizofrenia.» 9 de Abril. Último acceso: 24 de Julio de 2018. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>.

Palma-Cano, LE, EJ Córdova, L Orozco, A Martínez-Hernández, M Cid, I Leal-Berumen, A Licón-Trillo, et al. 2017. "GSTT1 and GSTM1 null variants in Mestizo and Amerindian populations from northwestern Mexico and a literature review." *Genet Mol Biol* 40 (4): 727-735.

Patel, KR, PharmD, RPh, J Cherian, PharmD, RPh, K Gohil, PharmD , RPh, y D Atkinson. 2014. "Schizophrenia: Overview and Treatment Options." *P.T.* 39 (9): 638-645.

Pejovic-Milovancevic, MM, VD Mandic-Maravic, VM Coric, MM Mitkovic-Voncina, MV Kostic, AR Savic-Radojevic, MD Ercegovic, et al. 2016. "Glutathione S-Transferase Deletion Polymorphisms in Early-Onset Psychotic and Bipolar Disorders: A Case-Control Study." *Lab Med* 47 (3): 195-204.

Peralta, V, y MJ Cuesta. 1994. "Psychometric properties of the positive and negative syndrome scale (PANSS) in schizophrenia." *Psychiatry Res* 53: 31-40.

- Pérez-Morales, R, C Castro-Hernández, ME Gonsebatt, y J Rubio. 2008. "Polymorphism of CYP1A1*2C, GSTM1*0, and GSTT1*0 in a Mexican Mestizo population: a similitude analysis." *Hum Biol.* 80 (4): 457-465.
- Pers, TH, P Timshel, S Ripke, S Lent, P Sullivan, MC O'Donovan, L Franke, y JN Hirschhorn. 2016. "Comprehensive analysis of schizophrenia-associated loci highlights ion channel pathways and biologically plausible candidate causal genes." *Hum Mol Genet* 25 (6): 1247-1254.
- Pharmgkb. 2018. *Clozapine pathway, pharmacokinetics*. 18 de Septiembre. <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA166163661>.
- Pinheiro, DS, RS Santos, RB Brito, AHS Cruz, PC Ghedini, y AAS Reis. 2017. "GSTM1/GSTT1 double-null genotype increases risk of treatment-resistant schizophrenia: A genetic association study in Brazilian patients." *Plos one* 12 (8).
- Polonikov, AV, VP Ivanov, MA Solodilova, IV Khoroshaya, MA Kozhuhov, y VI Panfilov. 2007. "The relationship between polymorphisms in the glutamate cysteine ligase gene and asthma susceptibility." *Respir. Med* 101 (11): 2422-2424.
- Promega. 2017. *Promega*. Agosto 18. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/>.
- Raedler, TJ. 2010. "Cardiovascular aspects of antipsychotics." *Curr Opin Psychiatry* 23 (6): 574-581.
- Raffa, M, F Atig, A Mhalla, A Kerkeni, y A Mechri. 2011. "Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naive first-episode schizophrenic patients." *BMC Psychiatry* 11: 124.
- Rossell, SL, PS Francis, C Galletly, A Harris, D Siskind, M Berk, y K Bozaoglu. 2016. "N-acetylcysteine (NAC) in schizophrenia resistant to clozapine: a double blind

- randomised placebo controlled trial targeting negative symptoms." *BMC Psychiatry*. 16 (1): 320.
- Schwab, SG, J Hallmayer, M Albus, B Lerer, GN Eckstein, M Borrmann, RH Segman, et al. 2000. "A genome-wide autosomal screen for schizophrenia susceptibility loci in 71 families with affected siblings: support for loci on chromosome 10p and 6." *Mol Psychiatry* 5 (6): 638-649.
- Saito, T, M Ikeda, T Mushiroda, T Ozeki, K Kondo, A Shimasaki, K Kawase, et al. 2016. "Pharmacogenomic Study of Clozapine-Induced Agranulocytosis/Granulocytopenia in a Japanese Population." *Biol Psychiatry*. 80 (8): 636-642.
- Sarandol, A, E Sarandol, HE Acikgoz, SS Eker, C Akkaya, y M Dirican. 2015. "First-episode psychosis is associated with oxidative stress: Effects of short-term antipsychotic treatment." *Psychiatry Clin Neurosci*. 69 (11): 699-707.
- Seeman, P, y T Lee. 1975. "Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons." *Science* 188 (4194): 1217-1279.
- Sekhar, RV, SV McKay, SG Patel, AP Guthikonda, y VT Reddy. 2011. "Glutathione Synthesis Is Diminished in Patients With Uncontrolled Diabetes and Restored by Dietary Supplementation With Cysteine and Glycine." *Diabetes Care* 34 (1): 162-167.
- Shelly, CL. 2013. "Glutathione synthesis." *Biochim Biophys Acta*. 1830 (5): 3143-3153.
- Sriretnakumar, V., E. Huang, y D.J. Müller. 2015. "Pharmacogenetics of clozapine treatment response and side-effects in schizophrenia: an update." *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 11 (11): 1709-31.

- Stone, JM, F Pepper, J Fam, H Furby, E Hughes, C Morgan, y OD Howes. 2014. "Glutamate, N-acetyl aspartate and psychotic symptoms in chronic ketamine users." *J Psychopharmacol (Berl)* 231 (10): 2107-2116.
- Stone, JM, PD Morrison, y LS Pilowsky. 2007. "Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review." *J Psychopharmacol.* 21 (4): 440-452.
- Strange, RC, y AA Fryer. 2000. *Encyclopedia of medical genomics and proteomics*. Vol. 1. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sullivan PF, KS Kendler, y MC Neale. 2003. "Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies." *Arch Gen Psychiatry* 60 (12): 1187-1192.
- Sullivan, PF, MJ Daly, y M O'Donovan. 2012. "Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications." *Nat Rev Genet* 13 (8): 537-551.
- Sullivan, PF, MJ Daly, y M O'Donovan. 2012. "Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications." *Nat Rev Genet* 13: 537-551.
- Subramanian, S, BA Völm, y N Huband. 2017. "Clozapine dose for schizophrenia." *Cochrane Database Syst Rev* 6.
- Suokas, JT, J Perälä, K Suominen, S Saarni, J Lönnqvist, y JM Suvisaari. 2010. "Epidemiology of suicide attempts among persons with psychotic disorder in the general population." *Schizophr Res* 124: 22-28.
- Tosic, M, J Ott, S Barral, P Bovet, P Deppen, F Gheorghita, ML Matthey, et al. 2006. "Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene." *Am. J. Hum. Genet* 79 (3): 586- 592.

- Tunçel, ÖK, G Sarısoy, B Bilgici, O Pazvantoglu, E Çetin, E Ünverdi, B Avcı, y Ö Böke. 2015. "Oxidative stress in bipolar and schizophrenia patients." *Psychiatry Res* 228 (3): 688-694.
- Van, L, E Boot, y AS Bassett. 2017. "Update on the 22q11.2 deletion syndrome and its relevance to schizophrenia." *Curr Opin Psychiatry* 30 (3): 191-196.
- Vargas, ML, y G Lahera. 2011. "'Asignación de relevancia': una propuesta para el término inglés 'salience.'" *Actas Esp Psiquiatr* 39 (4): 271-272.
- Vogt, BL, y JP Richie. 2007. "Glutathione Depletion and Recovery After Acute Ethanol Administration in the Aging Mouse." *Biochem Pharmacol.* 73 (10): 1613–1621.
- Walsh, AC, JA Feulner, y A Reilly. 2001. "Evidence for functionally significant polymorphism of human glutamate cysteine ligase catalytic subunit: association with glutathione levels and drug resistance in the National Cancer Institute tumor cell line panel." *Toxicol Sci* 61 (2): 218-223.
- Wang, Z, P Li, T Wu, S Zhu, L Deng, y G Cui. 2018. "Axon guidance pathway genes are associated with schizophrenia risk." *Exp Ther Med* 16 (6): 4519-4526.
- Wiencke, JK, S Pemble, B Ketterer, y KT Kelsey. 1995. "Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4 (3): 253-259.
- Wood, SJ, GE Berger, RM Wellard, TM Proffitt, M McConchie, M Berk, PD McGorry, y C Pantelis. 2009. "Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: a 1H-MRS investigation." *Neurobiol Dis* 33 (3): 354-357.
- Xin, L, R Mekle, M Fournier, PS Baumann, y C Ferrari. 2016. "Genetic Polymorphism Associated Prefrontal Glutathione and Its Coupling With Brain Glutamate and Peripheral Redox Status in Early Psychosis ." *Schizophr Bull* 42 (5): 1185-1196.

Yao, JK, S Leonard, y R Reddy. 2006. "Altered glutathione redox state in schizophrenia."
Dis Markers 22 (1-2): 83-93.

Yolland, CAOB, A Phillipou, DJ Castle, E Neill, ME Hughes, y C Galletly. 2018.
"Improvement of cognitive function in schizophrenia with N-acetylcysteine: A
theoretical review." *Nutr Neurosci* 30: 1-10.

Anexo A. Carta de consentimiento informado para pacientes



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 trastornos psicóticos".
- ✓ 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 (arriba 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: _____

Correo electrónico: _____



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
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, FIRMA Y CÉDULA DEL MÉDICO

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

Anexo B. Carta de consentimiento informado para controles



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

Formato N°

Consentimiento para participar en la Investigación de la estructura genética de la población mexicana

NOMBRE DEL SUJETO _____	FECHA _____	HORA _____
FECHA EN LA QUE SE REALIZARÁ EL PROCEDIMIENTO _____		

Yo _____, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de persona aparentemente sana:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

1. He sido informado (a) que en el Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto se están realizando estudio para determinar las variaciones en genes (que son las unidades de la herencia) en personas, aparentemente sanas, de la población mexicana.
2. Los genes que se van a estudiar son los siguientes: Apolipoproteína E, ataxinas, huntingtina, CYP2D6, N-acetiltransferasa, parkina, PINK 1, DJ1, presenilina 1, progranulina, MAPT, mioclonía, VHL, MTHFR, frataxina, tau, 22q11 y aprataxina. Estos genes pueden presentar variantes (polimorfismos) cuya frecuencia varía en diferentes poblaciones.
3. He sido informado (a) que para analizar estos genes es necesario que done una muestra de 20 ml. de sangre periférica para que de ahí se extraiga el DNA que es el material hereditario y se estudien los genes antes mencionados.
4. He sido informado (a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción.
5. He sido informado (a) que se me hará un árbol genealógico y se me preguntará acerca de las enfermedades que he padecido así como las de mi familia.
6. Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad.
7. He sido informado (a) que mi participación en este estudio es **VOLUNTARIA** y no tiene costo alguno para mí, ni recibiré remuneración alguna.
8. Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado (a) por los investigadores para saber si deseo conocer la información y si deseo participar en otros estudios que contribuyan a un diagnóstico y manejo adecuados.
9. Para cualquier duda o aclaración puede dirigirse al departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto con la Dra. Alejandra Camacho Molina, la M. en C. Adriana Ochoa o con el Dr. David Dávila o comunicarse al Tel. 56 06 38 22 Ext. 2018 y/o 1071.

ANTECEDENTES

Tabaquismo	Sí	No	Años _____ Cantidad promedio: _____
Alcohol	Sí	No	Años _____ Tipo de bebida _____ Cantidad _____
Drogas	Sí	No	Tipo y frecuencia _____
Sedentarismo	Sí	No	
Hipertensión	Sí	No	Años de evolución _____



Diabetes Mellitus Sí No Años de evolución _____
Colesterol alto Sí No Años de evolución _____
Cardiopatía Sí No Años de evolución _____
Insuficiencia art. Sí No Años de evolución _____
Otras (especificar) _____

LUGAR DE ORIGEN (NACIMIENTO)

Abuelo paterno: _____
Abuela paterna: _____
Abuelo materno: _____
Abuela materna: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

ENFERMEDAD	SÍ	NO	FAMILIAR AFECTADO
EMBOLIA CEREBRAL			
COLESTEROL			
DIABETES			
PARKINSON			
PERDIDA DE MEMORIA			
EPILEPSIA			
CÁNCER			
Tipo de cáncer: _____			

FIRMA DEL SUJETO DE INVESTIGACIÓN Y RESPONSABLE LEGAL

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA

Género: H M Teléfono _____

Dirección: _____

Origen _____ Edad _____ Ocupación _____

Edo. Civil _____ Escolaridad _____

NOMBRE, FIRMA Y CÉDULA DEL MÉDICO

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO