

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIOMARCADORES PARA LA FARMACOVIGILANCIA INTENSIVA EN PACIENTES CON

ESQUIZOFRENIA BAJO TRATAMIENTO CON CLOZAPINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. en C. Aurora Mayela Vaquero Báez

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz

ASESOR

Dr. Carlos Alejandro Torner

Ciudad de México, octubre 2021

Resumen

Objetivo: medir la clozapina (CLZ) y la N-desmetil clozapina (DMC) plasmáticas como biomarcadores de eficacia y seguridad y correlacionar las concentraciones del fármaco con la aparición de efectos hemáticos adversos previo a las manifestaciones clínicas. Métodos: un método de cromatografía de líquidos de alta resolución validado, utilizando un detector de matriz de diodos (ultravioleta) para obtener concentraciones de CLZ y su principal metabolito, DMC. Para ellos, se analizó el plasma de 41 pacientes con esquizofrenia que tenían prescrito CLZ a través de HPLC. El conteo de neutrófilos y leucocitos en sangre se evaluó como un marcador de reacciones adversas. Resultados: El método analítico validado fue lineal, reproducible y estable para medir concentraciones de CLZ entre 30 y 1000 ng/mL, mientras que fue de 12.5–560 ng/mL del metabolito principal, DMC. El método nos permitió correlacionar las concentraciones plasmáticas de CLZ, la duración del tratamiento con CLZ y la dosis de CLZ como determinantes de la cantidad de neutrófilos con un $R = 0.447$ utilizando un modelo de análisis estadístico de regresión múltiple. Asimismo, la correlación de la cantidad de leucocitos con respecto a los niveles plasmáticos de CLZ y el tiempo de CLZ mostró un $R = 0.461$. El DMC se correlacionó significativamente con el recuento de neutrófilos y leucocitos, pero se excluyó de la regresión cuando se incluyó la concentración de CLZ en el modelo. Finalmente, no se registraron otras reacciones adversas hematológicas. Se midieron los niveles de GSH y GSSG pero no se encontró ninguna correlación. Un paciente presentó una complicación cardiovascular, aumento del intervalo QT. La correlación negativa entre la CLZ y el recuento de neutrófilos observada en los pacientes sugiere que la CLZ en sí, pero no la DMC, podría estar relacionada con las

reacciones adversas hematológicas. Conclusión: Los hallazgos de este estudio demuestran por primera vez que los niveles plasmáticos de CLZ y el tiempo de toma del medicamento son determinantes independientes de los niveles de neutrófilos y leucocitos en sangre, por lo que la monitorización de CLZ plasmática puede ser útil en la práctica clínica para determinar la seguridad del medicamento.

Palabras clave: esquizofrenia, clozapina, farmacovigilancia.



Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda



Dra. María de los Ángeles Araceli Diaz Ruiz

“NADA EN LA VIDA ES PARA SER TEMIDO, ES SÓLO PARA SER COMPRENDIDO. AHORA ES EL MOMENTO DE ENTENDER MÁS DE MODO QUE PODAMOS TEMER MENOS”

MARIE CURIE

“TODOS SOMOS MUY IGNORANTES. LO QUE OCURRE ES QUE NO TODOS IGNORAMOS LAS MISMAS COSAS”

ALBERT EINSTEIN

“EL AMOR ES LA MÁS FUERTE DE TODAS LAS PASIONES, PORQUE ATACA AL MISMO TIEMPO LA CABEZA, AL CUERPO Y AL CORAZÓN.

VOLTAIRE

El programa del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia del CONACYT con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la División en Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa, Lerma y Xochimilco aprobó la tesis que presentó M. en C. Aurora Mayela Vaquero Báez el día 7 de septiembre a las 15 h.

SINODALES:

Presidente Dr. Cuauhtémoc Pérez González

Secretaria Dra. Araceli Díaz Ruíz

Revisora Dra. María Eva González Trujano

Revisora Dra. Miriam del Carmen Carrasco Portugal

Vocal Dr. Carlos Torner Aguilar



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

ACTA DE PRE-EXAMEN DOCTORAL

Folio: Doctorado.CBS.360.21

En la Ciudad de México el día 07 de septiembre de 2021, a las 15:00 hrs., la alumna Aurora Mayela Vaquero Báez, con matrícula 2151802105, presentó el pre-examen doctoral, que corresponde a la tesis titulada "Biomarcadores para la farmacovigilancia intensiva en pacientes con esquizofrenia bajo tratamiento con clozapina", ante el jurado designado para tal efecto.

Considerando que incorporó satisfactoriamente todas las recomendaciones sugeridas por el jurado durante las revisiones previas, y después de concluir la disertación y réplica de rigor, el jurado determinó que Aurora Mayela Vaquero Baez SI aprobó el preexamen doctoral, por lo que Si se encuentra en condiciones para presentar la disertación pública para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud.

Para constancia, se levantó la presente acta a las 16:55 horas del día 07 del mes de septiembre del año 2021, misma que suscriben los miembros del jurado.

PRESIDENTE

Dr. Cuauhtémoc Pérez González

SECRETARIA

Dra. Araceli Díaz Ruiz

PRIMERA REVISORA

Dra. María Eva González Trujano

SEGUNDA REVISORA

Dra. Miriam del Carmen Carrasco Portugal

VOCAL

Dr. Carlos Torner Aguilar

El suscrito **COORDINADOR** del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud **CERTIFICA** que las firmas que anteceden son auténticas y corresponden a las personas que aparecen en esta acta.

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco NO 186,
Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P.
09340, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA

Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón, C.P. 52005 Lerma
de Villada, Méx.
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO

Calz. del Hueso 1000,
Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P.
04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504 y 3185

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe, Cuajimalpa de
Morelos, C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6530

doctocb@correo.xoc.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
I. Introducción.....	5
II. Antecedentes.....	6
2.1. Epidemiología de la esquizofrenia.....	6
2.2. Esquizofrenia.....	7
2.3. Fisiopatología.....	9
2.3.1. Alteraciones bioquímicas en la esquizofrenia.....	9
2.3.2. Relación de la esquizofrenia con el estrés oxidante y la inflamación.....	12
2.3.3. Marcadores de estado antioxidante y daño oxidativo.....	15
2.3.4. Sistema de glutatión.....	16
2.3.5. Catalasa.....	18
2.3.6. Superóxido dismutasa.....	18
2.3.7. Óxido nítrico.....	20
2.3.8. Otros metabolitos.....	21
2.3.9. Inflamación y esquizofrenia.....	23
2.3.10. Neurotransmisores y esquizofrenia.....	25
2.3.10.1. Dopamina.....	25
2.3.10.2. Serotonina.....	27

2.3.10.3. Glutamato.....	28
2.3.10.4. Acetilcolina	28
2.3.10.5. Ácido gamma-aminobutírico (GABA)	29
2.4. Tratamiento.....	30
2.4.1. Clozapina	34
2.4.1.1. Mecanismo de acción de la clozapina y relaciones con las reacciones adversas	37
2.4.1.2. Reacciones adversas frecuentes	39
2.4.1.3. Convulsiones	41
2.4.1.4. Aumento de peso y riesgo de síndrome metabólico	41
2.4.1.5. Hipomotilidad gastrointestinal y estreñimiento	42
2.4.1.6. Reacciones adversas poco frecuentes.....	43
2.4.1.7. Discrasias sanguíneas y agranulocitosis/granulocitopenia ...	44
2.4.1.8. Miocardiopatía, miocarditis y pericarditis inducidas por clozapina.....	47
2.4.2. Eficacia y seguridad del tratamiento	48
III. Pregunta de investigación	50
IV. Objetivos.....	51
4.1. Objetivo general	51
4.2. Objetivos particulares	51
V. Metodología.....	52
5.1. Tipo de estudio	52

5.2. Diseño del estudio	52
5.2.1. Criterios de inclusión	52
5.2.2. Criterios de exclusión	53
5.2.3. Muestreo	53
5.2.4. Aspectos éticos.....	53
5.2.5. Características de la población en estudio	53
5.3. Marcadores bioquímicos a determinar.....	54
5.3.1. Conteo de leucocitos y neutrófilos en sangre	54
5.3.2. Cuantificación de la concentración glutatión reducido y oxidado.....	54
5.3.3. Determinación de la concentración plasmática de clozapina y N-desmetilclozapina	56
5.4. Validación parcial del método.....	58
5.4.1. Curvas de calibración y linealidad.....	58
5.4.2. Límite inferior de cuantificación	60
5.4.3. Reproducibilidad y repetibilidad	60
5.4.4. Exactitud	61
5.4.5. Recuperación absoluta	61
5.4.6. Selectividad.....	61
5.4.7. Estabilidad de las muestras	61
5.5. Análisis estadístico	62
5.6. Seguimiento farmacoterapéutico.....	62

5.6.1. Eficacia del tratamiento	62
5.6.2. Detección de resultados negativos a la medicación y errores de medicación.....	62
VI. Resultados	64
6.1. Análisis cromatográfico	64
6.2. Seguimiento farmacoterapéutico.....	69
VII. Discusión	76
VIII. Conclusiones	80
IX. Perspectivas.....	81
X. Referencias	82
XI. Anexos.....	112
11.1. Consentimiento informado.....	112
11.2. Formato de recolección de datos.....	115
11.3. Registro de protocolo	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de riesgo en la esquizofrenia asociados con el estrés oxidante y la inflamación.....	11
Figura 2. Linealidad de la curva de clozapina.....	65
Figura 3. Linealidad de la curva de N-desmetilclozapina.....	65
Figura 4. Cromatograma que muestra los tiempos de elusión de N-desmetilclozapina, clozapina y protriptilina.....	66
Figura. 5. Diagrama de dispersión que muestra las principales relaciones entre el conteo de neutrófilos y los niveles de CLZ y DMC.....	74
Figura 6. Diagrama de dispersión que muestra las principales relaciones entre el conteo de leucocitos y los niveles de CLZ y DMC.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Beneficios del uso de clozapina en la práctica clínica	37
Tabla 2. Reacciones adversas de la clozapina	40
Tabla 3. Repetibilidad de clozapina.....	66
Tabla 4. Repetibilidad de N-desmetilclozapina.....	66
Tabla 5. Reproducibilidad del método de extracción para clozapina	67
Tabla 6. Reproducibilidad del método analítico para N-desmetilclozapina	67
Tabla 7. Exactitud del método analítico de cuantificación de clozapina	68
Tabla 8. Exactitud del método analítico de cuantificación de N-desmetilclozapina.....	68
Tabla 9. Estabilidad de las muestras plasmáticas después de 90 días de almacenamiento a -70°C	69
Tabla 10. Estadística descriptiva de la población en estudio.....	72
Tabla 11. Tratamiento farmacológico concomitante.....	73
Tabla 12. Resultados de las correlaciones Sperman y Pearson entre los biomarcadores de CLZ y DMCma	75
Tabla 13. Resultados de los análisis de regresión múltiple usando biomarcadores de CLZ y DMC y el conteo de células blancas.....	75

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- APG: Antipsicótico de primera generación.
- ASG: Antipsicótico de segunda generación.
- CAD: Cetoacidosis diabética.
- CAPON: carboxilo terminal de la sintasa de óxido nítrico neuronal.
- CIE: Clasificación Internacional de Enfermedades.
- CLZ: clozapina.
- CYP: Citocromo P450.
- D2: receptor dopamina.
- DA: dopamina.
- DHA: Ácido docosahexaenoico.
- DMC: N-desmetil clozapina.
- DSM-V: Handbook of Differential Diagnosis 5.
- EDTA: ácido etilendiaminatetraacético.
- EPA: Ácido eicosapentaenoico.
- EPS: Efectos secundarios extrapiramidales.
- ERT: Esquizofrenia Resistente al Tratamiento.
- GABA: Ácido gamma-aminobutírico.
- GAD-67: Enzima glutamato descarboxilasa 67.
- GCL: Gamma-glutamil cisteína ligasa
- GCLC: Enzima limitante de la producción de glutatión y está compuesto de catalizadores.
- GCLM: Subunidades modificadoras.
- Glu: Glutamato.
- GSH: glutatión reducido.
- GSSG: glutatión oxidado.
- H1: receptor de histamina.
- H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
- Habs: habitante.
- HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución.
- HT: serotoninérgico.
- IL: Interleucina.
- ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.
- KYNA: Ácido kinurénico.
- LCR: Líquido Cefalorraquídeo.
- LSD: Ácido lisérgico.
- M1: Receptores muscarínicos.

- MetS: Síndrome metabólico.
- MFT: Monitoreo farmacoterapéutico
- NADPH: Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
- NAC: N-acetilcisteína.
- NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico.
- NO: Óxido nítrico.
- NO₂⁻: Nitrito.
- NO₃⁻: Nitrato.
- NOS: sintasa de óxido nítrico.
- O₂⁻: superóxido.
- PANSS: escala de síntomas positivos y negativos.
- PCR: proteína C reactiva.
- PGE₂: prostaglandina-E₂.
- PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.
- RAN: Recuento absoluto de neutrófilos.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- SOD: Superóxido dismutasa
- SSA: Secretaría de Salud.
- SNC: Sistema Nervioso Central.
- TAS: Estado antioxidante total.
- TBARS: Reactivas tiobarbitúicas.
- Th1: Linfocitos.
- TNF: Factor de necrosis tumoral.
- UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.
- WHO: World Health Organization

Resumen

Objetivo: medir la clozapina (CLZ) y la N-desmetil clozapina (DMC) plasmáticas como biomarcadores de eficacia y seguridad y correlacionar las concentraciones del fármaco con la aparición de efectos hemáticos adversos previo a las manifestaciones clínicas. Métodos: un método de cromatografía de líquidos de alta resolución validado, utilizando un detector de matriz de diodos (ultravioleta) para obtener concentraciones de CLZ y su principal metabolito, DMC. Para ellos, se analizó el plasma de 41 pacientes con esquizofrenia que tenían prescrito CLZ a través de HPLC. El conteo de neutrófilos y leucocitos en sangre se evaluó como un marcador de reacciones adversas. Resultados: El método analítico validado fue lineal, reproducible y estable para medir concentraciones de CLZ entre 30 y 1000 ng/mL, mientras que fue de 12.5–560 ng/mL del metabolito principal, DMC. El método nos permitió correlacionar las concentraciones plasmáticas de CLZ, la duración del tratamiento con CLZ y la dosis de CLZ como determinantes de la cantidad de neutrófilos con un $R = 0.447$ utilizando un modelo de análisis estadístico de regresión múltiple. Asimismo, la correlación de la cantidad de leucocitos con respecto a los niveles plasmáticos de CLZ y el tiempo de CLZ mostró un $R = 0.461$. El DMC se correlacionó significativamente con el recuento de neutrófilos y leucocitos, pero se excluyó de la regresión cuando se incluyó la concentración de CLZ en el modelo. Finalmente, no se registraron otras reacciones adversas hematológicas. Se midieron los niveles de GSH y GSSG pero no se encontró ninguna correlación. Un paciente presentó una complicación cardiovascular, aumento del intervalo QT. La correlación negativa entre la CLZ y el recuento de neutrófilos observada en los pacientes sugiere que la CLZ en sí, pero no la DMC, podría estar relacionada con las

reacciones adversas hematológicas. Conclusión: Los hallazgos de este estudio demuestran por primera vez que los niveles plasmáticos de CLZ y el tiempo de toma del medicamento son determinantes independientes de los niveles de neutrófilos y leucocitos en sangre, por lo que la monitorización de CLZ plasmática puede ser útil en la práctica clínica para determinar la seguridad del medicamento.

Abstract

Purpose: The aim of present study is to measure plasma clozapine (CLZ) and N-desmethyl clozapine (DMC) as biomarkers to correlate drug concentrations with the appearance of preclinical adverse hematic effects. **Methods:** A high-performance liquid chromatographic method, using a diode-array (ultraviolet) detector, was validated to obtain reliable concentrations of CLZ and DMC, its main metabolite, in plasma of 41 schizophrenic patients taking CLZ. Blood neutrophils and leucocytes counting were concurrently assessed as a proxy to adverse reactions. **Results:** The analytical method employed was linear, reproducible, and stable to measure concentrations of CLZ between 30 and 1000 ng/mL, while 12.5–560 ng/mL of the main metabolite. The method allowed us to correlate CLZ plasma concentrations, the time taking CLZ and CLZ dose as determinants of neutrophils' counting with a $R^2=0.447$, using a multiple regression analysis model. Likewise, the correlation of leucocyte counting vs CLZ plasma levels and CLZ time, showed a $R^2 = 0.461$. DMC correlated significantly with both neutrophils and leucocytes counting, but was excluded from the regression when CLZ concentration was included in the model. Finally, no other hematological adverse reactions were recorded. GSH and GSSG levels were measured but no correlation were found. One patient presented a cardiovascular adverse reaction. The negative correlation between clozapine and neutrophil count observed in patients, suggest that CLZ itself, but not DMC, could be related to hematologic side-effects. **Conclusion:** The findings of this study, demonstrate for the first time, that plasma levels of CLZ and time taking the drug

are independent determinants of blood neutrophils and leucocytes, so the monitoring of plasma CLZ may be useful in the clinic practice to determine safe of the drug.

I. INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad mental caracterizada por dos o más de los siguientes síntomas: ideas delirantes, alucinaciones, lenguaje desorganizado, comportamiento catatónico o gravemente desorganizado, y síntomas negativos como la alogia, abulia o aplanamiento afectivo (Pérez-Neri, 2016). Actualmente los antipsicóticos atípicos, como la clozapina, provocan menos reacciones adversas en el sistema extrapiramidal y se utilizan en pacientes que no han tenido buena respuesta a los antipsicóticos clásicos. En la literatura se reporta que esta familia de medicamentos reduce los síntomas positivos y los negativos, así como algunos síntomas cognitivos. Sin embargo, la clozapina no es un medicamento de primera elección ya que puede provocar agranulocitosis con una frecuencia del 1%, y se requiere hacer un monitoreo hematológico durante los primeros meses del tratamiento. El objetivo de la presente investigación es cuantificar los biomarcadores de seguridad y eficacia de la clozapina y determinar si existe relación entre ellos para poder prevenir la reacción adversa.

II. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología de la esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad mental cuyo inicio se manifiesta principalmente entre los 15 y 24 años y un segundo pico entre los 55 y 64 años (Messias, et al. 2007). La Organización Mundial de la Salud la define como “una enfermedad que se caracteriza por una distorsión del pensamiento, las emociones, el lenguaje, la conciencia de sí mismo y la conducta”. (WHO, 2018) Es una enfermedad crónica y compleja, que causa un impacto significativo en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares, el ambiente social y el sistema de salud (Baser, et al. 2015). La incidencia de la esquizofrenia varía dependiendo de la región. Los rangos de incidencia de la esquizofrenia tienen rangos que oscilan entre 11/1000 hab/año a 70/1000hab/año, con una prevalencia a de 3-8/1000 habitantes (Messias, et al. 2004), otros estudios reportan un rango entre 8 a 43 por 100,000 habitantes (McGrath, et al, 2004 y 2008). El género también es un condicionante que modifica su incidencia, siendo significativamente mayor en hombres que en mujeres. Algunos estudios sugieren que la razón de riesgo hombres: mujeres es de 4:1, dicha diferencia no se encuentra asociada con factores metodológicos relacionados con el rango de edad o criterios diagnósticos. En mujeres la esquizofrenia se presenta con un retraso promedio de 3-4 años, lo que se ha sugerido podría deberse a un posible efecto protector de los estrógenos (McGrath, et al. 2010). En Europa del sur, durante el periodo de 2008, tuvo una prevalencia de 6.2 por 1000 personas de 15 a 64 años, siendo mayor en hombres que en mujeres (razón hombres: mujeres de 1.75) (Orrico-Sánchez, et. al. 2020). La manifestación

prodrómica de la esquizofrenia implica los cambios previos a la aparición de los eventos psicóticos. En base en estudios previos, se ha podido delimitar que la duración media de los pródromos del primer episodio psicótico es de aproximadamente 2 años, con una mediana de un año (McGlashan, 2006). Una vez que surgen los síntomas psicóticos, éstos se acumulan relativamente rápido hasta poder ser definidos como un episodio psicótico que cumpla los criterios diagnósticos del DSM-V o CIE-10 para esquizofrenia. El número total de personas con esquizofrenia aumenta con la edad de acuerdo con las muestras estudiadas (Lieberman, et al., 2001).

2.2. Esquizofrenia

La esquizofrenia está caracterizada por 3 grupos de síntomas parcialmente independientes: síntomas positivos, síntomas negativos y deficiencias cognitivas. Los síntomas positivos son los más dramáticos y son las manifestaciones de la psicosis, que incluyen alucinaciones, típicamente auditivas, en las que el individuo escucha voces que opinan sobre sus pensamientos o acciones, y delirios, que a menudo son de índole paranoico (Pérez-Neri, 2016). Los pacientes sienten que están siendo perseguidos y los sucesos vitales neutros adquieren un significado especial para respaldar esta creencia. Las experiencias delirantes más extrañas son comunes, como la sensación de que otra persona controla su mente o cuerpo o que los pensamientos se insertan o se retiran de su mente. Los procesos cognitivos pueden volverse muy desorganizados, lo que resulta en una pérdida de las asociaciones con el pensamiento tangencial, razonamiento ilógico y estados emocionales inconsistentes con el contenido del pensamiento (McGrath, et al. 2004). Estos síntomas responden mejor al

tratamiento antipsicótico como clorpromazina y haloperidol. El término "negativo" se refiere a una pérdida o déficit neurológico y/o psicológico, e incluye una disminución afectiva, la incompetencia social y la pérdida de iniciativa. Las deficiencias cognitivas, que están asociados con una reducción moderada en el coeficiente intelectual, interrumpen las habilidades de resolución de problemas, la memoria verbal declarativa, el retraso en el recuerdo de palabras y la fluidez verbal. Aunque claramente incapacitante, los déficits cognitivos no se vuelven tan severos como los asociados con la demencia o el delirio. El grado de deterioro cognitivo se correlaciona con la gravedad de los síntomas negativos. Ninguno de los dos se correlaciona bien con síntomas positivos (Coyle, 2006, First 2014).

La psicopatología de la esquizofrenia inicialmente subdivide el trastorno en dos categorías generales de síntomas, positivos y negativos. Estas características clínicas incluyen alteraciones del estado de ánimo, pensamiento, percepción y funcionamiento social, y a menudo está acompañado de deterioro cognitivo (Smeland, et al. 2019).

El déficit neurocognitivo es considerado como un componente central de la esquizofrenia que afecta sobre todo el lenguaje, las funciones ejecutivas, la memoria de trabajo, la atención y la memoria episódica (Saykin, et al. 1994, First, 2014). El funcionamiento cognitivo determina la adaptación social independientemente de la gravedad de los síntomas negativos (Marson, et al. 2006). La importancia en la búsqueda de tratamientos en contra del déficit cognitivo presente en la esquizofrenia es evidente desde diversos puntos de vista. En el económico, existe pérdida de la productividad, y se ha sugerido que

la disfunción cognitiva predice el mantenimiento de la situación laboral del esquizofrénico, lo que convierte a la esquizofrenia en un problema de salud que afecta el desarrollo económico familiar (Marson, et al. 2006, Coyle, 2006).

Más de 21 millones de personas en el mundo padecen de esquizofrenia, pero es la menos común de las enfermedades mentales (WHO, 2018), en México aproximadamente un millón de personas tienen esta enfermedad, lo que representa el 1% de la población (UNAM, 2013), de los cuales, el 50% de los pacientes abandona el tratamiento durante el primer año (UNAM, 2018). Ésta, ocupa el cuarto lugar de las causas de discapacidad en la población derechohabiente del ISSSTE (SSA, 2018).

2.3. Fisiopatología

2.3.1. Alteraciones bioquímicas en la esquizofrenia

Los eucariotas generan la mayor parte de su energía a través de las mitocondrias, cuyas funciones bioenergéticas incluyen el ciclo de Krebs, la síntesis de ATP / fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos (Koga, et al. 2016). Como ocurre con la mayoría de los procesos fisiológicos, dicho metabolismo no es 100% eficiente y genera subproductos tóxicos como superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilos que dañan el ADN, enzimas, proteínas, lípidos y carbohidratos, entre otros componentes celulares. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS), cuando se producen en grandes cantidades se desarrolla un estado denominado "estrés oxidante", y las ROS tratan de ser controladas por familias de enzimas protectoras antioxidantes cuyas reacciones de reducción-oxidación

("redox") convierten los radicales libres dañinos en moléculas menos reactivas (Herken, et al. 2001). Entre estas familias enzimáticas se encuentran la catalasa, la superóxido dismutasa, las tioredoxinas y enzimas que utilizan glutatión como cofactor (glutatión peroxidasa y glutatión transferasa). La desregulación o alteración de estos sistemas protectores contribuye a un número creciente de enfermedades en las que se origina el estrés oxidante y la inflamación, incluidos trastornos neurodegenerativos como la demencia, la esclerosis lateral amiotrófica, y alteraciones relacionadas con el envejecimiento (Haigis, et al. 2010; Von Bernhardt y Eugenin, 2012). Los procesos inflamatorios están estrechamente ligados al estrés oxidante. El sistema inmunológico genera grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para combatir las enfermedades infecciosas, provocando inflamación, en parte a través de las citocinas liberadas por las células inmunes y la microglía. La NADPH oxidasa, por ejemplo, genera superóxido para acabar con microorganismos infecciosos, pero a costa del daño al tejido adyacente (Quinn et al., 2006). Por otra parte, el desarrollo temprano y la adolescencia son fases muy dinámicas del desarrollo cerebral que pueden ser propensas a disfunciones que aumentan el riesgo de desarrollar esquizofrenia (Crews et al. 2007; Goldman-Rakic y Selemon, 1997). La mielinización, la poda de las sinapsis de glutamato y la maduración de las interneuronas son procesos dinámicos de este período (figura 1).

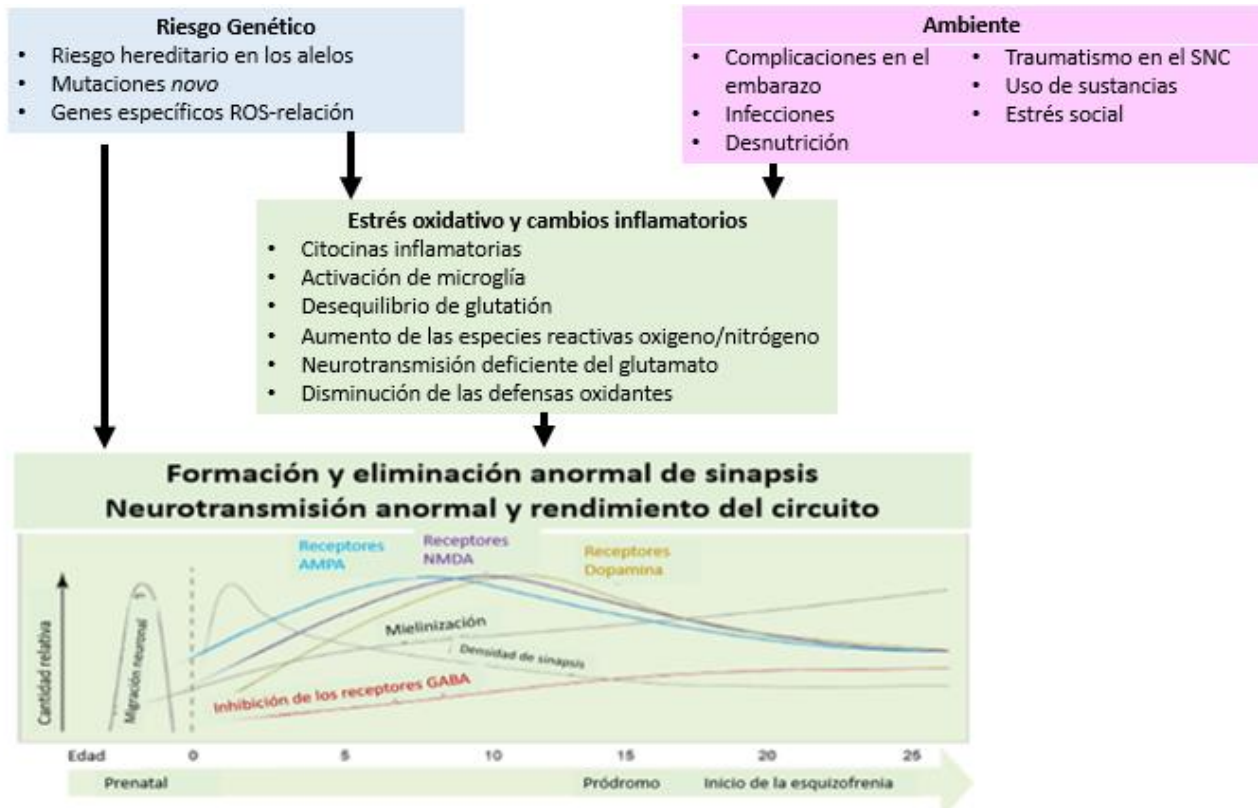


Figura 1. La homeostasis redox une los factores de riesgo de la esquizofrenia con las anomalías cerebrales en la esquizofrenia (Koga et al. 2016).

Los estudios sobre la etiología y fisiopatología de la esquizofrenia han implicado amplias alteraciones de diversos neurotransmisores, tipos de células, regiones del cerebro y asociaciones epidemiológicas. Las principales líneas de investigación buscan integrar la participación genética, las anomalías del neurodesarrollo, la función de sinapsis aberrante y los factores ambientales como las infecciones neonatales y el uso de sustancias, sin embargo, la forma en que estos distintos factores se unen en la neurobiología de la esquizofrenia es en gran parte desconocida. Existe amplia evidencia en la cual el estrés oxidante y su interrelación con la inflamación pueden ser varios mecanismos involucrados

en las alteraciones funcionales que se observan en este padecimiento, ya que gran evidencia demuestra aumento del estrés oxidante en la esquizofrenia, incluso en sujetos que nunca habían sido tratados con medicamentos antipsicóticos (Emiliani et al. 2014).

La evidencia también sugiere que muchos factores de riesgo genéticos y ambientales de la esquizofrenia están asociados con el estrés oxidante y la inflamación, y describen cómo estos pueden afectar negativamente los procesos neuromoduladores y del desarrollo neurológico relevantes para la neurobiología de la esquizofrenia (Coyle, 2006).

2.3.2. Relación de la esquizofrenia con el estrés oxidante y la inflamación

Las influencias ambientales se han implicado durante mucho tiempo como factores de riesgo de esquizofrenia, ya que los gemelos idénticos tienen una tasa de concordancia del 50% para la esquizofrenia y los familiares de primer grado tienen un riesgo de 5 a 10%. Los riesgos ambientales importantes incluyen complicaciones prenatales y durante el parto como hipoxia, infecciones neonatales, abuso de drogas y enfermedades autoinmunes (Brown, 2011). Al inducir el estrés metabólico celular estos factores, parecen aumentar la posibilidad de oxidación, estrés y daño (Mahadik, et al, 2006; Ranjekar, et al, 2003).

El estrés oxidante, especialmente durante las etapas sensibles del desarrollo cerebral, puede tener un impacto adverso en los circuitos cerebrales relevantes para el desarrollo de la esquizofrenia (Fig. 1). Las citocinas inflamatorias sintetizadas durante una respuesta inflamatoria infecciosa, como el TNF-alfa y la interleucina-1 (IL-1) utilizan NADPH oxidasa

para generar ROS, activar factores de transcripción inflamatorios como NF- κ B y producir daño celular (Ramana y Srivastava, 2010). Las citocinas inflamatorias parecen estar reguladas positivamente en los cerebros con esquizofrenia post mortem (Saetre et al., 2007). Por otra parte, la microglía activada también puede liberar glutamato y ácido quinolínico en cantidades suficientes para producir excitotoxicidad y muerte celular, lo que lleva a un daño celular crónico (Smithy Maes, 1995, Bokovi, et al, 2011). Así mismo, se reconoce cada vez más que el estrés psicosocial favorece un estado de estrés oxidante y de inflamación persistente, esto se ha demostrado en crías de rata socialmente aisladas las cuales desarrollan déficits en la memoria de reconocimiento, alteraciones en el comportamiento social y aumento en las citocinas proinflamatorias (Moller et al., 2013). Se ha propuesto que estos efectos podrían revertirse con el medicamento antipsicótico CLZ y el antioxidante N-acetilcisteína (NAC), cuyos efectos son más eficaces cuando se administran de forma combinada (Moller et al., 2013). En un estudio realizado con ratones deficientes en receptores NMDA en neuronas GABAérgicas (modelo de disfunción glutamatérgica relevante para la esquizofrenia), el aislamiento social condujo a un aumento de ROS y anomalías del comportamiento (Jiang et al., 2013). Con base en esta evidencia se ha probado el uso de apocinina, un fármaco con capacidad de neutralizar los ROS, los resultados mostraron mejorar los fenotipos de comportamiento. Por otra parte, el abuso de sustancias también se ha implicado como un factor de riesgo de esquizofrenia (Archer, 2011). Por otra parte, la ketamina también ha sido probada para demostrar la asociación entre la esquizofrenia y la producción de ROS, este fármaco es un antagonista del receptor de glutamato NMDA el cual es usada como modelos para reproducir los síntomas psicóticos,

los hallazgos han demostrado un incremento de las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno como parte de su mecanismo de acción (Fantin et al., 2007; Fejgin et al., 2008; Zuo et al., 2007). Por otro lado, es interesante saber que otras sustancias también están involucradas con aumento en el estrés oxidante, es el caso de la vitamina D. En un estudio en niños obesos de 7 a 14 años, los niveles más bajos de vitamina D se asociaron con un aumento de los marcadores de estrés oxidante (Codoner-Franch et al., 2012). Finalmente, las enfermedades infecciosas también han sido motivo de estudio como factor de riesgo para el desarrollo de la esquizofrenia ya que algunos reportes mencionan que se han identificado niveles elevados de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en muestras obtenidas de individuos con un primer episodio de esquizofrenia (Yolken et al., 2009). Los hijos de madres con altos títulos de anticuerpos contra el virus del herpes simple 2 también tenían un mayor riesgo de psicosis (Buka et al., 2001). Los residentes de Greater Helsinki, Finlandia, cuyas madres estuvieron expuestas a la epidemia de influenza de 1957, tenían un riesgo significativamente elevado de desarrollar esquizofrenia (Mednick et al., 1988). La asociación de la influenza materna también se ha observado en poblaciones de Inglaterra, Gales (O'Callaghan et al., 1991). Las personas con enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjogren, la enfermedad celíaca, la iridociclitis, la hepatitis autoinmune y la esclerosis múltiple tienen una mayor prevalencia de esquizofrenia (Benros et al., 2012; Eaton et al., 2006).

Se han identificado un aumento del estrés oxidante en sujetos con esquizofrenia; en estos estudios se cuantifican los radicales libres, el daño oxidativo a los componentes celulares o

los niveles de enzimas y cofactores antioxidantes protectores. Una variedad de muestras de pacientes, que incluyen sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), en el cerebro post mortem y espectroscopia de resonancia magnética en sujetos humanos vivos con y sin medicamentos (Koga, et al., 2016).

2.3.3. Marcadores de estado antioxidante y daño oxidativo

Un enfoque importante para caracterizar el estrés oxidante es medir directamente los subproductos que siguen al daño por radicales libres a componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN. El cerebro está especialmente enriquecido en lípidos, que representan el 40, 60 y 80% del peso seco de la sustancia gris, la sustancia blanca y la mielina (O'Brien y Sampson, 1965). Se ha identificado el aumento de los productos de la oxidación de lípidos como el malonaldehído así como de los isoprostanos (subproductos de la oxidación del ácido araquidónico) en pacientes con esquizofrenia, tanto en muestras de suero/plasma, plaquetas, eritrocitos así como en muestras de orina de pacientes con esquizofrenia (Dietrich-Muszalska y Olas, 2009). También se han identificado aumento en los productos de oxidación de lípidos, pentano (Phillips et al., 1993) y etano (Puri et al., 2008), en muestras respiratorias de pacientes. En los productos de sustancias reactivas tiobarbitúicas (TBARS) y los carbonilos de proteína se elevaron de manera similar en pacientes más jóvenes con esquizofrenia y pacientes con enfermedad de larga duración (Pedrini et al., 2012).

2.3.4. Sistema de glutatión

El glutatión es el principal antioxidante celular, su síntesis y metabolismo se rigen por el ciclo gamma-glutamilo (Meister y Anderson, 1983). Se han identificado niveles más bajos de glutatión en la esquizofrenia, incluyendo disminuciones del 40% en el núcleo caudado post mórtem (Yao et al., 2006) y 40% en la corteza prefrontal post mórtem (Saetre et al., 2007). Es importante mencionar que la gamma-glutamil cisteína ligasa (GCL) es la enzima limitante de la producción de glutatión y está compuesto de catalizadores (GCLC) y subunidades modificadoras (GCLM), cada una de las cuales ha sido investigada como un factor de riesgo genético potencial para el desarrollo de la esquizofrenia (Freedman,2003). En una población caucásica, los polimorfismos de repetición 5 ' UTR de GCLC se asociaron con la esquizofrenia y niveles reducidos de GCL y glutatión (Gysin et al., 2007). Los niveles de expresión del gen GCLM disminuyeron en los fibroblastos de pacientes con esquizofrenia que portaban el alelo de riesgo en una población danesa (Gysin,2007). Los autores sugieren que la actividad de GCL disminuyó debido a los polimorfismos, lo que provocó una disminución de los niveles de glutatión. Dado que el glutatión participa en el metabolismo de los fármacos, se han realizado importantes estudios confirmatorios en sujetos con esquizofrenia sin tratamiento previo, identificando disminuciones de glutatión del 18 al 26% en los eritrocitos (Mico et al., 2011) y del 28% en el plasma (Raffa et al., 2009). Es importante señalar que los niveles más bajos de glutatión también se correlacionaron con puntuaciones con la escala de síntomas positivos y negativos (PANSS) más altas (peores calificaciones) (Tsai et al., 2013) y un peor funcionamiento comunitario (Ballesteros et al., 2013). Así mismo, la espectroscopia de resonancia magnética se ha utilizado para cuantificar los

niveles de glutatión cerebral *in vivo* en sujetos con esquizofrenia sin tratamiento previo, los niveles de glutatión disminuyeron en un 52% en la corteza prefrontal y en un 27% en el LCR (Rae, 2014; Do et al., 2000). En circunstancias normales, los niveles intracelulares de glutatión suelen exceder los niveles extracelulares en 1000 veces, y esto debe tenerse en cuenta al interpretar las mediciones de plasma y LCR. Se encontró una correlación inversa entre los síntomas negativos de la esquizofrenia y los niveles de glutatión en la corteza frontal medial posterior; es decir, los niveles más bajos de glutatión se asociaron con un mayor grado de síntomas negativos (Matsuzawa y Hashimoto, 2011). Sin embargo, este grupo no pudo encontrar una asociación general entre los niveles de glutatión y la esquizofrenia, como fue el caso de un estudio independiente del glutatión en la corteza cingulada anterior (Terpstra et al., 2005). Como la espectroscopia de resonancia magnética solo puede medir áreas pequeñas, estudios adicionales que comparen diferentes estructuras cerebrales, y de manera óptima, se justifican en sujetos sin tratamiento previo. Por otra parte, el estudio de las glutatión peroxidasas también han sido motivo de estudio, son una importante familia de enzimas antioxidantes multigénicas que utiliza glutatión para convertir el peróxido de hidrógeno en agua (Gysin et al., 2007). Múltiples investigadores han examinado los niveles de glutatión peroxidasa en eritrocitos y plasma de sujetos con esquizofrenia, y varios estudios han encontrado niveles disminuidos (Padurariu et al., 2010; Yao et al., 2006; Zhang et al., 2006). La actividad de la glutatión peroxidasa disminuyó en los pacientes con esquizofrenia no medicados en comparación con los controles (Raffa et al., 2009).

2.3.5. Catalasa

La catalasa es una enzima que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta enzima también ha sido motivo de estudio en pacientes con esquizofrenia, los hallazgos han mostrado menores niveles de catalasa en los eritrocitos de los sujetos con esquizofrenia crónica (Ben Othmen et al., 2008), así como en los casos no medicados de aparición reciente (Raffa et al., 2011). Otros estudios muestran un aumento de la catalasa en los eritrocitos (Herken et al., 2001) y niveles sin cambios en los neutrófilos y el plasma (Miljevic et al., 2010), lo que sugiere que los eritrocitos del paciente tienen más probabilidades de mostrar disminuciones, aunque la razón de esto sigue sin estar clara.

2.3.6. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima neuroprotectora que convierte el radical superóxido (O_2^-) en el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Existen tres formas principales de SOD (Fukai y Ushio-Fukai, 2011). La SOD_1 soluble (es decir, la SOD citosólica), la SOD_2 (manganeso-SOD) está localizada en las mitocondrias y una forma extracelular, SOD_3 , que es la forma más abundante, especialmente en los tejidos periféricos. Diversos estudios han evaluado los niveles de proteínas y la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) en sujetos con esquizofrenia; sin embargo, los resultados han sido contradictorios. Un número aproximadamente similar de estudios encuentra niveles disminuidos o aumentados de SOD o de la función enzimática en eritrocitos, neutrófilos y plasma de sujetos con esquizofrenia, por lo que se ha sugerido que se deben realizar estudios longitudinales para determinar si las enzimas antioxidantes se inducen o suprimen en

diferentes etapas de la enfermedad, además consideran que es importante incluir sujetos sin medicación. En un estudio en eritrocitos de 36 pacientes con esquizofrenia de aparición reciente y sin tratamiento previo se observó una disminución significativa de los niveles de SOD en comparación con los controles (Raffa et al., 2011). En LCR de sujetos con esquizofrenia de aparición reciente también se observaron niveles significativamente reducidos de superóxido dismutasa-1 soluble (SOD1) en comparación con muestras de controles sanos de la misma edad (Coughlin et al., 2013). Las moléculas de unión al hierro, ferritina y transferrina, también disminuyeron significativamente en el LCR de la esquizofrenia. El hierro también tiene especial relevancia en la biología de los radicales libres, ya que el hierro libre cataliza la reacción de Fenton, que genera radicales hidroxilo altamente tóxicos a partir del peróxido de hidrógeno. En un estudio de 12 meses de seguimiento se examinó la SOD y muchos otros parámetros (Ruiz-Litago et al., 2012) en 49 sujetos con primer episodio psicótico al mes y 6 meses después del primer episodio, los niveles de SOD, glutatión y antioxidante totales disminuyeron aún más, luego se recuperaron a los 12 meses mientras que los productos de la lipoperoxidación aumentaron y posteriormente disminuyeron. La catalasa tuvo una disminución inicial al mes, pero se recuperó a los 6 y 12 meses. Curiosamente, el glutatión peroxidasa disminuyó sin recuperación. Desafortunadamente en este estudio, no participó ningún sujeto de control.

2.3.7. Óxido nítrico

El radical libre, óxido nítrico (NO), puede actuar como neurotransmisor y modular muchos procesos, incluida la proliferación neuronal, la migración, el cono axonal, la sinaptogénesis, la plasticidad sináptica y la formación de circuitos neurales (Contestabile, 2000; Gallo e Iadecola, 2011). El óxido nítrico es sintetizado por la sintasa de óxido nítrico (NOS) a partir del aminoácido arginina, incluso después de la activación de los receptores NMDA glutamatérgicos. La NOS y el ligando PDZ carboxilo terminal de la sintasa de óxido nítrico neuronal (CAPON), han surgido como genes candidatos de susceptibilidad a la esquizofrenia (Brzustowicz et al., 2004; Zoubovsky et al., 2011). Varios estudios han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de NOS neuronal (nNOS o NOS₁) asociados con el riesgo de esquizofrenia (Fallin et al., 2005; Tang et al., 2008). Se ha descrito que, los niveles disminuidos de NOS pueden contribuir a la formación de circuitos anormales en los trastornos neuropsiquiátricos (Kwan et al., 2012). Además de la asociación genética de NOS y esquizofrenia, también se han evaluado en pacientes los niveles de NOS y metabolitos de NO, nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻), los reportes muestran disminuciones en las moléculas relacionadas con el NO en la esquizofrenia. Se observó una disminución de la expresión de NOS₁ en el hipotálamo post mortem (Bernstein et al., 2005). Otros reportes no observan cambios en la expresión de NOS₁ y NOS₃ en la corteza prefrontal, aunque hubo una disminución general en la actividad de NOS (Xing et al., 2002). Se ha reportado disminución de NO en plasma (Nakano et al., 2010) y neutrófilos (Srivastava et al., 2001), mientras que se encontraron niveles disminuidos de NO₂⁻ y NO₃⁻ en el LCR en los pacientes (Ramirez et al., 2004) y plasma (Suzuki et al., 2003). La disminución de los niveles plasmáticos de NO y

metabolitos de NO se asoció con la esquizofrenia en un estudio de 30 sujetos con esquizofrenia y 30 controles. Los niveles más bajos se asociaron con síntomas negativos de esquizofrenia y aumentaron después del tratamiento con el medicamento antipsicótico, risperidona (Nakano et al., 2010). Por el contrario, se han detectado niveles aumentados de expresión de NOS en la corteza prefrontal post mortem (Baba et al., 2004) y el vermis cerebeloso de sujetos con esquizofrenia (Karson et al., 1996). El nivel de actividad de la NOS aumentó en las plaquetas de los pacientes (Das et al., 1995). Los sujetos con esquizofrenia tenían un mayor daño por estrés nitrosativo en las proteínas plasmáticas (Dietrich-Muszalska y Olan, 2009). El papel del NO periférico y sus metabolitos es incierto. Por ejemplo, no está claro si el NO periférico tiene algún impacto en las vías cerebrales relevantes para la esquizofrenia, especialmente teniendo en cuenta su breve vida media, típicamente de 2 a 5 segundos. Alternativamente, se podría suponer que cualquier desequilibrio de NO en la esquizofrenia sería de naturaleza sistémica y no necesariamente restringido al cerebro. A pesar de la cantidad de informes genéticos y bioquímicos que relacionan el NO con la esquizofrenia, queda mucho por aclarar sobre su participación.

2.3.8. Otros metabolitos

En plasma de paciente con esquizofrenia se han evaluado múltiples moléculas antioxidantes como vitamina C, vitamina E, bilirrubina, albúmina y ácido úrico, y en la mayoría de los reportes se observa que se encuentran disminuidas. La bilirrubina, en concentraciones fisiológicas, es el antioxidante lipídico más potente que se conoce (Sedlak y Snyder, 2004). La disminución de los niveles de bilirrubina se ha relacionado con la esquizofrenia, incluidos

los sujetos que no habían recibido medicación previa (Vitek et al., 2010). También se han reportado aumentos en las biopirinas, un subproducto de la bilirrubina oxidada (Yasukawa et al., 2007). Asimismo, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) pueden proteger contra el estrés oxidante, a ese respecto diversos grupos han reportado una disminución del DHA en los eritrocitos de pacientes con esquizofrenia (Peet et al., 2004). Por otra parte, el zinc es un cofactor catalítico y estructural esencial para muchas enzimas y otras proteínas. Si bien no tiene actividad redox directa, en condiciones fisiológicas la deficiencia de zinc se asocia con daño oxidativo del ADN, las proteínas y los lípidos (Eide, 2011). Un estudio se encontraron niveles de zinc significativamente disminuidos en el plasma de 56 sujetos con esquizofrenia sin tratamiento previo (Nechifor et al., 2004). Un metaanálisis evaluó TBARS, óxido nítrico, catalasa, glutatión peroxidasa y SOD en la esquizofrenia. La evidencia, mostró un aumento significativo de TBARS y óxido nítrico, con disminuciones en la SOD en la esquizofrenia (Zhang et al., 2013). Un metaanálisis de 44 estudios examinó la relación de los marcadores de estrés oxidante con el primer episodio y la esquizofrenia establecida (Flatow et al., 2013). Los parámetros evaluados fueron el estado antioxidante total en plasma / suero, a través de la cantidad de malonaldehído, TBARS, nitrito, ácido úrico y niveles de las enzimas SOD, glutatión peroxidasa y catalasa en los glóbulos rojos. El hallazgo más destacado fue que en el estado antioxidante total (TAS), la catalasa de glóbulos rojos y el nitrito plasmático disminuyeron en el primer episodio de psicosis, pero aumentaron significativamente más tarde en la enfermedad. La superóxido dismutasa de glóbulos rojos

fue baja en el primer episodio de psicosis, en pacientes hospitalizados con recaída aguda y en pacientes ambulatorios estables.

2.3.9. Inflamación y Esquizofrenia

Se han asociado un proceso inflamatorio con la fisiopatología de la esquizofrenia, se ha propuesto que un “desafío” inmune prenatal durante el segundo trimestre de la gestación puede ser clave para el desarrollo de la esquizofrenia, se sugiere que una respuesta inmune alterada de la madre ante una infección persistente y crónica, puede relacionarse con un incremento en el riesgo de padecer la enfermedad al nacimiento. (Meyer U, 2011). Se considera que para el desarrollo de la esquizofrenia se encuentran involucrados el sistema nervioso, el sistema inmune y el sistema vascular. Asimismo, se ha propuesto que algunas de las psicosis que aparecen en este trastorno son el resultado del daño al sistema microvascular cerebral, iniciado por la presencia de procesos inflamatorios determinados por los genes que se expresan en presencia de factores del medio ambiente y que, a su vez, disparan las respuestas inflamatorias (Hanson, 2005). Se ha observado una irrigación sanguínea alterada en pacientes con esquizofrenia, donde es particularmente relevante el grado de alteración en el sistema microvascular en el Sistema Nervioso Central (SNC), con una marcada reducción en la perfusión cerebral anterior, denominada hipofrontalidad en la esquizofrenia. El decremento en el flujo sanguíneo frontal está asociado con la aparición de síntomas negativos. Además de las anomalías en el flujo sanguíneo en la corteza frontal, un flujo alterado en la corteza cingulada, en el tálamo, ganglios basales, la corteza parietal y el cerebelo se ha observado (Kekin, 2018). Por otra parte, incremento en los

niveles maternos de IL-8 se ha demostrado durante el segundo y tercer trimestre de la gestación, el cual se asocia con un riesgo elevado de padecer esquizofrenia. La exposición fetal a IL-8 da como resultado un aumento en el volumen de LCR ventricular, además, una asociación importante entre la IL-8 materna y la disminución del volumen de la corteza entorrinal izquierda y la corteza cingulada posterior derecha se ha observado en el caudado derecho y en el giro temporal superior derecho de algunos pacientes con esquizofrenia. (Ellman, 2010.) Las citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1beta e IL-6) juegan un papel clave en procesos de modulación de funciones del sistema nervioso, relacionadas con alteraciones afectivas, emocionales y sociales en sujetos con esquizofrenia (Meyer, 2011), por ejemplo, la administración de moléculas capaces de inducir la liberación de este tipo de citocinas induce un comportamiento de tipo anhedónico, además de alteraciones sociales en modelos animales; este tipo de alteraciones se encuentran ligadas a los síntomas negativos de esquizofrenia. Por otro lado, la inflamación periférica que incrementa la liberación de IL-6, ha sido asociada a la aparición de síntomas negativos, como deficiencias en la atención sostenida y retraso psicomotor (Müller, 2013). La respuesta inflamatoria periférica en individuos afectados con esquizofrenia se hace evidente por la presencia de factores proinflamatorios específicos en suero y plasma, entre los que se incluyen la prostaglandina-E₂ (PGE₂), la proteína C reactiva (PCR) y las citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 e IL-8). Recientemente se han identificado cambios funcionales en la actividad inflamatoria mediada por células Th1 en pacientes con esquizofrenia (Maes, 2002). La activación de los sistemas de respuesta inflamatoria en la esquizofrenia es capaz de alterar procesos cognitivos; existe una correlación positiva entre la severidad del déficit

cognoscitivo y la respuesta inflamatoria (Krysta K, 2019). Además de que las citocinas proinflamatorias pueden alterar procesos de plasticidad sináptica, los cuales proveen el sustrato neuronal clave para múltiples aspectos del aprendizaje y la memoria. (Schmitz, 2008. Smyt, 2013). Un mecanismo neuronal que se asocia con las citocinas proinflamatorias y que puede afectar las funciones cognoscitivas se relaciona con la vía de las kinureninas; un desbalance en la liberación local de citocinas por células de la microglía, aunado a un aumento en la función de los astrocitos, puede resultar en la expresión alterada y/o en la activación de enzimas catalíticas involucradas en esta vía; lo cual a su vez resulta en una producción no controlada de ácido kinurénico (KYNA, por sus siglas en inglés), el KYNA es un potente antagonista de receptores NMDA, actúa sobre el sitio de glicina del receptor y se ha asociado con una señalización glutamatérgica alterada por receptores NMDA en sujetos con esquizofrenia (Erhardt, 2017). Por otro lado, las citocinas juegan un papel importante en la aparición de síntomas psicóticos positivos en sujetos con esquizofrenia, en este contexto es de especial interés el papel de las citocinas proinflamatorias sobre la síntesis y liberación de Dopamina y de noradrenalina (Smyth, 2013).

2.3.10. Neurotransmisores y esquizofrenia

2.3.10.1. Dopamina

Todos los fármacos antipsicóticos que se utilizan en la actualidad bloquean los receptores dopamina (DA) en dosis clínicamente eficaces (Kapur, 2001). Además, los fármacos que inducen la liberación de DA o aumentan la transmisión de DA, como las anfetaminas y la L-DOPA, exacerbarán la psicosis en pacientes con esquizofrenia y pueden inducir síntomas

similares a la esquizofrenia en individuos control si se administran repetidamente o en dosis altas (Janowsky, 1973. Angrist, 1974). Los estudios de imagen muestran que la liberación de DA inducida por anfetaminas aumenta en el cuerpo estriado asociativo de los pacientes con esquizofrenia en comparación con los controles; además, la amplitud de este aumento se correlaciona con el empeoramiento de los síntomas psicóticos de la esquizofrenia (alucinaciones y delirios) (Laruelle, 1999). No obstante, hay poca evidencia de disfunción dentro del propio sistema DA en individuos con esquizofrenia (Grace, 2012) y el foco de muchas investigaciones se ha vuelto en cambio hacia la desregulación del sistema DA por estructuras aferentes; se ha propuesto que, en la esquizofrenia el hipocampo parece ser hiperactivo, posiblemente debido a la atenuación de la función de las interneuronas inhibitoras y como resultado, el sistema de dopamina pasa a un estado de respuesta excesiva (Bahena, 2000). Así mismo, se ha prestado especial atención al papel de la DA en las neuronas de la vía mesolímbica del cerebro, la DA ha sido implicada en estudios sobre neurotransmisores y su relación con la esquizofrenia. Se ha demostrado, además, que las drogas psicotrópicas, como la cocaína y las anfetaminas, provocan la liberación de DA y suelen exacerbar los síntomas psicóticos de la enfermedad. La hipótesis “dopaminérgica de la esquizofrenia” propone que el exceso de activación de los receptores dopaminérgicos D2 es la causa de los síntomas positivos de la esquizofrenia. (Takano, 2018. Sarkar, 2010)

2.3.10.2 Serotonina

La hipótesis de la esquizofrenia de la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) se basa en los primeros estudios de interacciones entre el fármaco alucinógeno dietilamida del ácido lisérgico (LSD) y la 5-HT (Aghajanian, 2000). Las observaciones de los efectos psicogénicos del LSD y de los efectos antipsicóticos de los antagonistas de la serotonina-dopamina, como la clozapina y la risperidona, han aumentado el interés en la interacción entre estos dos sistemas de neurotransmisores como posible objetivo fisiopatológico en la esquizofrenia (Aghajanian, 2000). Los antagonistas de la serotonina tienen menos efectos extrapiramidales de los antipsicóticos. Sin embargo, todavía no se dispone de pruebas directas de disfunción serotoninérgica en la patogenia de la esquizofrenia; Los receptores de serotonina específicos continúan siendo un foco de interés (particularmente 5HT-3 y 5HT-6) en la esquizofrenia (Abi-Dargham, 2007). Así mismo, los medicamentos de nueva generación denominados antipsicóticos atípicos, como la clozapina, pueden ser igualmente eficaces que los antipsicóticos típicos. Los antipsicóticos atípicos tienen la capacidad de afectar la función de la serotonina (5-HT) y, probablemente, tienen un menor efecto en el bloqueo de DA. Esto ha llevado a plantear la “hipótesis serotoninérgica de la esquizofrenia”, que hace referencia a las alteraciones en la función de la 5-HT durante el desarrollo del SNC; la activación de la corteza prefrontal por medio de un receptor 5-HT2A alterado o bien por una interacción aberrante alterada entre DA y 5-HT. (Takano, 2018).

2.3.10.3. Glutamato

La disfunción glutamatérgica es capaz de contribuir con la patogénesis de la esquizofrenia (Merritt, 2013). La administración de fenciclidina o ketamina (antagonistas del complejo receptor de N-metil-D-aspartato-glutamato NMDA a individuos sanos semeja los síntomas y los problemas cognoscitivos de la esquizofrenia (Takano, 2018). La información generada ha conducido a proponer la “hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia”, en la cual se propone que el uso de antagonistas del NMDA puede agravar la aparición de síntomas positivos, negativos y de alteraciones cognoscitivas en pacientes con esquizofrenia (Merritt, 2013). El incremento de neurotransmisión glutamatérgica en la corteza cingulada anterior en la esquizofrenia es consistente con la hipótesis de la disminución de la función del receptor NMDA. Esta hipótesis postula que un mecanismo a través del cual se incrementa la liberación de glutamato (Glu) puede producir la disfunción de receptores de NMDA en interneuronas GABAérgicas, lo que conduce a una desinhibición de neuronas piramidales glutamatérgicas y a la liberación de Glu. (White, 2014).

2.3.10.4. Acetilcolina

Una proporción significativa de pacientes con esquizofrenia son fumadores empedernidos. La alta tasa y el alto nivel de tabaquismo observado en esta población pueden estar relacionados con la enfermedad o su tratamiento (Dalack, 1999). Los estudios han sugerido el efecto de la actividad muscarínica cerebral alterada en pacientes esquizofrénicos (Tandon, 1999. Raedler, 2007). Se ha reportado, que los pacientes con esquizofrenia han informado que fuman para conseguir un estado de sedación para reducir los síntomas

negativos y contrarrestar los efectos secundarios de los medicamentos (Brunzell, 2012. Forchuk, C, et al. 2002). Estas observaciones pueden reflejar los esfuerzos de los pacientes para superar el déficit de receptores colinérgicos nicotínicos. Asimismo, se sabe que los pacientes con esquizofrenia tienen una inhibición deficiente de las respuestas evocadas por P50 a los estímulos auditivos repetidos, lo que puede reflejar una alteración de la compuerta sensorial. Sin embargo, el efecto del tabaquismo para revertir la disminución de la compuerta sensorial auditiva en la esquizofrenia puede atenuarse debido a la desensibilización del receptor de nicotina. Esta observación se ha asociado con el locus del cromosoma 15q14 del gen del receptor nicotínico α -7 (Freedman R, 2003) y ha motivado a realizar estudios sobre agentes promuscarínicos, como agonistas nicotínicos α -7, en el tratamiento de ciertos síntomas de la esquizofrenia (Olincy, A, 2007). Por tanto, el proceso inhibitorio mediado por receptores colinérgicos nicotínicos puede representar un blanco terapéutico y un tratamiento potencial en la esquizofrenia.

2.3.10.5. Ácido gamma-aminobutírico (GABA)

El GABA también ha sido motivo de estudio por su relación con la fisiopatología de la esquizofrenia. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC y diversos estudios han sugerido su participación en diversas funciones alteradas (incluidas las interacciones GABA-dopamina) en la esquizofrenia (Benes, 2015. Garbutt, 1983). Las interneuronas GABA son fundamentales en las redes generadoras de ritmo del cerebro, y la sincronía de las oscilaciones neuronales es un mecanismo fundamental para la memoria, la percepción y la conciencia (Uhlhaas, 2010). Las alteraciones en la función GABAérgica pueden ser la base

de alteraciones en la sincronía neural (Uhlhaas, 2010), oscilaciones gamma anormales (Cardin, 2009) y alteraciones de la memoria de trabajo, que se observan en la esquizofrenia (Lewis DA, 2006). En estudios clínicos, se ha demostrado que los agonistas adyuvantes de GABA son eficaces para mejorar los síntomas centrales de la esquizofrenia (Wassef, 2003). Finalmente se ha reportado una reducción en la expresión de la enzima glutamato decarboxilasa 67 (GAD-67) (enzima que sintetiza el GABA a partir del aminoácido glutamato) dando como resultado una reducción en las concentraciones del GABA en pacientes con esquizofrenia (Benes, 2015. Garbutt, 1983). A pesar de las evidencias aún no está claro cómo interactúa el GABA con otros sistemas de neurotransmisores y se requieren más estudios para dilucidar el papel terapéutico potencial del GABA en el tratamiento de la esquizofrenia.

2.4. Tratamientos

Tomando en cuenta que la esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica compleja que resulta de factores tanto genéticos como ambientales. Numerosos estudios sobre la patogenia de esta enfermedad se centran en las vías de los neurotransmisores en el SNC, que incluyen principalmente dopamina, glutamato y serotonina. El concepto más importante de esquizofrenia es la hipótesis dopaminérgica, acompañada de la hipótesis glutamatérgica.

Los agentes antipsicóticos para tratar la esquizofrenia pueden dividirse generalmente en primera, segunda y tercera generación, según su mecanismo de acción. Aunque los

antipsicóticos clásicos tienen un perfil de receptor complejo, su efecto terapéutico surge del bloqueo principalmente del receptor D2 de dopamina (Stępnicki, 2018). Por tanto, en el caso de la esquizofrenia, el término "compuestos de múltiples objetivos" se refiere a los antipsicóticos que pertenecen a la segunda y tercera generación, ya que su eficacia para aliviar los síntomas de la esquizofrenia se debe no sólo a la afinidad por la dopamina sino también por los receptores de serotonina (Roth, 2004). El receptor de dopamina D₂ sigue siendo el objetivo principal de los antipsicóticos de última generación, pero también otros receptores de dopamina, principalmente D₃, y los receptores de serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{1A} son de gran interés, sin embargo, en el proceso de diseño de nuevos antipsicóticos multi-objetivo los receptores 5-HT_{2C}, H₁ o M₁, también deben tomarse en cuenta. El amplio grupo de antipsicóticos de primera generación se puede dividir en varias clases de acuerdo con las estructuras químicas de sus representantes. Los grupos más importantes son las fenotiazinas (por ejemplo, clorpromazina, promazina, triflupromazina), butirofenonas (por ejemplo, haloperidol, droperidol, benperidol) y tioxantenos (por ejemplo, clopentixol, flupentixol) (Chokhawala, 2020). Estos medicamentos regulan a un amplio espectro de receptores, provocando numerosos efectos adversos. Los más frecuentes, resultantes del bloqueo de los receptores de dopamina D₂ nigroestriatal, son los efectos extrapiramidales, como movimientos no deseados, discinesia, acatisia (incapacidad para mantenerse quieto), distonías. El antagonismo de este receptor en el circuito tuberoinfundibular conduce a su vez a una liberación excesiva de prolactina. El perfil antihistamínico de los antipsicóticos de primera generación produce sedación, mientras que el bloqueo de los receptores adrenérgicos α_1 puede provocar hipotensión (Ritter,

2019.). Los antipsicóticos de primera generación todavía se utilizan con frecuencia y su eficacia para reducir los síntomas positivos a menudo resulta ser suficiente para el tratamiento de la esquizofrenia (Lieberman, 2005). Sin embargo, cuando la enfermedad se manifiesta por la aparición de síntomas negativos y cognitivos, esta generación de fármacos fracasa. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos que pudieran hacer frente a todo el espectro de síntomas de la enfermedad (Kondej, 2018. Roth, 2004). La introducción de la clozapina, primer medicamento de los antipsicóticos de segunda generación, inició una nueva era en el tratamiento de la esquizofrenia (Crilly, 2007). El mecanismo de acción de este grupo de fármacos se basa principalmente en el antagonismo en el receptor de serotonina 5-HT_{2A}. El bloqueo del receptor de dopamina D₂ es más débil en comparación con el receptor 5-HT_{2A} y también en comparación con el bloqueo de este receptor con antipsicóticos de primera generación. El perfil de acción de múltiples receptores de los antipsicóticos de segunda generación puede contribuir a reducir los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la enfermedad (Solmi, 2017). Además, una menor afinidad por el receptor D₂ da como resultado una menor probabilidad de efectos secundarios extrapiramidales (EPS), que constituye el principal inconveniente de los antipsicóticos de primera generación (Divac, 2014). Además de la clozapina, los antipsicóticos de segunda generación comprenden fármacos como: quetiapina, olanzapina, risperidona, paliperidona, ziprasidona, asenapina y lumateperona. Este grupo de antipsicóticos generalmente se tolera mejor que los fármacos más antiguos, pero también puede provocar efectos secundarios graves, principalmente efectos metabólicos, como obesidad o diabetes (Solmi, 2017). Los medicamentos de tercera generación (aripiprazol,

brexpiprazol y cariprazina) se distinguen entre los antipsicóticos debido a su mecanismo de acción, que no está relacionado con el antagonismo de los receptores de dopamina D₂, sino con un agonismo parcial en este receptor (Limandri, 2019). Estos antipsicóticos a menudo se describen como "estabilizadores de dopamina". De hecho, pueden actuar como agonistas totales o parciales, o como antagonistas del receptor D₂, según el nivel de dopamina extracelular (Lieberman, 2004). También son agonistas parciales del receptor 5-HT_{1A}, lo que resulta funcionalmente en el bloqueo de este receptor. Otros receptores afectados por los antipsicóticos de tercera generación son los receptores D₃, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇ (Mailman, 2010). Además de la esquizofrenia, son aplicables en la depresión mayor, el trastorno bipolar y el trastorno obsesivo-compulsivo (Tamminga, 2002. Frampto, 2019). La principal ventaja de los antipsicóticos de tercera generación sobre la primera generación es la baja probabilidad de causar efectos secundarios extrapiramidales, excepto acatisia, que es más frecuente que en el caso del tratamiento con antipsicóticos de primera generación de baja potencia (Salem, 2017). La introducción de antipsicóticos de segunda y tercera generación ha cambiado el concepto de manejo de la esquizofrenia, pero su ventaja sobre los fármacos más antiguos en términos de eficacia aún se está debatiendo (Morphy, 2005). Aunque la superioridad de los medicamentos multidireccionales en el tratamiento de la esquizofrenia no se puede afirmar sin ambigüedades, existen notables beneficios clínicos de dirigirse a varias vías de neurotransmisores, lo que constituye la razón fundamental para una mayor investigación de dichos compuestos.

2.4.1. Clozapina

La clozapina, es una dibenzodiazepina desarrollada en 1961, es un antipsicótico atípico que se une a diversos receptores aprobado para el tratamiento de la esquizofrenia resistente. (Warnez, 2014). Desde el estudio fundamental de Kane y colaboradores (Kane, 1988), se ha mantenido como el fármaco de elección en la esquizofrenia resistente al tratamiento a pesar de una amplia gama de efectos adversos. (Remington, 2016). Se ha demostrado que la clozapina es más eficaz que cualquier otro antipsicótico de primera generación (APG) o de segunda generación (ASG) en el tratamiento de la esquizofrenia resistente y también es útil en otras condiciones (Siskind, 2016) (tabla 1). Se ha estimado que casi dos tercios de los pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento con APG u otros ASG pueden responder adecuadamente al tratamiento con clozapina. (Essali, 2009). Sin embargo, la clozapina no se considera un tratamiento de primera línea porque a menudo puede ser difícil de tolerar para algunos pacientes, ya que algunos efectos adversos pueden ser particularmente molestos (es decir, sedación, aumento de peso, sialorrea, etc.) y otros son potencialmente peligrosos y amenaza la vida. (Solmi, 2017). Específicamente, el riesgo de agranulocitosis es una de las principales razones por la que la clozapina no es un fármaco de primera elección para la esquizofrenia. (Wicinski, 2018). Además, la clozapina puede tener varias interacciones con otros fármacos, ya que es metabolizada por el sistema del citocromo P450 (CYP) hepático. (Cadeddu, 2015). La clozapina se transforma en N-desmetil clozapina por el CYP3A4 y 1A2 y en N-óxido de clozapina por el CYP3A4. (Buur-Rasmussen, 1999). Sin embargo, CYP2C19 también participa en el metabolismo a la concentración terapéutica de clozapina (24%) mientras que la participación de los citocromos CYP2C9

(12%) y 2D6 (6%) son más modestas. (Fang, 1998). CYP1A2 es la forma más significativa a una concentración terapéutica (30%), mientras que CYP3A4 juega un papel importante a concentraciones más altas (37%) que a concentraciones terapéuticas (22%) (Eiermann, 1997). A fin de cuentas, la monitorización de los niveles en sangre de clozapina puede ser necesaria tanto cuando se utilizan inhibidores (como antifúngicos, anticonceptivos orales, fluvoxamina, ciprofloxacino, cafeína, disulfiram) como inductores (como rifampicina, omeprazol, fenitoína, fenobarbital, humo de tabaco) del CYP1A2 y se utilizan tanto inhibidores (como cimetidina, eritromicina, claritromicina, etc.) como inductores (como carbamazepina y rifampicina) de CYP3A4. (Chetty, 2007). Es importante señalar que fumar tabaco puede afectar el metabolismo de la clozapina a través de la inducción de CYP1A2, lo que resulta en niveles más bajos de clozapina en los fumadores. Esto puede causar efectos adversos si un paciente en tratamiento con clozapina deja de fumar porque los niveles sanguíneos de clozapina pueden elevarse hasta un 50-70%, lo que puede conducir a concentraciones tóxicas y al desarrollo de efectos adversos. (Lowe, 2010). Por lo tanto, es importante realizar un monitoreo farmacoterapéutico (MFT) para cualquier paciente que esté tomando clozapina. Como informaron en el estudio de Bastiampillai (2017), los niveles de clozapina en sangre generalmente deben evaluarse al menos una semana después de que se haya alcanzado una dosis estable de clozapina. Estudios farmacocinéticos, (Haring y cols., 1989, Freeman y cols., 1997) reportan que los niveles plasmáticos de CLZ son muy variables tanto intra como interindividual por lo que las evaluaciones de las concentraciones plasmáticas son útiles en el manejo clínico de los pacientes en tratamiento con este medicamento. Esta gran variabilidad en los niveles plasmáticos de CLZ podría estar

relacionado con las variaciones interindividuales de la actividad de la isoenzima CYP1A2, esta variabilidad es el motivo principal por el cual se determinan los niveles plasmáticos de CLZ en Estados Unidos y en Europa (Salazar-Pereyra y cols, 2011).

Existe evidencia de que los niveles de clozapina por encima de 600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pueden aumentar el riesgo de convulsiones, por lo que se deben considerar los antiepilépticos profilácticos (Bastiampillai, 2017). La monitorización de los niveles séricos de clozapina también puede ser útil para evaluar la eficacia clínica, además de comprobar los efectos secundarios y la toxicidad, con niveles entre 350 y 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ asociados significativamente con mejores tasas de respuesta clínica, pero también con un aumento significativo carga de efecto (Lopez, 2013). La pobre adherencia al tratamiento en pacientes con esquizofrenia resistente puede aumentar el riesgo de recaída psicótica, (Lasevoli, 2016) que puede llevar aún más a alteraciones del funcionamiento social y cognitivo, hospitalizaciones psiquiátricas, el riesgo de suicidio y el aumento de los costos de tratamiento, (Ebisch, 2013) efectos adversos de la clozapina son una causa común de suspender este medicamento y esto es motivo de preocupación (Iqbal, 2003). Por lo tanto, se deben hacer todos los esfuerzos para controlar y minimizar los efectos adversos, mejorar su detección temprana y llevar a cabo una gestión adecuada, para reducir el riesgo de daño. Esto debe hacerse considerando que, cuando falla el tratamiento con clozapina, no existen estrategias terapéuticas efectivas que puedan ser implementadas. (Miyamoto, 2015).

Tabla 1. Beneficios del uso de clozapina en la práctica clínica (modificado de De Berardis et al. 2013)

- Eficacia establecida en la esquizofrenia resistente al tratamiento, tanto a corto como a largo plazo
 - Eficaz sobre los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia resistente al tratamiento
 - Eficaz para mejorar el funcionamiento y la calidad de vida de los pacientes con esquizofrenia resistente al tratamiento
 - Eficaz para reducir el comportamiento agresivo, la hostilidad y la excitación en la esquizofrenia
 - Eficaz para reducir el uso comórbido de alcohol y drogas en pacientes con esquizofrenia, posiblemente por una reducción del deseo
 - Eficaz para reducir las tendencias suicidas en la esquizofrenia
 - Eficaz en trastornos del estado de ánimo graves y resistentes al tratamiento
 - Eficaz en la psicosis inducida por fármacos en la enfermedad de Parkinson, sin empeoramiento del parkinsonismo
 - Eficaz para reducir la discinesia tardía inducida por fármacos
 - El tratamiento con clozapina puede disminuir la mortalidad por causas naturales o relacionadas con la enfermedad en la esquizofrenia resistente al tratamiento
-

2.4.1.1. Mecanismo de acción de la clozapina y relaciones con las reacciones adversas

La clozapina es un antipsicótico atípico que se une a diversos receptores aprobado para el tratamiento de la esquizofrenia resistente. (Meltzer, 1989). En cuanto a los receptores DA, la clozapina tiene una mayor afinidad por los receptores D1 y D4 que por los D2 (Bunney, 1992). Además, la clozapina se caracteriza por una rápida disociación de los receptores D2 (el fenómeno de "desconexión rápida"), lo que explica un efecto antipsicótico más robusto y una menor propensión a causar síntomas extrapiramidales e hiperprolactinemia (Vauquelin, 2012). La clozapina tiene afinidad por varios otros receptores, incluidos los receptores serotoninérgicos 5-HT1A, 5-HT1C, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT6, 5-HT7, receptores adrenérgicos α 1 y α 2, histaminérgicos H1, H3, H4 y receptores muscarínicos M1 y M5. (Stahl, 2014). Estas afinidades, especialmente por los receptores adrenérgicos,

histaminérgicos y muscarínicos, pueden explicar algunos efectos adversos comúnmente observados durante la administración de clozapina, mientras que algunos otros efectos adversos no dependen necesariamente del agonismo o antagonismo del receptor relacionado con la clozapina. (Bastiampillai, 2017). Además, algunas poblaciones, (los ancianos o los adolescentes), pueden ser particularmente vulnerables a los efectos adversos de la clozapina a pesar de su probada eficacia. (Sporn, 2007)

Además de la actividad de la clozapina sobre los neurotransmisores cerebrales y sus receptores, se ha sugerido un posible mecanismo de acción inmunomodulador (Pollmacher, 2001). La clozapina puede influir en el sistema de citocinas, especialmente durante los primeros meses de tratamiento, aumentando las citocinas proinflamatorias y la PCR y actuando como fármaco inmunomodulador en algunas circunstancias. (Maes, 1997). De hecho, tanto los estudios *in vitro* como los *in vivo* confirmaron las acciones inmunomoduladoras de la clozapina. (Hinze-Selch, 1998.O'Connell, 2014). Estos efectos de la clozapina sobre el sistema inmunológico pueden explicar su eficacia en el tratamiento de la esquizofrenia de acuerdo con una hipótesis inmunológica de etiología del trastorno, (Watkins, 2016) pero también para algunos efectos adversos (eosinofilia, hipertermia benigna, efectos adversos cardiovasculares y hematológicos, etc.) (Maes, 1997).

2.4.1.2. Reacciones adversas frecuentes

La hipotensión ortostática, que se observa a menudo al iniciar el tratamiento, especialmente en el caso de una titulación rápida y la disfunción sexual se relacionan principalmente con el bloqueo α adrenérgico, (Testani, 1994. Hummer, 1999). Mientras que la sedación y el estreñimiento pueden deberse principalmente al bloqueo H1. (Perdigues, 2016). La hipotensión ortostática y la sedación inducidas por clozapina pueden aumentar el riesgo de caídas, especialmente en los ancianos. El antagonismo de la clozapina sobre los receptores muscarínicos M1 es responsable de efectos anticolinérgicos como estreñimiento, taquicardia, visión borrosa y retención urinaria (Sethy, 1996). Otros efectos adversos comunes incluyen mareos, eosinofilia transitoria, sialorrea, hipertermia benigna, leucocitosis y náuseas (Citrome, 2016). Entre estos últimos, la sialorrea puede ser particularmente molesta, aunque es benigna, relacionada con la dosis y, a menudo, transitoria. Sin embargo, hay algunos casos de neumonía en pacientes tratados con clozapina que tienen sialorrea, por lo que dicho efecto debe evaluarse cuidadosamente. El tratamiento de la sialorrea relacionada con la clozapina es a menudo problemático, pero se han probado algunas estrategias con buenos resultados, como una amisulpirida o amitriptilina en dosis bajas, bupropión, atropina sublingual, escopolamina, trihexifenidil y glicopirrolato, y se ha demostrado que este último puede ser el más eficaz. (Bird, 2011). Entre los efectos adversos comunes, los más peligrosos y potencialmente mortales son las convulsiones, la leucopenia y el aumento de peso o el síndrome metabólico (MetS) (Micromedex, 2021).

En la tabla 2 se muestran las reacciones adversas de la clozapina que son graves y que ponen en riesgo la vida del paciente si no se reconocen a tiempo divididas por frecuencia con respecto a los pacientes y el tratamiento: frecuentes ($\geq 1 / 100$), poco frecuentes ($\geq 1 / 1000$) y raras ($\geq 1 / 10.000$).

Tabla 2. Reacciones adversas de la clozapina.

Común	Poco común	Raro
Sedación	Agranulocitosis (LT)	Miocarditis / pericarditis (LT)
Hipertensión	Diabetes mellitus / hiperglucemia / CAD (LT)	Miocardiopatía (LT)
Aumento de peso	Síndrome metabólico	Golpe de calor (LT)
Convulsiones (LT)	Delirio	Insuficiencia hepática (LT)
Hipersalivación o sialorrea	Anomalías de las enzimas hepáticas	Colitis (LT)
Fiebre benigna	Nefritis intersticial	Obstrucción intestinal / íleo paralítico (LT)
Hipotensión	Tartamudeo	Pancreatitis (LT)
Náusea	Trombocitopenia	Neumonía (LT)
Orina nocturna al dormir	Afonía	Insuficiencia respiratoria (LT)
Reflujo gastroesofágico	Síndrome neuroléptico maligno (LT)	Vasculitis
Estreñimiento		Erupción cutánea
Taquicardia		Pigmentación ocular
Mareo		Priapismo
Visión borrosa		Inflamación de la glándula parótida
Disartria		Rabdomiólisis
Discrasias sanguíneas como leucopenia / disminución de leucocitos / neutropenia / eosinofilia / leucocitosis		Prolongación del intervalo QT (LT)
		Muerte súbita (LT)

CAD, cetoacidosis diabética; WBC, glóbulo blanco.

2.4.1.3. Convulsiones

Las convulsiones pueden ser una reacción adversa relativamente común y potencialmente mortal de la CLZ. De hecho, la clozapina puede reducir el umbral convulsivo no solo en personas con riesgo de epilepsia, sino también en sujetos aparentemente sanos. El riesgo de convulsiones durante el tratamiento con clozapina se ha estimado en aproximadamente 1 a 6%, generalmente depende de la dosis y puede aparecer con mayor frecuencia en pacientes más jóvenes. (Williams, 2015). Se ha reportado que la titulación rápida y dosis más altas de clozapina (≥ 600 mg / día) se asociaron con un mayor riesgo que las dosis medias (300-600 mg / día) o bajas (<300 mg / día) (Dumortier, 2001). Además, la titulación rápida de clozapina puede aumentar aún más la aparición de convulsiones. Incluso si se ha reportado un mayor riesgo de convulsiones durante la titulación de clozapina, este efecto adverso puede aparecer durante todas las fases del tratamiento, incluso después de varios años de terapia. Los pacientes que desarrollan convulsiones durante la titulación de clozapina o el tratamiento de mantenimiento pueden continuar con clozapina con reducción de la dosis, o mejor aún, con la adición de un medicamento antiepiléptico. El valproato puede ser la mejor opción, sin embargo, su combinación debe controlarse cuidadosamente.

2.4.1.4. Aumento de peso y riesgo de síndrome metabólico (MetS)

Los antipsicóticos de segunda generación generalmente se asocian con aumento de peso, en particular olanzapina y clozapina y con riesgos relacionados de alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia y cetoacidosis diabética (CAD)

(Smith, 2008). El aumento de peso es un efecto adverso común de la clozapina que, per se, puede no ser potencialmente mortal si se maneja y trata adecuadamente. Se ha propuesto una relación entre el aumento de peso y las dosis de clozapina, pero esta relación sigue siendo controvertida. Las anomalías metabólicas de la clozapina están relacionadas principalmente con el bloqueo de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, pero también se cree que los efectos sobre los receptores histaminérgicos y adrenérgicos juegan un papel importante (Meltzer, 1994). La incidencia de aumento de peso relacionado con la clozapina se considera la más significativa en un 5-35% y casi la mitad de los pacientes pueden aumentar un 20% o más de su peso corporal inicial, especialmente si están en polifarmacia, tienen un estilo de vida sedentario o no tiene sobrepeso al inicio del estudio. Varios estudios han asociado el tratamiento con clozapina con el desarrollo de la dislipidemia y la hipertensión, (Henderson, 2004. Lund, 2001). El tratamiento con clozapina también puede estar asociado con diabetes y CAD (Lafayette, 2003. Pierides, 1997). Con respecto a la CAD (Cohen, 2012) encontraron una tasa de incidencia a 1 año de 1.2 a 3.1% y una tasa de letalidad de 20 a 31%, lo que convierte a la CAD en uno de los efectos secundarios de mayor riesgo, con una mortalidad más alta que la agranulocitosis con del 3.8% al 8% y una tasa de letalidad del 2.2% al 4.2%.

2.4.1.5. Hipomotilidad gastrointestinal y estreñimiento

Las propiedades anticolinérgicas periféricas de la clozapina, así como sus propiedades de antagonismo H₁, se han relacionado con varios grados de deterioro de la peristalsis intestinal que van desde estreñimiento transitorio hasta íleo paralítico y obstrucción

intestinal. Se sabe que incluso dosis bajas o terapéuticas de clozapina pueden prolongar el tiempo de tránsito colónico. (Baptista, 2015). Estos efectos están mediados principalmente por el antagonismo de la clozapina sobre los receptores colinérgicos y serotoninérgicos de la pared intestinal, probablemente a través de los receptores M1-M3 y 5HT-3 y 5HT-7. Por lo tanto, la detección temprana y el tratamiento del estreñimiento y el íleo son obligatorios para evitar consecuencias graves (Palmer, 2008). En estos pacientes es obligatoria la recomendación de una ingesta adecuada de líquidos, especialmente en presencia de sialorrea, y la actividad física regular, así como la reducción de dosis o prescripción de laxantes para evitar la progresión de efectos adversos gastrointestinales graves (Every-Palmer, 2017).

2.4.1.6. Reacciones adversas poco frecuentes

Las reacciones adversas menos comunes asociados con el tratamiento con clozapina pueden incluir delirio, anomalías de las enzimas hepáticas, nefritis intersticial, tartamudeo, trombocitopenia y disfonía. (Werner, 2014). También puede estar asociada con otras poco frecuentes como vasculitis, erupción cutánea, pigmentación ocular, priapismo, inflamación de la glándula parótida y rabdomiólisis que pueden no siempre ser graves pero que requieren un seguimiento cuidadoso. Sin embargo, algunos de las, desafortunadas, reacciones adversas raras pueden ser graves y potencialmente mortales, y estos incluyen insolación, insuficiencia hepática, colitis, pancreatitis, neumonía e insuficiencia respiratoria (De Berardis, 2013).

Además, se han reportado varios casos de síndrome neuroléptico maligno relacionado con la clozapina, a menudo caracterizados por características atípicas, es decir, con síntomas extrapiramidales menos intensos o fiebre alta. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los casos publicados fueron reportados en sujetos con comorbilidades o bajo polifarmacia con diferentes antipsicóticos, especialmente aquellos con mayor afinidad por los receptores de dopamina D2, como risperidona, amisulprida y olanzapina u otros medicamentos (Cherry, 2016).

2.4.1.7. Discrasias sanguíneas y agranulocitosis/granulocitopenia

Las discrasias sanguíneas, como leucopenia leve a moderada, disminución del recuento de glóbulos blancos, neutropenia leve, anemia, eosinofilia y leucocitosis, se observan a menudo con el tratamiento con CLZ pero si se controla, en la mayoría de los casos esto puede ser transitorio o benigno (Demler, 2016. Bergeman, 2007). Las discrasias sanguíneas más graves y potencialmente mortales relacionadas con la clozapina es la neutropenia, que eventualmente puede convertirse en agranulocitosis o granulocitopenia inducida por clozapina. Esto ocurre en aproximadamente 0.8 a 2% de los pacientes y requiere monitorización hematológica obligatoria. La aparición de agranulocitosis o granulocitopenia incluso llevó a la salida parcial de la clozapina del mercado y a fuertes restricciones para su uso a mediados de la década de 1970 (Hippius, 1989). La neutropenia se definió en las guías de clozapina de 2005 como un recuento absoluto de neutrófilos (RAN) por debajo de 1500 y ocurre en aproximadamente el 3% de los pacientes tratados, mientras que la agranulocitosis se definió como un RAN por debajo de 500 / mm³. Una neutropenia

transitoria (1 semana) son relativamente comunes durante el tratamiento con clozapina y no necesariamente requieren la interrupción del tratamiento, pero no se sabe por qué algunos pacientes desarrollan neutropenia transitoria mientras que otros progresan a agranulocitosis (Rajagopal, 2005). Aunque se ha reportado que el mayor riesgo de agranulocitosis ocurre durante las primeras 12 semanas desde la titulación de clozapina y durante los primeros 6 meses de tratamiento, los pacientes pueden desarrollar discrasia sanguínea grave en cualquier momento durante el tratamiento. Sin embargo, se han reportado algunos casos de agranulocitosis inducida por clozapina de inicio tardío. El desarrollo de agranulocitosis puede ser independiente de la dosis y los factores de riesgo incluyen edad avanzada, sexo femenino, haplotipos de antígenos leucocitarios humanos y tratamiento concomitante con otros medicamentos que se sabe que causan agranulocitosis. Curiosamente, en algunos casos de agranulocitosis grave inducida por clozapina, la aparición no dependió de la dosis de clozapina (Alvir, 1993). Para explicar este peligroso efecto adverso, varios estudios han planteado la hipótesis de una posible interacción entre la clozapina y el sistema inmunológico, sugiriendo un mecanismo inmunomodulador que participa en sus efectos adversos o incluso en su eficacia clínica (Regen, 2017). También es posible que algunos sujetos estén genéticamente predispuestos. Por otra parte, la degradación oxidativa de la clozapina puede provocar el desarrollo de algunos metabolitos con iones de nitrógeno reactivos, que pueden unirse covalentemente a los leucocitos humanos, lo que resulta en toxicidad directa o conduce al desarrollo de la formación apténica de una estructura antigénica que estimulará una respuesta inmunitaria dirigida. Por otra parte, los lineamientos de la Administración de Alimentos y Medicamentos

de EE. UU. de 2015 para el control hematológico durante el tratamiento con clozapina recomiendan que no se interrumpa el tratamiento en el caso de neutropenia leve (≥ 1000 - $1499/\text{mm}^3$) y que el RAN se controle tres veces por semana hasta alcanzar al menos $1500/\text{mm}^3$. Sin embargo, en el caso de neutropenia moderada (≥ 500 - $999/\text{mm}^3$), recomiendan que se interrumpa el tratamiento cuando se sospeche neutropenia inducida por clozapina, con monitorización diaria realizada hasta que el RAN sea de al menos $1000/\text{mm}^3$ (cuando se puede reanudar el tratamiento) y, en consecuencia, la monitorización se lleva a cabo tres veces por semana hasta que el RAN sea de al menos $1500/\text{mm}^3$, luego se procede a controles semanales durante 4 semanas y finalmente se vuelve al último plan de monitorización de RAN de rango normal del paciente. En el caso de neutropenia grave ($< 500/\text{mm}^3$), todos los pacientes deben interrumpir el tratamiento por sospecha de neutropenia inducida por clozapina y no se debe considerar la reexposición a clozapina a menos que el prescriptor, junto con una consulta con un hematólogo, determine que los beneficios superan los riesgos. Recientemente, algunos estudios han señalado que el factor estimulante de colonias de granulocitos puede ser beneficioso en el tratamiento de la agranulocitosis inducida por clozapina (Lally, 2017), pero se necesitan más evidencias y el retiro de la clozapina sigue siendo obligatoria en esos casos. La reimplementación de la clozapina siempre es un riesgo después de un episodio de agranulocitosis, sin embargo, hay algunos reportes que no observaron discrasia sanguínea cuando se reintrodujo la clozapina después de un episodio de agranulocitosis con o sin terapias adyuvantes. (Dunk, 2006) llevaron a cabo una nueva exposición a clozapina en 53 pacientes que desarrollaron leucopenia o neutropenia durante el tratamiento previo con clozapina y encontraron que

el 38% experimentó una discrasia sanguínea adicional mientras que el 55% no, por lo que; la reexposición a clozapina requiere una evaluación cuidadosa y debe tenerse en cuenta caso por caso cuando los riesgos superen los beneficios de todas las demás estrategias.

2.4.1.8. Miocardiopatía, miocarditis y pericarditis inducidas por clozapina

La clozapina puede estar asociada con la aparición de efectos secundarios cardiovasculares graves, que incluyen miocardiopatía dilatada, miocarditis y pericarditis, que pueden ser fatales si no se reconocen y tratan a tiempo. (Ronaldson, 2017). La miocarditis es un efecto adverso poco común, independiente de la dosis y potencialmente mortal y ocurre hasta en el 3% de los pacientes tratados. Se ha sugerido que los factores de riesgo de cualquier complicación cardíaca de la clozapina pueden ser el ajuste rápido de la dosis, la presencia de aumento de peso o efectos adversos metabólicos, la coadministración de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y el uso de sustancias ilícitas. A pesar de sus efectos adversos potencialmente mortales que deben de ser tomados en cuenta, la clozapina sigue siendo el estándar de oro en el tratamiento de la esquizofrenia resistente al tratamiento (ERT). Sin embargo, independientemente de la evidencia, la clozapina todavía se prescribe de forma insuficiente o se utiliza demasiado tarde por el temor de los psiquiatras a las reacciones adversas graves, es importante enfatizar que el tratamiento con clozapina puede disminuir la mortalidad en los pacientes tratados al reducir la autolesión, el riesgo de suicidio y el intento de suicidio. Finalmente, es importante señalar que la clozapina es el único medicamento capaz de restaurar de forma satisfactoria las actividades de los pacientes con ERT mejorando sus vidas y su autocuidado, incluso a largo plazo. Por lo tanto,

es importante mejorar nuestro conocimiento sobre la CLZ para aumentar la posibilidad de prescribirla a quienes la necesitan de manera segura.

2.4.2. Eficacia y seguridad del tratamiento

Para la valoración de los síntomas de la esquizofrenia, positivos y negativos, existen múltiples instrumentos validados para la evaluación de estos, como la Escala Breve de Evaluación Psiquiátrica (BPRS), Escala de Síntomas Positivos y Negativos de la Esquizofrenia (PANSS), Entrevista para la Evaluación Clínica de los Síntomas Negativos (CAINS), entre otras (Crespo-Facorro y cols, 2017).

Por otra parte, la adherencia al tratamiento prescrito se define como: el grado en que, el comportamiento de una persona en cuanto al seguimiento del tratamiento prescrito (tratamiento farmacológico, psicoterapia, cambios en el estilo de vida, etc.) se corresponde con las recomendaciones acordadas con un prestador de la asistencia sanitaria (Crespo-Facorro y cols, 2017).

Después del inicio de una medicación antipsicótica, la medicación debe continuarse durante al menos dos semanas, excepto que existan problemas de tolerabilidad importantes; para poder evaluar la respuesta del paciente al tratamiento antipsicótico. Siendo la duración adecuada de cuatro a seis semanas (Escamilla-Orozco y cols, 2021). La evaluación del tratamiento se mide con la evaluación psiquiátrica, la disminución de la sintomatología positiva como negativa se traduce como la eficacia del tratamiento.

Sin embargo, la eficacia del tratamiento no es la única prioridad en el seguimiento farmacoterapéutico, también lo es la seguridad en el uso de los medicamentos. Esto es uno de los objetivos finales de la farmacovigilancia (OMS, 2012).

La farmacovigilancia (FV) se define como la ciencia y las actividades relacionadas con la detección, evaluación, la comprensión y la prevención de los efectos adversos o cualquier otro problema relacionado con los medicamentos (OMS, 2012).

La principal importancia de la FV se debe al hecho de que los ensayos clínicos precomercialización, se realizan con un número de pacientes muy limitados, que son insuficientes para detectar las reacciones adversas raras y saber si la reacción adversa *per se* tienen un aumento en la incidencia o gravedad cuando se conjunta con otras situaciones (Broja, 2006).

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad discapacitante que afecta no solo la calidad de vida de los pacientes, sino también la de los familiares y es difícil lograr un control adecuado de la misma. Los antipsicóticos atípicos son una buena alternativa para el tratamiento de los pacientes con esquizofrenia que presentan resistencia a los antipsicóticos clásicos, sin embargo, su rango de dosificación es muy amplio. Además, la American Psychiatry Association (APA) recomienda los antipsicóticos atípicos como tratamiento de primera línea de la esquizofrenia, excluyendo la CLZ debido a su perfil de eventos adversos raros pero graves como neutropenia grave o agranulocitosis y complicaciones cardíacas (Escamilla-Orozco y cols., 2021) por lo que, desarrollar una herramienta para detectar cuando el conteo de leucocitos y/o neutrófilos disminuya sin poner en peligro la vida del paciente es de suma importancia para que los médicos psiquiatras puedan prescribir la CLZ de forma segura.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los marcadores de seguridad y eficacia de la clozapina en pacientes con esquizofrenia en tratamiento de clozapina, en cualquier tiempo de su administración.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Validar el método analítico para la cuantificación de CLZ y de su metabolito la N-desmetil clozapina.
- Cuantificar la cantidad de neutrófilos en sangre de pacientes con esquizofrenia tratados con clozapina.
- Cuantificar la cantidad de glutatión reducido y oxidado como marcador bioquímico de estrés oxidante en pacientes tratados con clozapina.
- Evaluar los niveles plasmáticos de la clozapina y de su metabolito la N-desmetil clozapina.
- Determinar si existe una correlación entre la concentración plasmática de la clozapina y la presencia de agranulocitosis a través del análisis estadístico.
- Evaluar la relación seguridad/eficacia del tratamiento con clozapina en pacientes con esquizofrenia.

V. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio clínico de intervención, prospectivo, en un periodo de un año, del 1 de diciembre de 2016 al 30 de noviembre de 2017. El estudio se llevó a cabo en el servicio de Neuropsiquiatría del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suarez”

5.2. Diseño del estudio

La población objetivo fueron adultos con diagnóstico de esquizofrenia cumpliendo los criterios diagnósticos del DSM-V, que se encontraban en tratamiento ambulatorio con clozapina. Se reclutaron 41 pacientes.

5.2.1. Criterios de inclusión

Pacientes que cumplieron con los criterios del DSM-V para el diagnóstico de esquizofrenia, con edad de entre 18-65 años, con cualquier tiempo de tratamiento con clozapina, cuyos familiares o responsables de su cuidado, accedieron a firmar la forma de consentimiento informado en conjunto con el paciente (anexo1). La indicación de tratamiento con CLZ la realizó el psiquiatra de acuerdo con las necesidades clínicas del paciente.

5.2.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron a aquellos sujetos que presentaron alteraciones cognitivas previas al diagnóstico de esquizofrenia, con antecedente de uso de sustancias de abuso en los últimos tres meses (excepto fumadores), abuso de alcohol, con anemia severa o mujeres embarazadas. Aquellos pacientes que sean incapaces de proporcionar un consentimiento informado y cuyo familiar responsable no aceptó la inclusión del paciente en el estudio.

5.2.3. Muestreo

Todos los pacientes entrevistados que cumplieron con los criterios de inclusión, por lo tanto, el muestreo fue no probabilístico.

5.2.4. Aspectos éticos

Este estudio fue aprobado con el Comité de Ética e Investigación Clínica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, número de registro 92/07 y respetando la Declaración de Helsinki. El consentimiento informado se le proporcionó al familiar responsable y al paciente para su conocimiento y firma (NOM-012-SSA3-2012).

5.2.5. Caracterización de la población en estudio

En la primera entrevista se tomaron los datos del paciente como nombre, edad, peso, tiempo de evolución de la esquizofrenia y enfermedades concomitantes, si fuera el caso, tratamiento actual. El psiquiatra evaluó a los pacientes en cada cita médica.

5.3. Marcadores bioquímicos a determinar

5.3.1. Conteo de la cantidad de leucocitos y neutrófilos en sangre

Se realizaron frotis sanguíneos a cada paciente para realizar el conteo de leucocitos y neutrófilos. Se tomaron muestras sanguíneas de 2 ml, con un tubo con EDTA (morado), durante un período de 6 meses. Sí el paciente tenía menos de 3 meses con el tratamiento CLZ, la toma de muestra se realizó de forma semanal; sí el paciente tenía más de tres meses con el tratamiento de clozapina, la toma de muestra se realizó mensual. Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio clínico del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

5.3.2. Cuantificación de la concentración de glutatión reducido y oxidado

Se analizaron los niveles de glutatión utilizando la técnica previamente reportada en nuestro laboratorio (Pérez-Severiano F., et al., 2013). Se tomaron 125 μ l de plasma, se agregaron 875 μ l de BP-EDTA más 250 μ l de ácido metafosfórico y se agitó durante 1 min en vortex. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 min a 4° C.

Glutatión reducido (GSH)

Después del procedimiento mencionado, se tomaron 100 μ l de sobrenadante y se agregaron 400 μ l de PB-EDTA y se agita durante 1min en vortex. Se tomaron 50 μ l de la mezcla y se agregaron 900 μ l de PB-EDTA más 50 μ l de OPA, se agita durante 1 min en vortex. Se dejó reposar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente y después se hizo el análisis de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión, con una sensibilidad del 95%. Para el análisis del blanco, se sustituyó la muestra de plasma por agua desionizada,

y dicha muestra fue tratada como todas las demás. También se aplicó un control de calidad interno para poder garantizar la confiabilidad de las determinaciones a lo largo del estudio. Construimos curvas de calibración basadas en estándares con concentraciones conocidas de GSH (0 µg/ml, 0.05 µl/ml, 0.1 µl/ml, 0.2 µl/ml, 0.3 µl/ml, 0.5 µl/ml, 1 µl/ml) a través de las cuales se obtuvieron las concentraciones de nuestras muestras por interpolación. Los resultados fueron expresados como concentraciones en µM de GSH.

Glutati3n oxidado (GSSG)

Despu3s del procedimiento mencionado, se tomaron 50 µl del sobrenadante y se agregaron 20 µl de NEM y se agitó durante 1 min en vortex. Se dejó reposar durante 30min a temperatura ambiente y despu3s se agregaron 430 µl de NaOH, se agitó durante 1 min en vortex. Se tomaron 50 µl de la mezcla y se agregaron 900 µl de NaOH m3s 50 µl de OPA y se agitó durante 1 min en vortex. Se dejó en reposo durante 15 min a temperatura ambiente y despu3s se hizo el an3lisis de fluorescencia a 350 nm de excitaci3n y 420 nm de emisi3n, con una sensibilidad del 95%. Para el an3lisis del blanco, se sustituy3 la muestra de plasma por agua desionizada, y dicha muestra fue tratada como todas las dem3s. Tambi3n se aplic3 un control de calidad interno para poder garantizar la confiabilidad de las determinaciones a lo largo del estudio. Se construyeron curvas de calibraci3n basadas en est3ndares con concentraciones conocidas de GSSH (0 µg/ml, 0.05 µl/ml, 0.1 µl/ml, 0.2 µl/ml, 0.3 µl/ml, 0.5 µl/ml, 1 µl/ml) a trav3s de las cuales se obtuvieron las concentraciones de nuestras muestras por interpolaci3n. Los resultados fueron expresados como concentraciones en µM de GSSG.

5.3.3. Determinación de la concentración plasmática de la clozapina y N-desmetilclozapina

Las muestras de sangre de los pacientes fueron recolectadas por punción venosa por una enfermera, en tubos vacutainer morados (con EDTA) y se recolectaron 5 ml de sangre. Las muestras fueron centrifugadas para obtener el plasma, el cual fue almacenado a -20°C hasta hacer analizadas.

Análisis cromatográfico

Se utilizó un sistema cromatográfico (Agilent modelo 1100), equipado con detector de diodos, la longitud de onda que se utilizó fue de 245 nm, un volumen de inyección de 100 µl y la duración de la corrida fue de 15 min. Se usó una columna analítica Brava Cyano 5 µm, 250 mm x 4.6 mm (Grace, Altech). La fase móvil se compuso de acetonitrilo, agua desionizada y filtrada y amortiguador de acetato de amonio 1 M (50:49:1 v/v), pH de 5.7 y una velocidad de flujo de 1 ml/min. El amortiguador de acetato de amonio 1 M se preparó de la siguiente manera, se pesaron 3.85 gr de acetato de amonio y se disolvió en 20 ml de agua desionizada, la mezcla se aforó a 50 ml.

Preparación de los estándares

El estándar interno utilizado fue la protriptilina a una concentración de 250 ng/ml, la clozapina y la N-desmetilclozapina fueron preparadas diario a partir de la solución madre.

La solución madre de protriptilina (1,000 ng/ml) fue preparada con acetonitrilo/agua desionizada (50:50 v/v). Se pesaron 5mg de protriptilina, se disolvió con 2 ml de solución de acetonitrilo/agua, la mezcla se aforó a 5 ml. Se almacenó a -70°C hasta que fue utilizada.

La solución madre de clozapina (50 ng/ml) fue preparada con la fase móvil acetonitrilo/amortiguador de acetato de amonio pH 5.7. Se pesó 1 mg de clozapina y se disolvió con 5ml de acetonitrilo/amortiguador de acetato de amonio, la mezcla se aforó a 20 ml. Se almacenó a -70°C hasta que fue utilizada.

La solución madre de N-desmetilclozapina (50 ng/ml) fue preparada con la fase móvil acetonitrilo/amortiguador de acetato de amonio pH 5.7. Se pesaron 1 mg de N-desmetilclozapina y se disolvió con 5 ml de acetonitrilo/amortiguador de acetato de amonio, la mezcla se aforó a 20 ml. Se almacenó a -70°C hasta que fue utilizada.

Preparación de la muestra

Se utilizó la técnica reportada por Volpicelli et al (1993) con modificaciones menores:

Muestras de 300 µl de plasma se colocaron en un tubo Eppendorf con tapa de 5 ml, se agregaron 100 µl del estándar interno y 3.5 ml de acetato de etilo. Se mezcló por 1 min en vortex. Después se centrifugo a 12,000 rpm durante 10 min. Se pasan 3 ml de la fase de acetato (fase de arriba) a otro tubo Eppendorf con tapa de 5 ml, se agregan 150 µl de HCl 0.1 M, se agita por 1 min en vortex y después se centrifuga a 12,000 rpm durante 10 min.

Se tomaron 150 µl de la fase de acuosa (fase de abajo en forma de botón). Se colocan en un inserto y se inyectan 100 µl en el cromatógrafo.

Para preparar HCl 0.1 M se tomaron 0.4 ml de HCl al 37.5% de pureza y se afora a 50 ml de agua desionizada.

5.4. Validación parcial del método

Los resultados se analizaron mediante una regresión lineal, tomando como criterios de aceptación el coeficiente de correlación ≥ 0.99 , también se calculó la concentración recuperada de cada nivel de la curva de calibración. Los parámetros de la validación parcial del método analítico deben cumplir con los criterios de NOM-177-SSA1-2013.

5.4.1. Curvas de calibración y linealidad

Se construyó una curva de calibración con 6 puntos de concentraciones, los datos obtenidos deben estar dentro del 15% de la concentración nominal, tanto para clozapina como para N-desmetilclozapina, con las siguientes concentraciones:

Concentración deseada clozapina/N- desmetilclozapina (ng/ml)	μl solución madre clozapina	μl solución madre N-desmetilclozapina	ml plasma
31.25/ 12.5	6.25	2.5	Aforar a 10 ml
62.5/25	12.5	5	Aforar a 10 ml
125/50	25	10	Aforar a 10 ml
500/200	100	40	Aforar a 10 ml
700/400	140	80	Aforar a 10 ml
1000/560	200	112	Aforar a 10 ml

Se realizó un análisis estadístico con regresión lineal de los mínimos cuadrado, para determinar la pendiente, la desviación estándar y el coeficiente de correlación. Se prepararon 3 puntos con concentraciones intermedias de clozapina y N-desmetilclozapina, los cuales fueron utilizados para realizar la validación parcial del método analítico, estos puntos fueron preparados a partir de las soluciones madres de la siguiente manera:

Concentración deseada clozapina/N- desmetilclozapina (ng/ml)	μl solución madre clozapina	μl solución madre N-desmetilclozapina	ml plasma
45/18	9	3.6	Aforar a 10 ml
250/100	50	20	Aforar a 10 ml
850/480	170	96	Aforar a 10 ml

5.4.2. Límite inferior de cuantificación

En la validación parcial del método analítico se estableció la concentración de trabajo más baja donde el desempeño del método aun es aceptable con respecto a su precisión y exactitud. El límite inferior de cuantificación se determinó por medio del análisis por triplicado de la concentración más baja de la curva de calibración, 31.25/ 12.5 ng/ml de CLZ y DMC respectivamente. El coeficiente de variación del valor promedio de los resultados no debe de ser mayor a 20%.

5.4.3. Reproducibilidad y repetibilidad

Para la repetibilidad del método, se preparó y analizó cada punto de la curva por duplicado y cada punto de los puntos intermedios por triplicado, todo fue realizado el mismo día bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se hicieron los cálculos estadísticos de promedio, pendiente, desviación estándar y coeficiente de variación.

Para la reproducibilidad del método se preparó y analizó cada punto de la curva por duplicado y cada punto de los puntos intermedios por triplicado, todo fue realizado cada día durante dos días consecutivos bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se hicieron los cálculos estadísticos de promedio, pendiente, desviación estándar y coeficiente de variación.

El coeficiente de variación en ambos casos debe ser menor del 15%

5.4.4. Exactitud

Se determinó con la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones obtenidas de cada punto de las curvas de ambas muestras con respecto la concentración de cada punto. Los resultados deben tener una variación $\leq 15\%$ Se ocupó la siguiente ecuación:

$$\%Desv = 100 \times \left(\frac{\text{concentración adicionada} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \right)$$

5.4.5. Recuperación absoluta

Se determinó por la extracción de las soluciones estándar de los fármacos, clozapina y N-desmetilclozapina, por el método de extracción propuesto de los tres puntos intermedios (45/18 ng/ml, 250/100 ng/ml y 850/480 ng/ml) y las alturas de los picos obtenidos fueron comparados con las concentraciones nominales.

5.4.6. Selectividad

Fue analizado el plasma obtenido de personas que no participaron en el estudio, se les agregaron cantidad conocidas del estándar interno, clozapina y N-desmetilclozapina.

5.4.7. Estabilidad de las muestras

Para realizar las pruebas de estabilidad de las muestras plasmáticas, se utilizaron las muestras de las curvas usadas para las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, se almacenaron a -70°C y se analizaron después de 90 días.

5.5. Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se realizó con el software SPSS V 24.0. Se realizó un análisis exploratorio para observar la distribución normal de los datos, un análisis bivariado, correlaciones bivariadas de Spearman's y Pearson's, regresión lineal y coeficientes de correlación utilizando el número de neutrófilos como variable dependiente y las concentraciones plasmáticas de clozapina y N-desmetilclozapina como variables independientes.

5.6. Seguimiento farmacoterapéutico

5.6.1. Eficacia del tratamiento

Se realizó el seguimiento de todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión del estudio. La evaluación de la disminución de los síntomas positivos y negativos en los pacientes con esquizofrenia fue realizada por el médico con especialidad en psiquiatría y con la aplicación de la escala PANSS. La revisión médica y farmacéutica de los pacientes se llevó a cabo cada semana si el paciente tenía tratamiento con clozapina menor a 3 meses y cada mes si la duración del tratamiento fue mayor a 4 meses.

5.6.2. Detección de resultados negativos y errores de medicación

El farmacéutico se entrevistó con los pacientes, posterior a cada consulta médica con el psiquiatra. En la primera entrevista se recabó información relacionada con su tratamiento farmacológico y problemas de salud que tuvo cada el paciente, tratamiento actual. Al

finalizar la entrevista se documentó y registró la información recibida por el paciente (Anexo

2). La entrevista se desarrolló en cuatro partes:

- Problemas de salud.
- Medicamentos.
- Evaluación.
- Intervención Farmacéutica.

Se le solicitó al familiar responsable del paciente, que trajera a la consulta farmacéutica las cajas de todos los medicamentos que estuviera tomando el paciente para verificar si el paciente tomara sus medicamentos. Cuando se detectó un resultado negativo a la medicación y después de realizar la evaluación correspondiente se resolvió de la siguiente manera:

- Verbal, farmacéutico-paciente.
- Escrito, farmacéutico-paciente.
- Verbal, farmacéutico-médico-paciente.
- Escrito, farmacéutico-médico-paciente.

VI. RESULTADOS

6.1. Análisis cromatográfico

Parte analítica. Validación del método analítico para cuantificar los niveles séricos de clozapina y N-desmetilclozapina.

Linealidad del sistema. Se preparó una curva de calibración con 6 puntos y 3 puntos intermedios, 30/12.5 ng/ml, 62.5/25 ng/ml, 125/50 ng/ml, 500/200 ng/ml, 700/400 ng/ml y 1,000/560 ng/ml y los puntos intermedios fueron 45/18 ng/ml, 250/100 ng/ml y 850/480 ng/ml.

Para clozapina el coeficiente de correlación fue de 0.9982, figura 2, el coeficiente de variación estuvo en un rango de 0.30 a 2.06%. Para N-desmetilclozapina el coeficiente de correlación fue de 0.9983 (fig. 3) y el coeficiente de variación estuvo en un rango de 0.06 a 2.86%

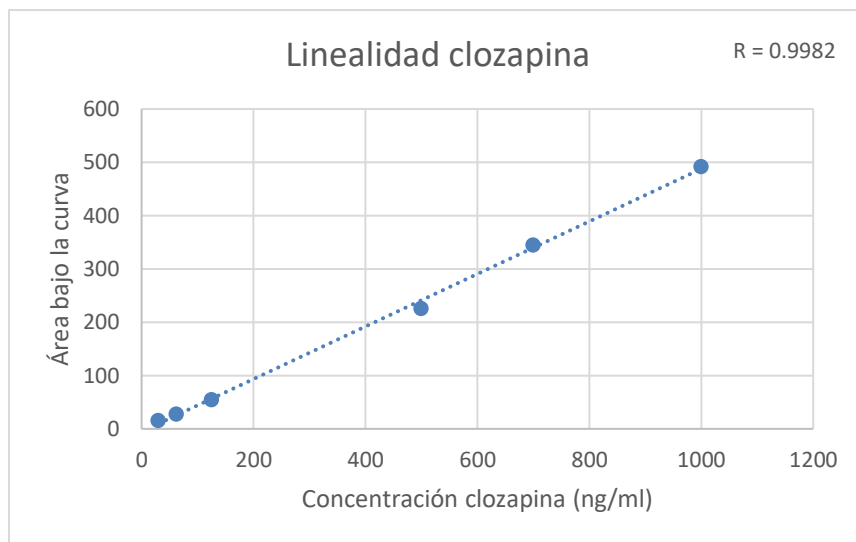


Figura 2. Linealidad de la curva de clozapina.

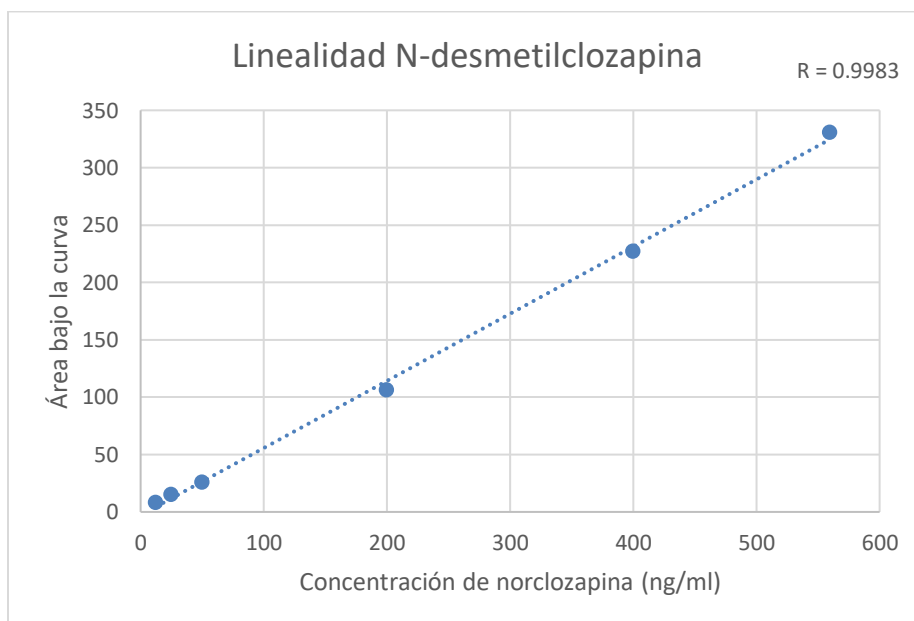


Figura 3. Linealidad de la curva de N-desmetilclozapina.

Selectividad. Como se puede observar en la figura 4 el método es selectivo, no se observan interferencias en la muestra de plasma.

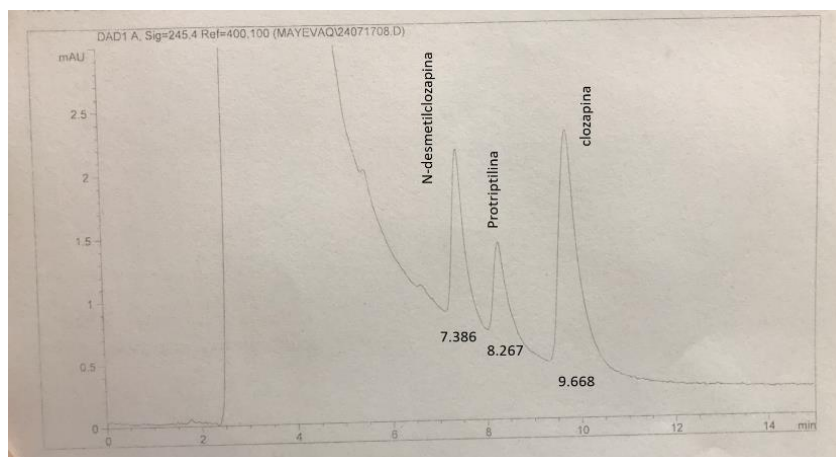


Figura 4. Cromatograma que muestra los tiempos de elusión de N-desmetilclozapina, clozapina y protriptilina.

Repetibilidad. El método de extracción es repetible tanto de clozapina (tab. 3) como de norclozapina, tabla. 4)

Tabla 3. Repetibilidad de clozapina.

CONCENTRACIÓN (ng/ml)	ABC 1	ABC 2	PROMEDIO	DE	CV
30	12.9021	12.0959	12.499	0.57006949	4.56%
62.5	23.2242	23.7338	23.479	0.36034162	1.53%
125	51.62	50.901	51.2605	0.50840978	0.99%
500	234.008	244.659	239.3335	7.53139433	3.15%
700	360.645	386.507	373.576	18.2871956	4.90%
1000	488.251	511.097	499.674	16.1545615	3.23%

Tabla 4. Repetibilidad de N-desmetilclozapina.

CONCENTRACIÓN (ng/ml)	ABC 1	ABC 2	PROMEDIO	DE	CV
12.5	7.16012	8.84356	8.00184	1.19037184	14.88%
25	12.6686	12.8352	12.7519	0.11780399	0.92%
50	24.6259	24.392	24.50895	0.16539228	0.67%
200	105.615	110.899	108.257	3.73635223	3.45%
400	228.001	244.404	236.2025	11.5986725	4.91%
560	318.926	334.509	326.7175	11.018845	3.37%

El método analítico también es reproducible, como se puede observar en la tabla 5 para clozapina y tabla 6 para N-desmetilclozapina

Tabla 5. Reproducibilidad del método de extracción para clozapina.

	DÍA 1		DÍA 2				
CONCENTRACIÓN (ng/ml)	ABC 1	ABC 2	ABC 3	ABC 4	PROMEDIO	DE	CV
30	13.7542	13.6034	13.7542	13.6034	13.6788	0.08706442	0.64%
62.5	30.0282	30.1535	30.0282	30.1535	30.09085	0.07234199	0.24%
125	55.4569	53.3962	55.4569	53.3962	54.42655	1.1897457	2.19%
500	216.367	219.312	216.367	219.312	217.8395	1.70029654	0.78%
700	365.921	351.067	365.921	351.067	358.494	8.5759609	2.39%
1000	464.822	491.239	464.822	491.239	478.0305	15.2518621	3.19%

Tabla 6. Reproducibilidad del método analítico para N-desmetilclozapina.

	DÍA 1		DÍA 2				
CONCENTRACIÓN (ng/ml)	ABC 1	ABC 2	ABC 3	ABC 4	PROMEDIO	DE	CV
12.5	7.16012	8.84356	8.2493	8.41502	8.167	0.71643283	8.77%
25	12.6686	12.8352	13.3063	15.8171	13.6568	1.46529999	10.73%
50	24.6259	24.392	26.0778	25.1979	25.0734	0.75030701	2.99%
200	105.615	110.899	100.202	103.191	104.97675	4.52649786	4.31%
400	228.001	244.404	241.024	241.094	238.63075	7.25987251	3.04%
560	318.926	334.509	301.286	317.492	318.05325	13.5770526	4.27%

Exactitud del método analítico. Como se puede observar en la tabla 7 y 8, el método es exacto para clozapina y N-desmetilclozapina respectivamente. Las cuantificaciones de los 3 puntos intermedios de la curva muestran una desviación absoluta en un rango de -3.36 a 0.06% En relación con la N-desmetilclozapina los puntos intermedios se encuentran entre -0.39 a -1.02%, los cuales están dentro de los parámetros que marca la NOM 177-SSA1-2013.

Tabla 7. Exactitud del método analítico de cuantificación de clozapina.

PUNTOS INTERMEDIOS (ng/ml)	ABC 1	ABC 2	ABC 3	PROMEDIO	PROMEDIO CONC	DE	CV	DESV ABS
45	17.3691	16.9321	16.5504	46.5112954	46.5112954	0.82877029	1.78%	-3.36%
250	117.752	117.581	117.047	249.84827	249.84827	0.74397296	0.30%	0.06%
850	415.867	415.529	416.589	853.803358	853.803358	1.09542459	0.13%	-0.45%

Tabla 8. Exactitud del método analítico de cuantificación de N-desmetilclozapina.

PUNTOS INTERMEDIOS (ng/ml)	ABC 1	ABC 2	ABC 3	PROMEDIO	PROM CONC	DE	CV	DESV ABS
18	9.33691	9.1932	9.4589	18.1437781	18.1437781	0.23881824	1.32%	-0.80%
100	55.7817	54.9234	55.739	101.016281	101.016281	0.86853068	0.86%	-1.02%
480	267.28	266.88	268.558	481.858981	481.858981	1.57379805	0.33%	-0.39%

Estabilidad. Los fármacos en plasma fueron estables por 90 días a -70 °C. Para clozapina se obtuvo una desviación estándar de 0.5575 a 3.4234, un coeficiente de variación de 0.40 a 1.61% y desviación absoluta con un rango de -0.33 a -4.18%. Para N-desmetilclozapina se obtuvo una desviación estándar de 0.8909 a 2.9101, un coeficiente de variación de 0.18 a 11.72% y desviación absoluta con un rango de -5.66 a 4.59%, ver tabla 9.

Tabla 9. Estabilidad de las muestras plasmáticas después de 90 días de almacenamiento a -70°C.

Clozapina				
Concentración nominal (ng/ml)	Inicial (± CV)	90 días (± CV)	CV (%) 0-90 días	RE (%) 0-90 días
45	48.17 ± 2.28	46.88 ± 0.75	3.62	94.39
250	258.31 ± 3.08	252.07 ± 3.15	1.73	97.92
850	853.80 ± 7.02	852.78 ± 3.42	0.6	99.61
N-desmetilclozapina				
Concentración nominal (ng/ml)	Inicial (± DE)	90 días (± DE)	CV (%) 0-90 días	RE (%) 0-90 días
18	18.17 ± 1.92	18.86 ± 2.21	10.55	97.11
100	98.22 ± 1.22	94.64 ± 2.91	2.92	103.57
480	491.17 ± 4.71	486.34 ± 0.89	0.83	98.27

6.2. Seguimiento farmacoterapéutico.

Se incluyeron 41 pacientes en el estudio, el 50% de los pacientes tenían enfermedades concomitantes, siendo la más frecuente la depresión. La descripción de la población se muestra en la tabla 10. El 12% de estos pacientes consumían algún remedio casero para el tratamiento de sus enfermedades, en su mayoría tomar té de tila para disminuir los nervios y los masajes en la cabeza con aceites relajantes. El 12.2% de la población en estudio era fumadora, cuando esta variable se incluyó en un modelo lineal múltiple como una

covariable, no se encontró relación entre el conteo de neutrófilos, el consumo de tabaco y los niveles plasmáticos de CLZ y DMC, $p= 0.893$ y $P= 0.905$, respectivamente.

El promedio de los niveles plasmáticos de los pacientes fue mayor en el género femenino tanto para CLZ como para DMC, sin embargo, el promedio de la dosis fue menor para este género.

Los pacientes, además de la clozapina, tenían tratamiento con otros medicamentos, las interacciones que se encontraron fueron sinérgicas y el 100% de ellas se buscaron intencionadamente por el médico, tabla 11. Es importante mencionar que ninguno de los medicamentos tuvo efecto sobre el conteo de las células blancas.

La educación sanitaria brindada tanto al paciente como al familiar por parte del farmacéutico ayudó a aumentar la adherencia al tratamiento, la cual fue 9.5% mayor y casi el 49% de los pacientes lograron tener adherencia al tratamiento, estos resultados son mayores a los reportados en otros estudios (Gibson, 2013. Glimer, 2004). La metodología utilizada para evaluar la adherencia al tratamiento fue el conteo de tabletas en citas al azar, el interrogatorio al paciente, a su familiar a cargo y la medición de los niveles plasmáticos de CLZ Y DMC.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la eficacia del tratamiento, se observó mejoría en la escala de PANSS en el 95% de los pacientes, siendo mayor cuando el paciente tenía 6

meses o más con el tratamiento con CLZ, el 45% de los pacientes lograron conseguir trabajo y adaptarse a su ambiente laboral, mientras que; el 5% de los pacientes se trasladaba solo a su lugar de trabajo en transporte público.

Finalmente, se realizó el análisis estadístico de los resultados de GSH como marcador de estrés oxidante pero no se encontró correlación con significancia, así como; no se encontró correlación con los hábitos de consumo de tabaco y marihuana con las concentraciones plasmáticas.

Tabla 10. Estadística descriptiva de la población en estudio.

Parámetros	Número	Promedio ± DE	Promedio (rango)
Edad (años)			
Masculino	22 (53.7%)	34.68 ± 1.58	36 (23 – 50)
Femenino	19 (46.3%)	31.58 ± 1.29	35 (26 – 43)
Duración Clozapina (meses)			
Masculino		10.05 ± 1.74	10 (1 - 32)
Femenino		6.63 ± 1.15	6 (1 – 24)
Dosis Clozapina (mg/día)			
Masculino		222.73 ± 42.95	150 (100 – 900)
Femenino		105.26 ± 8.46	100 (50 – 200)
Niveles Clozapina (ng/mL)			
Masculino		290.11 ± 51.56	203.25 (44- 846)
Femenino		336.36 ± 29.16	321.77 (91 – 572)
Niveles N-desmetilclozapina (ng/mL)			
Masculino		134.98 ± 12.78	108.93 (28 – 308)
Femenino		127.17 ± 16.91	133.78 (47 – 245)
Consumo	Número	Porcentaje (%)	
Tabaco	5	12.20	
Marihuana	2	4.90	
Alcohol	3	7.30	
Café	6	14.60	

Tabla 11. Tratamiento farmacológico concomitante.

Medicamento	Pacientes
Clonazepam	16 (30%)
Fluoxetina	12 (22%)
Paroxetina	5 (9%)
Litio	4 (7%)
Mirtazapina	3 (6%)
Metformina	2 (4%)
Sulpirida	2 (4%)
Valproato de Magnesio	2 (4%)
Venlafaxina	2 (4%)
Duloxetina	1 (2%)
Escitalopram	1 (2%)
Imipramina	1 (2%)
Losartán	1 (2%)
Omeprazol	1 (2%)
Pregabalina	1 (2%)

Después de realizar análisis bivariados, se encontró que las concentraciones plasmáticas de CLZ y DMC se correlacionaron negativamente con el conteo de neutrófilos y leucocitos, ver las figuras 5 y 6 y tabla 12. Además, se encontró que el tiempo que el paciente tomaba CLZ y la dosis de CLZ se asociaron significativamente con el recuento de neutrófilos y leucocitos. Se aplicaron modelos de regresión lineal múltiple para obtener estimaciones de parámetros para los determinantes independientes de los conteos, tomando como variable dependiente el conteo de neutrófilos o leucocitos, tabla 13. Se puede observar que la concentración plasmática, la duración del tratamiento y la dosis de CLZ son determinantes para el conteo de neutrófilos ($R^2 = 0.447$). Asimismo, la correlación del conteo de leucocitos contra a los niveles plasmáticos de CLZ y el tiempo de CLZ, mostró un $R^2 = 0.461$. Como se

puede observar, la concentración de DMC ya no era un determinante independiente del conteo de neutrófilos. En el caso del conteo de leucocitos, el tiempo de ingesta de CLZ es significativo después de aplicar el análisis de regresión, pero la dosis de CLZ ya no fue determinante.

En relación con la seguridad de la medicación, se presentaron 3 sospechas de reacciones adversas (SRAMs) en 3 pacientes diferentes. Solo una fue severa, aumento del intervalo QT y fue confirmado con un electrocardiograma, por lo cual el farmacéutico sugirió una disminución de la dosis y la SRAMs revirtió después de una semana.

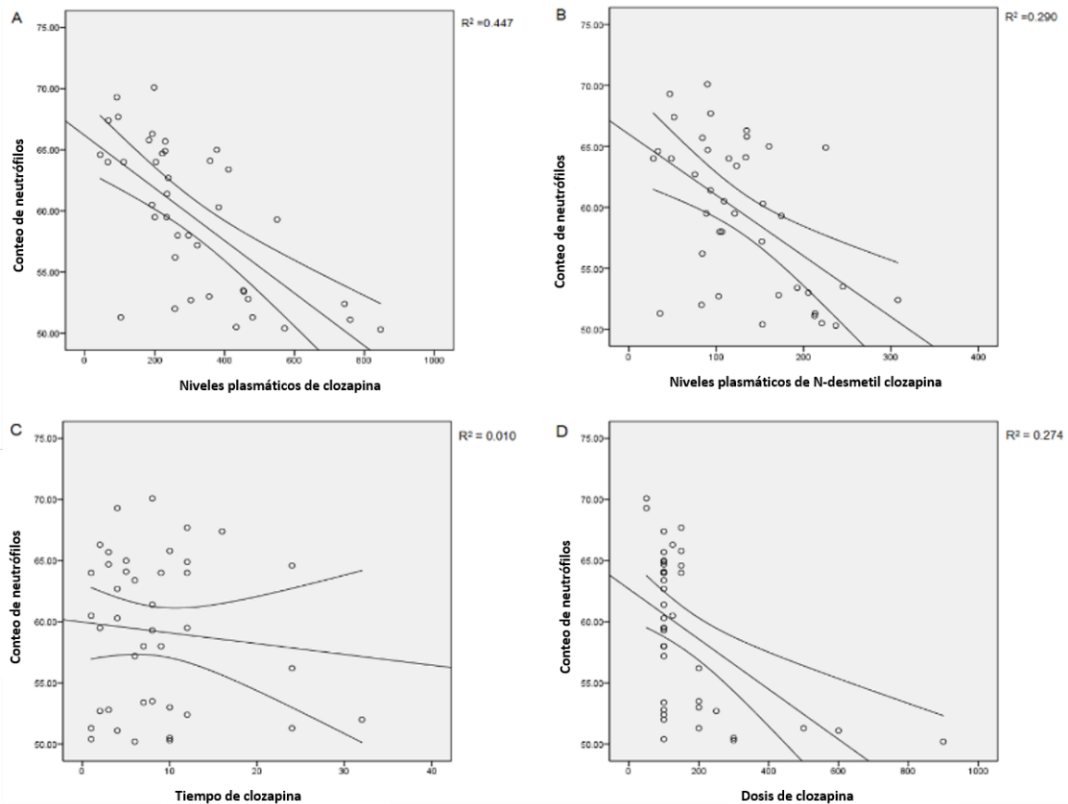


Figura. 5. Diagrama de dispersión que muestra las principales relaciones entre el conteo de neutrófilos y los niveles de CLZ y DMC.

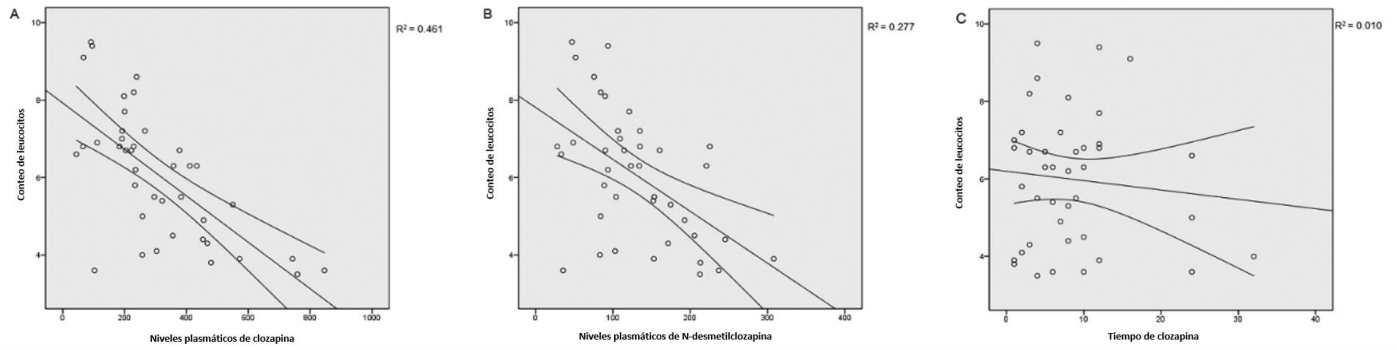


Figura 6. Diagrama de dispersión que muestra las principales relaciones entre el conteo de leucocitos y los niveles de CLZ y DMC.

Tabla 12. Resultados de las correlaciones Spearman y Pearson entre los biomarcadores de CLZ y DMC.

C		Neutrófilos	Leucocitos
Niveles plasmáticos de CLZ	Coefficiente de correlación (ρ)	(-0.703) (-0.669)	(-0.712) (-0.679)
	P	(0.001) (0.001)	(0.001) (0.001)
Niveles plasmáticos de DMC	Coefficiente de correlación (ρ)	(-0.448) (-0.538)	(-0.476) (-0.526)
	P	(0.004) (0.001)	(0.002) (0.001)

Tabla 13. Resultados de los análisis de regresión múltiple usando biomarcadores de CLZ y DMC y el conteo de células blancas.

Variable	Neutrófilos		Leucocitos	
	Coefficiente estandarizado	P	Coefficiente estandarizado	P
Niveles plasmáticos CLZ	-0.631	0.004	-0.725	0.001
Dosis CLZ	-0.262	0.043	-0.198	0.125
Tiempo CLZ	-0.267	0.024	-0.271	0.023
Niveles plasmáticos DMC	0.031	0.875	0.094	0.634

VII. DISCUSIÓN

El método analítico para la cuantificación de las concentraciones plasmáticas de CLZ y DMC mostró ser selectivo, preciso y exacto con un excelente porcentaje de recuperación. Se demostró que el método es adecuado para cuantificar tanto al fármaco como su principal metabolito, no solo para el propósito del presente estudio, sino para ser utilizado en estudios de farmacovigilancia intensiva de este medicamento o para usarlo en cualquier otro estudio que requiera medir las concentraciones de clozapina y su metabolito.

Los niveles plasmáticos observados en las muestras de los pacientes están en el rango asociado con la eficacia de CLZ y están por debajo de los niveles relacionados con los signos y síntomas de toxicidad observados en otros estudios (Buur-Rasmussen, 1999. Spina, 2000).

Al igual que el estudio realizado por Salazar-Pereyra y cols., encontramos que los niveles plasmáticos de CLZ fueron mayores para el género femenino, no obstante que las dosis administradas fueron menores que en los hombres. Aunque, en ese estudio (Salazar-Pereyra y cols., 2011) no mencionan los niveles de DMC, que en el presente estudio también fueron mayores en el género femenino. También existen diferencias con los valores reportados en población extranjera, un metaanálisis realizado por Siskind (2021) donde incluyeron 20 estudios de diferentes nacionalidades (7 europeos, 6 de norte américa, 6 asiáticos y un australiano) en los que reclutaron a 1019 pacientes, los niveles de CLZ se

encontraron en un rango de 221 a 791 ng/ml, como podemos observar los niveles plasmáticos en población mexicana son mayores a los reportados en otros países.

En este estudio se observó un aumento de la adherencia al tratamiento, casi el 49% de los pacientes lograron tener adherencia al tratamiento con respecto a lo observado al inicio, esto debido al seguimiento farmacoterapéutico realizado por el farmacéutico por lo que la calidad de vida del paciente mejoró. Se estima que la mitad de los pacientes, con esquizofrenia dejan de tomar habitualmente el 30% o más de la medicación prescrita y la falta de adherencia se asocia con consecuencias clínicas graves como mayor riesgo de recaídas, suicidio o conductas agresivas graves, entre otras; lo que se asocia a costos elevados tanto económicos como psicosociales (Crespo-Facorro y cols, 2017). Por lo tanto queda constatado que cuando se tiene un seguimiento directo con el paciente se obtienen mejores resultados en la terapéutica mejorando así la calidad de la atención del paciente.

Los resultados más relevantes de este estudio, el principal resultado de este estudio es la correlación significativa observada entre los niveles plasmáticos de CLZ y el recuento de neutrófilos y leucocitos de los pacientes. Consideramos que esta relación es importante, porque se ha sugerido que el mecanismo de la agranulocitosis inducida por clozapina, es el resultado del metabolismo del medicamento, aunque esto todavía no está completamente claro. La transformación metabólica de CLZ para producir especies reactivas de oxígeno y iones de nitrógeno, es realizada por el sistema NADPH oxidasa / mieloperoxidasa, así como por el CYP3A4, CYP2D6 y CYP1A2 principalmente (Wiciński, 2018) y esta biotransformación

podría ser responsable de la disminución en el conteo de leucocitos (Winnie, 2014). Otra opción es que la CLZ en sí misma puede actuar en los leucocitos para promover la muerte celular por apoptosis, según lo reportado por Bergemann, donde encontraron un aumento de 8 veces la concentración de leucocitos intracelulares de CLZ en pacientes que sufren leucocitopenia, en comparación con los pacientes del grupo control sin el efecto adverso. Por lo tanto, la CLZ puede activar directamente el ion nitrenio a través de dos isoenzimas, y luego promover la hemotoxicidad. Los resultados presentados aquí están en desacuerdo con los de Smith en 2017, donde encontraron una correlación positiva entre el recuento de neutrófilos y las concentraciones plasmáticas de DMC; otros autores (Hasegawa, 1994; Oyewumi, 2002) no encontraron correlación entre la concentración plasmática de CLZ y el conteo celular. Las diferencias entre los resultados obtenidos en este estudio y los otros relacionados con el tema se puede explicar por dos factores, 1) Diferencias metodológicas, algunos estudios son informes de casos de pacientes con agranulocitosis o son estudios longitudinales a corto plazo. 2) Diferencias en la genética de las poblaciones y un mayor porcentaje de fumadores en el estudio de Smith 2017, pueden dar cuenta de los diferentes resultados obtenidos. Además de que fue un estudio retrospectivo, por lo que no registraron datos sobre el tiempo en que los pacientes tomaban el medicamento, una covariable significativa en nuestro estudio. También se emplearon dos métodos diferentes para analizar las concentraciones plasmáticas de CLZ y DMC, lo que dificulta la evaluación de la fiabilidad de los resultados. Por el contrario, nuestros datos se obtuvieron después de una validación del método analítico que se empleó.

Es importante mencionar que, en el presente estudio, la dosis que tomaban los pacientes no fue determinante para el conteo leucocitario como lo fue la concentración plasmática de CLZ. Esto sugiere que el metabolismo de CLZ, debido a las diferencias en las isoformas de CYP, puede influir en el efecto de CLZ sobre la toxicidad en neutrófilos y leucocitos, Maggs y Williams, 1995. Por lo que, el monitoreo de las concentraciones plasmáticas de CLZ puede ayudar a detectar una sobredosis de CLZ con la consecuente disminución del conteo de neutrófilos. El monitoreo terapéutico de CLZ también puede ayudar a los psiquiatras a tomar decisiones sobre la optimización y cumplimiento de la terapia con CLZ.

Uno de los objetivos de la farmacovigilancia intensiva es prevenir, si es posible, las reacciones adversas a cualquier nivel, sobre todo las reacciones adversas fatales, tal como la prolongación del intervalo QT que se presentó en un paciente en este estudio. Los niveles plasmáticos de CLZ y DMC del paciente que presentó la reacción adversa fueron 152.90 ng/ml y 93.54 ng/ml respectivamente, y fueron superiores a la media de la población de este estudio. Es importante mencionar que el farmacéutico a cargo del seguimiento farmacoterapéutico sugirió una disminución de la dosis, la cual fue aceptada por el psiquiatra y la sospecha de reacción adversa remitió sin secuelas. Por lo que deja en claro que el realizar un seguimiento farmacoterapéutico y hacer intervenciones oportunas hace la diferencia en la mejora de la atención al paciente, reduciendo los riesgos en el uso de los medicamentos y mejorando considerablemente la terapéutica.

VIII. CONCLUSIONES

- Se validó el método analítico mediante cromatografía líquida de alta resolución para medir los niveles plasmáticos de CLZ y de DMC, lo que permitió obtener la determinación de concentraciones confiables en este estudio.
- Se correlacionaron los niveles plasmáticos de CLZ con el conteo de neutrófilos y leucocitos, los resultados mostraron que existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de CLZ y el conteo de neutrófilos y leucocitos en sangre, pero no se encontró relación con DMC, lo que sugiere que la toxicidad de neutrófilos y leucocitos está asociada con el metabolismo de CLZ.
- La dosis de CLZ ingerida por el paciente fue un determinante deficiente en el conteo de leucocitos.
- Es muy importante realizar el monitoreo terapéutico de CLZ y realizar el ajuste de las dosis de CLZ cuando sea necesario de manera oportuna, para mantener una dosificación terapéutica segura sin la presencia de efectos adversos.
- El seguimiento farmacoterapéutico realizado por un farmacéutico, permite la detección temprana de sospechas de reacciones adversas y aumenta la adherencia de los pacientes al tratamiento.

IX. PERSPECTIVAS

En caso de poder continuar este estudio se sugiere aumentar el tamaño de muestra con una población del estudio multicéntrica, también medir otros marcadores de estrés oxidante, con el aducto de nitroso- glutatión. También realizar estudios de biología molecular para tipificar la isoforma CYP 450 3A4, 1A2 y 2D6, e implementar el Servicio de Atención Farmacéutica para brindarle a los pacientes un seguimiento farmacoterapéutico.

X. REFERENCIAS

- Abi-Dargham, A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol.* 2007, 78, 133–164.
- Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: Emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res.* 2000, 31, 302–312.
- Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, et al. Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. *N Engl J Med* 1993; 329: 162–167.
- Angrist B, Sathananthan G, Wilk S, Gershon S. Amphetamine psychosis: behavioral and biochemical aspects. *J Psychiatr Res.* 1974; 11: 13-23.
- Archer T. Effects of exogenous agents on brain development: stress, abuse and therapeutic compounds. *CNS Neurosci. Ther.* 2011. 17 (5), 470–489.
- Baba H, Suzuki T, Arai H, Emson PC. Expression of nNOS and soluble guanylate cyclase in schizophrenic brain. *Neuroreport.* 2004. 15 (4), 677–680.
- Bahena-Trujillo R, Flores G. y Arias MA. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed.* 2000; 11: 39-60.
- Ballesteros, A., Summerfelt, A., Du, X., Jiang, P., Chiappelli, J., Tagamets, M., O'Donnell, P., Kochunov, P., Hong, L.E. Electrophysiological intermediate biomarkers for oxidative stress in schizophrenia. *Clin. Neurophysiol.* 2013. 124 (11), 2209–2215.
- Baptista T, Carrizo E, Fernandez E, et al. Colonic transit diagnostic test shows significant gastrointestinal hypomotility in clozapine treated patients in comparison with subjects treated with other antipsychotics. *Schizophr Res* 2015; 166: 207–211

- Baser O, Xie L, Pesa J, Durkin M. Healthcare utilization and costs of veterans health administration patients with schizophrenia treated with paliperidone palmitate long-acting injection or oral atypical antipsychotics. *J Med Econ.* 2015;18(5):357–65.
- Bastiampillai T, Allison S and Gupta A. The clinical utility of therapeutic drug monitoring for clozapine. *Aust N Z J Psychiatry* 2017; 51: 295–296.
- Ben Othmen L, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, Kerkeni A. Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2008. 32 (1), 155–159.
- Benes FM. The GABA system in schizophrenia: Cells, molecules and microcircuitry. *Schizophr. Res.* 2015, 167, 1–3.
- Benros ME, Mortensen, P.B., Eaton, W.W. Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012. 1262 (1), 56–66.
- Bergemann N, Abu-Tair F, Aderjan R, Kopitz J. High clozapine concentrations in leukocytes in a patient who developed leukocytopenia. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* 2007; 31:1068-1071.
- Bernstein HG, Heinemann A, Krell D, Dobrowolny H, Biela H, Keilhoff G, Bogerts B. Hypothalamic nitric oxide synthase in affective disorder: focus on the suprachiasmatic nucleus. *Cell. Mol. Biol.* 2005. 51 (3), 279–284.
- Bird AM, Smith TL, Walton AE. Current treatment strategies for clozapine-induced sialorrhea. *Ann Pharmacother* 2011; 45: 667–675.

- Bokovi M, Vovk T, Kores-Plesnišar B, Grabnar I, Brown, A.S. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* 2011 93 (1), 23–58.
- Borja J y Souto M. Importancia de la farmacovigilancia en la práctica del médico de familia. *SEMERGEN.* 2006: 32 (7), 334-338.
- Brunzell DH, McIntosh JM. Nicotinic acetylcholine receptors modulate motivation to self-administer nicotine: Implications for smoking and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2012, 37, 1134–1143.
- Brzustowicz LM, Simone J, Mohseni P, Hayter JE, Hodgkinson KA, Chow EW, Bassett AS Linkage disequilibrium mapping of schizophrenia susceptibility to the CAPON region of chromosome 1q22. *Am. J. Hum. Genet.* 2004. 74 (5), 1057–1063.
- Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Bernstein D, Yolken RH. Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2001. 58 (11), 1032–1037.
- Bunney BS. Clozapine: a hypothesized mechanism for its unique clinical profile. *Br J Psychiatry Suppl* 1992: 17–21.
- Buur-Rasmussen B, Brøsen K. Cytochrome P450 and therapeutic drug monitoring with respect to clozapine. *Eur Neuropsychopharmacology.* 1999; 9:453-459.
- Cadeddu G, Deidda A, Stochino ME, et al. Clozapine toxicity due to a multiple drug interaction: a case report. *J Med Case Rep* 2015; 9: 77.
- Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 2009, 459, 663–667.

- Cherry S, Siskind D, Spivak V, et al. Fever, confusion, acute kidney injury: is this atypical neuroleptic malignant syndrome following polypharmacy with clozapine and risperidone? *Australas Psychiatry* 2016; 24: 602–603.
- Chetty M, Murray M. CYP-mediated clozapine interactions: how predictable are they? *Curr Drug Metab* 2007; 8: 307–313
- Chokhawala K, Stevens L Antipsychotic medications. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2020.
- Citrome L, McEvoy JP, Saklad SR. Guide to the management of clozapine-related tolerability and safety concerns. *Clin Schizophr Relat Psychoses* 2016; 10: 163–177.
- Codoner-Franch P, Tavares-Alonso S, Simo-Jorda R, Laporta-Martin P, Carratala-Calvo A, Alonso-Iglesias E. Vitamin D status is linked to biomarkers of oxidative stress, inflammation, and endothelial activation in obese children. *J. Pediatr.* 2012. 161 (5), 848–854.
- Cohen D, Bogers JP, Van Dijk D, et al. Beyond white blood cell monitoring: screening in the initial phase of clozapine therapy. *J Clin Psychiatry* 2012; 73: 1307–1312
- Contestabile, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000 32 (2–3), 476–509.
- Coughlin JM, Ishizuka K, Kano SI, Edwards JA, Seifuddin FT, Shimano MA, Daley EL, Zandi PP, Leweke FM, Cascella NG, Pomper MG, Yolken RH, Sawa A. Marked reduction of soluble superoxide dismutase-1 (SOD1) in cerebrospinal fluid of patients with recent-onset schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 2013. 18 (1), 10–11.

- Coyle J. The neurochemistry of schizophrenia. En Siegel G. (Ed.), Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Canada: British Library Cataloguing in Publication data. 2006; 875-86.
- Crespo-Facorro B, Bernardo M, Argimon J, Arrojo M, Bravo-Ortiz M, Cabrera-Cifuentes A, Carretero-Román J, Franco-Martín M, García-Portilla P, Haro J, Olivares J, Penadés R, Pino-Montes J, Sanjuán J y Arango C. Effectiveness, efficiency and efficacy in the multipimensional treatment of schizophrenia: Rethinking project. Journal of Psychiatric and Mental Health. 2017: 4-20.
- Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. Pharmacol. Biochem. Behav. 2007. 86 (2), 189–199.
- Crilly J. The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. Hist Psychiatry. 2007; 18: 39–60.
- Das I, Khan NS, Puri BK, Sooranna SR, De Belleruche J, Hirsch SR. Elevated platelet calcium mobilization and nitric oxide synthase activity may reflect abnormalities in schizophrenic brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. 212 (2), 375–380.
- Dalack GW, Becks L, Hill E, Pomerleau OF, Meador-Woodruff JH. Nicotine withdrawal and psychiatric symptoms in cigarette smokers with schizophrenia. Neuropsychopharmacology 1999, 21, 195–202.
- De Berardis D, Serroni N, Campanella D, et al. Safety and efficacy of combined clozapine azathioprine treatment in a case of resistant schizophrenia associated with Behcet’s disease: a 2-year follow-up. Gen Hosp Psychiatry 2013; 35: 213e9–213e11.

- Demler TL, Morabito NE, Meyer CE, et al. Maximizing clozapine utilization while minimizing blood dyscrasias: evaluation of patient demographics and severity of events. *Int Clin Psychopharmacol* 2016; 31: 76–83
- Dietrich-Muszalska A, Olas B, Glowacki R., Bald, E. Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2009. 59 (1), 1–7.
- Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P, Cuenod M. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur. J. Neurosci*. 2000. 12 (10), 3721–3728.
- Dietrich-Muszalska A, Olas B. Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry*. 2009. 10 (1), 27–33.
- Divac N, Prostran M, Jakovcevski I, et al. Second-generation antipsychotics and extrapyramidal adverse effects. *Biomed Res Int*. 2014;656-70.
- Drevets W. Schizophrenia. En Zigmond, et al. editores. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press, 1999: 1554
- Dumortier G, Mahe V, Pons D, et al. Clonic seizure associated with high clozapine plasma level. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2001; 13: 302–303.
- Dunk LR, Annan LJ, Andrews CD. Rechallenge with clozapine following leucopenia or neutropenia during previous therapy. *Br J Psychiatry* 2006; 188: 255–263.
- Eaton WW, Byrne M, Ewald H, Mors O, Chen CY, Agerbo E, Mortensen PB. Association of schizophrenia and autoimmune diseases: linkage of Danish national registers. *Am. J. Psychiatry*. 2006. 163 (3), 521–528

- Ebisch SJ, Salone A, Ferri F, et al. Out of touch with reality? Social perception in first-episode schizophrenia. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2013; 8: 394–403.
- Eide DJ. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics*. 2011. 3 (11), 1124–1129.
- Eiermann B, Engel G, Johansson I, et al. The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine. *Br J Clin Pharmacol*. 1997; 44: 439–446.
- Ellman LM, Deicken RF, Vinogradov S, Kremen WS, Poole JH, Kern DM, et al. Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8. *Schizophr Res*. 2010; 121(1-3):46-54
- Emiliani FE, Sedlak TW, Sawa A. Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old story. *Curr. Opin. Psychiatry*. 2014. 27 (3), 185–190.
- Erhardt S, Schwieler L, Imbeault S, Engberg G. The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology*. 2017 Jan;112(Pt B):297-306.
- Escamilla-Orozco R, Becerra-Palars C, Armendáriz-Vázquez Y, Corlay-Noriega, I, Herrera-Estrella M, Llamas-Núñez R, Meneses-Luna O, Quijada-Gaytán J, Reyes-Madrigal F, Rosado-Franco A, Rosel-Vales M y Saucedo-Uribe E. Tratamiento de la esquizofrenia en México: recomendaciones de un panel de expertos. *Gaceta Médica de México*. 2021: 1-12
- Essali A, Al-Haj Haasan N, Li C, et al. Clozapine versus typical neuroleptic medication for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 1.

- Every-Palmer S, Ellis PM, Nowitz M, et al. The Porirua protocol in the treatment of clozapine induced gastrointestinal hypomotility and constipation: a pre- and post-treatment study. *CNS Drugs* 2017; 31: 75–85
- Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolyniec PS, McGrath JA, Steel G, Nestadt G, Liang KY, Hagan RL, Valle D, Pulver A. Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am. J. Hum. Genet.* 2005. 77 (6), 918–936.
- Fang J, Coutts RT, McKenna KF, et al. Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 358: 592–599.
- Fantin M, Marti M, Auberson P, Morari M. NR2A and NR2B subunit containing NMDA receptors differentially regulate striatal output pathways. *J. Neurochem.* 2007. 103 (6), 2200–2211.
- Fejgin K, Palsson E, Wass C, Svensson L, Klamer D. Nitric oxide signaling in the medial prefrontal cortex is involved in the biochemical and behavioral effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology.* 2008. 33 (8), 1874–1883.
- First BM. *DSM 5 Handbook of Differential Diagnosis.* American Psychiatric Publishing. England. 2014.
- Flatow J, Buckley P, Miller BJ. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 2013. 74 (6), 400–409.

- Forchuk C, Norman R, Malla A, Martin ML, McLean T, Cheng S, Diaz K, McIntosh E, Rickwood A, Vos S, et al. Schizophrenia and the motivation for smoking. *Perspect. Psychiatr. Care* 2002, 38, 41–49.
- Frampton JE. Brexpiprazole: a review in schizophrenia. *Drugs*. 2019; 79: 189–200.
- Freedman R, Olincy A, Ross RG, Waldo MC, Stevens KE, Adler LE, Leonard S. The genetics of sensory gating deficits in schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.* 2003, 5, 155–161.
- Freeman D, Oyewumi K. Will routine therapeutic drug monitoring have a place in clozapine therapy? *Clin Pharmacokinet* 1997; 32:93-100.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 2011. 15 (6), 1583–1606.
- Gallo EF, Iadecola C. Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase. *J. Neurosci.* 2011. 31 (19), 6947–6955.
- Garbutt JC, Van Kammen DP. The interaction between GABA and dopamine: Implications for schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 1983, 9, 336–353.
- Gibson S, Brand SL, Burt S, Boden ZVR, Benson O. Understanding treatment non-adherence in schizophrenia and bipolar disorder: a survey of what service users do and why. *BMC Psychiatry.* 2013; 13: 153.
- Glimer TP, Dolder CR, Lacro JP, Folsom DP, Lindamer L, García P, Jeste DV. Adherence to treatment with antipsychotic medication and health care cost among Medicaid beneficiaries with schizophrenia, *Am J Psychiatry.* 2004; 161: 692-9.

- Grace AA. Dopamine system dysregulation by the hippocampus: implications for the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012. 62(3): 1342-8.
- Goldman-Rakic PS, Selemon LD. Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 1997. 23 (3), 437–458.
- Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, Deppen P, Preisig M, Ruiz V, Steullet P, Tosic M, Werge T, Cuenod M, Do KQ. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. 104 (42), 16621–16626.
- Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. *Mol. Cell.* 2010 40 (2), 333–344.
- Hanson DR, Gottesman II. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Med Genet.* 2005; 6: 7.
- Haring C, Meise U, Humpel C, Saria A, Fleischhacker W, Hinterhuber H. Dose-related plasma levels of clozapine: influence of smoking behavior, sex and age. *Psychopharmacology* 1989; 99:S38-S40.
- Hasegawa M, Cola P, Meltzer H. Plasma clozapine and desmethyl clozapine levels in clozapine-induced agranulocytosis. *Neuropsychopharmacology*. 1994; 11: 45–7.
- Henderson DC, Daley TB, Kunkel L, et al. Clozapine and hypertension: a chart review of 82 patients. *J Clin Psychiatry* 2004; 65: 686–689
- Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation

are increased in different forms of schizophrenia. *Mol. Psychiatry*. 2001. 6 (1), 66–73.

- Hippus H. The history of clozapine. *Psychopharmacology* 1989; 99: S3–S5
- Hinze-Selch D, Becker EW, Stein GM, et al. Effects of clozapine on in vitro immune parameters: a longitudinal study in clozapine-treated schizophrenic patients. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19: 114–122.
- Hummer M, Kemmler G, Kurz M, et al. Sexual disturbances during clozapine and haloperidol treatment for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 631–633.
- Iqbal M., Rahman A., Husain A., Mahmud S., Ryan W., Feldman J. Clozapine: a clinical review of adverse effects and management. *Annals of Clinical Psychiatry*. 2003; 15: 33-48.
- Janowsky DS, El-Yousel MK, Davis JM, Sekerke HJ. Provocation of schizophrenic symptoms by intravenous administration of methylphenidate. *Arch Gen Psychiatry*. 1973 Feb;28(2):185-91
- Jiang Z, Rompala GR, Zhang S, Cowell RM, Nakazawa K. Social isolation exacerbates schizophrenia-like phenotypes via oxidative stress in cortical interneurons. *Biol. Psychiatry*. 2013. 73 (10), 1024–1034.
- Kane J, Honigfeld G, Singer J, et al. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45: 789–796.
- Kane J, Woerner M, Lieberman J. Tardive dyskinesia: Prevalence, incidence and risk factors. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1988 b; 8: 52-56.

- Kapur S, Remington G. Dopamine D (2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. *Biol Psychiatry*. 2001; 50 (11): 873-83.
- Karson CN, Griffin WS, Mrak RE, Husain M, Dawson TM, Snyder SH, Moore NC, Sturner WQ. Nitric oxide synthase (NOS) in schizophrenia: increases in cerebellar vermis. *Mol. Chem. Neuropathol*. 1996. 27 (3), 275–284.
- Kekin I, Bosnjak D, Makaric P, Bajic Z, Rossini Gajsak L, Malojcic B, Boban M, Rojnic Kuzman M. Significantly lower right middle cerebral artery blood flow velocity in the first episode of psychosis during neurocognitive testing. *Psychiatr Danub*. 2018 Jun;30(2):172-182.
- Koga M, Serritella AV, Sawa A, Sedlak TW. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophr Res*. 2016 Sep;176(1):52-71.
- Kondej M, Stępnicki P, Kaczor AA. Multi-target approach for drug discovery against schizophrenia. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 3105.
- Krysta K, Krzystanek M, Jakuszkowiak-Wojten K, Węgielnik-Gałuszko M, Wilkowska A, Wigłusz M, Cubąła W. Influence of Sex Hormones and Inflammatory Processes on Cognition in Schizophrenia. *Psychiatr Danub*. 2019 Sep;31(3):517-519.
- Kwan KY, Lam MM, Johnson MB, Dube U, Shim S, Rasin MR, Sousa AM, Fertuzinhos S, Chen JG, Arellano J., Chan DW, Pletikos M, Vasung L, Rowitch DH, Huang EJ, Schwartz ML, Willemsen R, Oostra BA, Rakic P, Heffer M, Kostovic I, Judas M, Sestan N. Species-dependent posttranscriptional regulation of NOS1 by FMRP in the developing cerebral cortex. *Cell*. 2012 149 (4), 899–911.

- Lafayette JM, Pirl WF, Henderson DC. Low-dose clozapine and diabetic ketoacidosis. *Psychosomatics* 2003; 44: 249–252.
- Lally J, Malik S, Whiskey E, et al. Clozapine associated agranulocytosis treatment with granulocyte colony-stimulating factor/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a systematic review. *J Clin Psychopharmacol* 2017; 37: 441–446.
- Laruelle M, Abi-Dargham A. Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *J Psychopharmacol*. 1999 Dec;13(4):358-71.
- Lasevoli F, Giordano S, Balletta R, et al. Treatment resistant schizophrenia is associated with the worst community functioning among severely-ill highly-disabling psychiatric conditions and is the most relevant predictor of poorer achievements in functional milestones. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016; 65: 34–48.
- Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat. Med.* 2006, 12, 1016–1022.
- Lieberman JA. Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic. *CNS Drugs*. 2004; 18: 251–267.
- Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffman E, Robinson D, Bilder R. Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 2001. 49: 487-499.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1209–1223.

- Limandri BJ. Clinical use of dopamine modulators as third-generation antipsychotic agents. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv.* 2019; 57: 7–11.
- Lopez LV, Kane JM. Plasma levels of second-generation antipsychotics and clinical response in acute psychosis: a review of the literature. *Schizophr Res* 2013; 147: 368–374
- Lowe EJ, Ackman ML. Impact of tobacco smoking cessation on stable clozapine or olanzapine treatment. *Ann Pharmacother* 2010; 44: 727–732.
- Lund BC, Perry PJ, Brooks JM, et al. Clozapine use in patients with schizophrenia and the risk of diabetes, hyperlipidemia, and hypertension: a claims-based approach. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 1172–1176.
- Maes M, Bocchio Chiavetto L, Bignotti S, Battisa Tura GJ, Pioli R, Boin F, Kenis G, Bosmans E, de Jongh R, Altamura CA. Increased serum interleukin-8 and interleukin-10 in schizophrenic patients resistant to treatment with neuroleptics and the stimulatory effects of clozapine on serum leukemia inhibitory factor receptor. *Schizophr Res.* 2002 Apr 1;54(3):281-91.
- Maes M, Bosmans E, Kenis G, et al. In vivo immunomodulatory effects of clozapine in schizophrenia. *Schizophr Res* 1997; 26: 221–225.
- Maggs J, Williams D, Pirmohamed M. The metabolic formation of reactive intermediates from clozapine, a drug associated with agranulocytosis in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275(3): 1463–75.
- Mahadik SP, Pillai A, Joshi S, Foster A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of a combination

of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *Int. Rev. Psychiatry*, 2006, 18(2), 119- 131.

- Mailman RB, Murthy V. Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity? *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 488–501.
- Marson DC, Savage R, Phillips J. Financial capacity in persons with schizophrenia and serious mental illness: Clinical and research ethics aspects. *Schizophr. Bull.* 2006. 32 (1): 81-91.
- Matsuzawa D, Hashimoto K. Magnetic resonance spectroscopy study of the antioxidant defense system in schizophrenia. *Antioxid. Redox Signal.* 2011. 15 (7), 2057–2065.
- McGrath JJ, Eyles DW, Pedersen CB, Anderson C, Ko P, Burne TH, Norgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Mortensen PB. Neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia: a population-based case–control study. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2010. 67 (9), 889–894.
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev.* 2008;30(1):67–76.
- McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med.* 2004; 2:13.
- McGlashan T.H. Is active psychosis neurotoxic. *Schizophr. Bull.* 2006. 32(4): 609-613.

- Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1998. 45 (2), 189–192.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983. 52, 711–760.
- Meltzer H. Duration of a clozapine trial in neuroleptic-resistant schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 1989; 46: 672.
- Meltzer HY. An overview of the mechanism of action of clozapine. *J Clin Psychiatry* 1994; 55(B): 47–52.
- Meltzer HY, Bastani B, Ramirez L, et al. Clozapine: new research on efficacy and mechanism of action. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 1989; 238: 332–339.
- Merritt K, McGuire P, Egerton A. Relationship between Glutamate Dysfunction and Symptoms and Cognitive Function in Psychosis. *Front Psychiatry*. 2013; 4:151.9.
- Messiah EL, Chen CY, Eaton WW. Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths. *Psychiatr Clin North Am*. 2007 Sep;30(3):323-38.
- Meyer U. Anti-inflammatory signaling in schizophrenia. *Brain Behav Immun*. 2011;25(8):1507-18.
- Mico JA, Rojas-Corrales MO, Gibert-Rahola J, Parellada M, Moreno D, Fraguas D, Graell M, Gil J, Irazusta J, Castro-Fornieles J, Soutullo C, Arango C, Otero S, Navarro A, Baeza I, Martinez-Cengotitabengoa M, Gonzalez-Pinto A. Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: a case–control study. *BMC Psychiatry*. 2011. 11, 26.
- Micromedex, base de datos. Segundo cuatrimestre 2021.

- Miljevic C, Nikolic-Kokic A, Saicic ZS, Milosavljevic M, Blagojevic D, Tosevski DL, Jones DR, Spasic MB. Correlation analysis confirms differences in antioxidant defence in the blood of types I and II schizophrenic male patients treated with anti-psychotic medication. *Psychiatry Res.* 2010. 178 (1), 68–72.
- Miyamoto S, Jarskog LF, Fleischhacker WW. Schizophrenia: when clozapine fails. *Curr Opin Psychiatry* 2015; 28: 243–248.
- Moller M, Preez Du, Viljoen JL, Berk FP, Emsley M, Harvey R. Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. *Brain Behav. Immun.* 2013. 30, 156–167.
- Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem.* 2005; 48: 6523–6543.
- Müller N. The role of anti-inflammatory treatment in psychiatric disorders. *Psychiatr Danub.* 2013;25(3):292-8.
- Nakano Y, Yoshimura R, Nakano H, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Association between plasma nitric oxidemetabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: a pilot study. *Hum. Psychopharmacol.* 2010. 25 (2), 139–144.
- Nechifor M, Vaideanu C, Palamaru I, Borza C, Mindreci I. The influence of some antipsychotics on erythrocyte magnesium and plasma magnesium, calcium, copper and zinc in patients with paranoid schizophrenia. *J. Am. Coll. Nutr.* 2004. 23 (5), 549S–551S.

- Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013
- Norma Oficial Mexicana. NOM-012-SSA3-2012. Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013
- Pérez-Neri I, Esquizofrenia, en pocas palabras. Arch Neurocienc (Mex). 2016. 20 (3): 213-216.
- O'Brien JS, Sampson EL. Lipid composition of the normal human brain: graymatter, white matter, and myelin. J. Lipid Res.1965. 6 (4), 537–544.
- O'Callaghan E, Sham P, Takei N, Glover G, Murray RM. Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic. Lancet. 1991. 337 (8752), 1248–1250.
- O'Connell KE, Thakore J, Dev KK. Pro-inflammatory cytokine levels are raised in female schizophrenia patients treated with clozapine. Schizophr Res 2014; 156: 1–8.
- Olincy A, Stevens KE. Treating schizophrenia symptoms with and 7 nicotinic agonist, from mice to men. Biochem. Pharmacol. 2007, 74, 1192–1201.

- Organización Mundial de la Salud. Vigilancia de la seguridad de los medicamentos. 2012. Disponible en: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/WHO-UMC_ReportingGeneralPublic-ESP-GRA3Final.pdf
- Orrico-Sánchez A, López-Lacort C, Muñoz-Quiles C, Sanfélix-Gimeco G, Díez-Domingo J. Epidemiology of schizophrenia and its management over 8-years period using real-world data in Spain. *BMC Psychiatry*. 2020; 20:149-58
- Oyewumi L, Cernovsky Z, Freeman D, Streiner D. Relation of blood counts during clozapine treatment to serum concentrations of clozapine and norclozapine. *Can J Psychiatr*. 2002;47(3):257–61.
- Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci. Lett*. 2010. 479 (3), 317–320.
- Palmer SE, McLean RM, Ellis PM, et al. Life threatening clozapine-induced gastrointestinal hypomotility: an analysis of 102 cases. *J Clin Psychiatry* 2008; 69: 759–768
- Pedrini M, Massuda R, Fries GR, De Bittencourt Pasquali, MA, Schnorr CE, Moreira JC, Teixeira AL, Lobato MI, Walz JC, Belmonte-de-Abreu PS, Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Gama CS. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *J. Psychiatr. Res*. 2012 46 (6), 819–824.

- Perdigues SR, Quecuti RS, Mane A, et al. An observational study of clozapine induced sedation and its pharmacological management. *Eur Neuropsychopharmacol* 2016; 26: 156–161.
- Pérez-Severiano F, Montes S, Gerónimo-Olvera C, Segovia J. Study of oxidative damage and antioxidant systems in two Huntington's disease rodent models. *Methods Mol Biol*. 2013; 1010:177-200.
- Phillips M, Sabas M, Greenberg J. Increased pentane and carbon disulfide in the breath of patients with schizophrenia. *J. Clin. Pathol*. 1993. 46 (9), 861–864.
- Peet M, Shah S, Selvam K, Ramchand CN. Polyunsaturated fatty acid levels in red cell membranes of unmedicated schizophrenic patients. *World J. Biol. Psychiatry*. 2004. 5 (2), 92–99.
- Pierides M. Clozapine monotherapy and ketoacidosis. *Br J Psychiatry* 1997; 171: 90–91.
- Pollmacher T, Schuld A, Kraus T, et al. On the clinical relevance of clozapine-triggered release of cytokines and soluble cytokine-receptors. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2001; 69(2): S65–S74
- Puri BK, Counsell SJ, Ross BM, Hamilton G, Bustos MG, Treasaden IH. Evidence from in vivo 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy phosphodiesterases that exhaled ethane is a biomarker of cerebral n-3 polyunsaturated fatty acid peroxidation in humans. *BMC Psychiatry*. 2008. 8 (1), S2-S5.

- Quinn MT, Ammons MC, Deleo FR. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin. Sci. Lond.* 2006. 111 (1), 1–20.
- Rae CD. A guide to the metabolic pathways and function of metabolites observed in human brain 1H magnetic resonance spectra. *Neurochem. Res.* 2014. 39 (1), 1–36.
- Raedler TJ, Bymaster FP, Tandon R, Copolov D, Dean B. Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2007, 12, 232–246.
- Raffa M, Atig F, Mhalla A, Kerkeni A, Mechri A. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naive first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry.* 2011. 11, 124.
- Raffa M, Mechri A, Othman LB, Fendri C, Gaha L, Kerkeni A. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009. 33 (7), 1178–1183.
- Rajagopal S. Clozapine, agranulocytosis, and benign ethnic neutropenia. *Postgrad Med J* 2005; 81: 545–546.
- Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. 42 (1), 17–20.
- Ramirez J, Garnica R, Boll MC, Montes S, Rios C. Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study. *Schizophr. Res.* 2004. 68 (2–3), 357–361.
- Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M. Kale A, Sitasawad S, Wagh UV, Debsikdar VB, Mahadik SP. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential

polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients.

Psychiatry Res. 2003. 121(2): 109-122.

- Remington G, Lee J, Agid O, et al. Clozapine's critical role in treatment resistant schizophrenia: ensuring both safety and use. *Exp Opin Drug Saf* 2016; 15: 1193–1203.
- Regen F, Herzog I, Hahn E, et al. Clozapine induced agranulocytosis: evidence for an immune-mediated mechanism from a patient specific in-vitro approach. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017; 316: 10–16
- Ritter J, Flower R, Henderson G. Rang & Dale's pharmacology. 9th ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier; 2019.
- Ronaldson KJ. Cardiovascular disease in clozapine-treated patients: evidence, mechanisms and management. *CNS Drugs* 2017; 31: 777–795.
- Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3: 353–359.
- Ruiz-Litago F, Seco J, Echevarria E, Martinez-Cengotitabengoa M, Gil J, Irazusta J, Gonzalez-Pinto AM. Adaptive response in the antioxidant defence system in the course and outcome in first-episode schizophrenia patients: a 12-months follow-up study. *Psychiatry Res*. 2012. 200 (2–3), 218–222.
- Saetre P, Emilsson L, Axelsson E, Kreuger J, Lindholm E, Jazin E. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. *BMC Psychiatry*. 2007 7, 46.

- Salazar-Pereyra A, Rojas I, Ramírez-Bermúdez J, Castro-Román R, Castro-Torres N y Jung-Cook H. Monitoreo de las concentraciones plasmáticas de clozapina en pacientes con Esquizofrenia. Arch Neurocién. 2011; 16: 4-7.
- Salem H, Nagpal C, Pigott T, et al. Revisiting antipsychotic-induced akathisia: current issues and prospective challenges. Curr Neuropharmacol. 2017; 15: 789–798.
- Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. Brain Behav Immun. 2010;24(4): 525-8.
- Saykin AJ, Shtasel DL, Gur RE, Kester DB, Mozley LH, Stafiniak P, Gur RC. Neuropsychological deficits in neuroleptic naive patients with first-episode schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 1994 Feb;51(2):124-31.
- Secretaría de Salud (2018). Afecta esquizofrenia y depresión más a hombres que a las mujeres. Recuperado de: <https://www.gob.mx/issste/prensa/afecta-esquizofrenia-y-depresion-mas-a-los-hombres-que-a-las-mujeres?idiom=es>
- Schmitz T, Chew LJ. Cytokines and myelination in the central nervous system. TheScientificWorld JOURNAL. 2008; 8: 1119-47.
- Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. Pediatrics. 2004. 113 (6), 1776–1782.
- Sethy VH, Ellerbrock BR, Wu H. Comparative dopaminergic and muscarinic antagonist activity of clozapine and haloperidol. Life Sci 1996; 58: 585–590.
- Siskind D, McCartney L, Goldschlager R, et al. Clozapine v. first- and second-generation antipsychotics in treatment-refractory schizophrenia: systematic review and metaanalysis. Br J Psychiatry 2016; 209: 385–392.

- Siskind D, Sharma M, Pawar M, Pearson E, Wagner E, Warren N and Kisely S. Clozapine levels as a predictor for therapeutic response: A systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 2021; 1-11
- Smeland O, Bahrami S, Frei O, Shadrin A, O'Connell K, Savage J, Watabe K, Krull F, Bettela F, Steen NE, Ueland T, Posthuma D, Djurovic S, Dale A, Andreassen Ole. Genome-wide analysis reveals extensive genetic overlap between schizophrenia, bipolar disorder and intelligence. *Molecular Psychiatry.* 2019; 25: 844-53.
- Smith RL, Haslemo T, Andreassen OA, Eliasson E, Dahl ML, Spigset O, Molden E. Correlation Between Serum Concentrations of N-Desmethylclozapine and Granulocyte Levels in Patients with Schizophrenia: A Retrospective Observational Study. *CNS Drugs.* 2017; 31: 991-997.
- Smith M, Hopkins D, Peveler RC, et al. First-v. second-generation antipsychotics and risk for diabetes in schizophrenia: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry* 2008; 192: 406–411.
- Smith RS, Maes M. The macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia: additional evidence. *Med. Hypotheses.* 1995 45 (2), 135–141.
- Smyth AM, Lawrie SM. The neuroimmunology of schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2013; 11 (3): 107-17.
- Solmi M, Murru A, Pacchiarotti I, et al. Safety, tolerability, and risks associated with first- and second-generation antipsychotics: a state-of the art clinical review. *Ther Clin Risk Manag.* 2017; 13: 757–777.

- Spina E, Avenoso A, Facciosa M, Ancione M, Madia A, Ventimiglia A, Perucca. Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics. *Psychopharmacology*. 2000; 148: 83-89.
- Sporn AL, Vermani A, Greenstein DK, et al. Clozapine treatment of childhood-onset schizophrenia: evaluation of effectiveness, adverse effects, and long-term outcome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2007; 46: 1349–1356.
- Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berlin)*. 2001. 158 (2), 140–145.
- Stahl SM. *Stahl’s essential psychopharmacology: prescriber’s guide*. 5th ed. New York, NY: Cambridge University Press, 2014; 802
- Stepnicki P, Kondej M, Kaczor AA. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules*. 2018; 23 (8): 2087.
- Suzuki E, Nakaki T, Nakamura M, Miyaoka, H. Plasma nitrate levels in deficit versus non-deficit forms of schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci*. 2003. 28 (4), 288–292.
- Takano H. Cognitive Function and Monoamine Neurotransmission in Schizophrenia: Evidence From Positron Emission Tomography Studies. *Front Psychiatry*. 2018; 9: 228; 1-8.
- Tamminga CA. Partial dopamine agonists in the treatment of psychosis. *J Neural Transm (Vienna)*. 2002; 109: 411–420

- Tandon R. Cholinergic aspects of schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 1999, 174 (S37), 7–11.
- Tang W, Huang K, Tang R, Zhou G, Fang C, Zhang J, Du L, Feng G, He L, Shi Y. Evidence for association between the 5' flank of the NOS1 gene and schizophrenia in the Chinese population. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008. 11 (8), 1063–1071.
- Terpstra M, Vaughan TJ, Ugurbil K, Lim KO, Schulz SC, Gruetter, R. Validation of glutathione quantitation from STEAM spectra against edited 1H NMR spectroscopy at 4 T: application to schizophrenia. *MAGMA.* 2005. 18 (5), 276–282.
- Testani M Jr. Clozapine-induced orthostatic hypotension treated with fludrocortisone. *J Clin Psychiatry* 1994; 55: 497–498.
- Tsai MC, Liou CW, Lin TK, Lin IM, Huang TL. Changes in oxidative stress markers in patients with schizophrenia: the effect of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 2013. 209 (3), 284–290.
- Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat. Rev.* 2010, 11, 100–113.
- Universidad Nacional Autónoma de México (2013). *Ciencia UNAM*. Recuperado de [http://ciencia.unam.mx/leer/160/Esquizofrenia la mente atrapada en delirios y alucinaciones](http://ciencia.unam.mx/leer/160/Esquizofrenia_la_mente_atrapada_en_delirios_y_alucinaciones)
- Universidad Nacional Autónoma de México (2018). *Ciencia UNAM*, cartel: Sufrir de Esquizofrenia. Recuperado de: <http://ciencia.unam.mx/contenido/infografia/36/especial-esquizofrenia-el-desarrollo-de-la-enfermedad->

- Vauquelin G, Bostoen S, Vanderheyden P, et al. Clozapine, atypical antipsychotics, and the benefits of fast-off D2 dopamine receptor antagonism. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385: 337–372.
- Vitek L, Novotny M, Lenicek M, Novotny L, Eberovaj J, Petrasek J, Jirsa M. Serum bilirubin levels and UGT1A1 promoter variations in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2010. 178 (2), 449–450.
- Volpicelli SA, Centorrino F, Puopolo PR, Kando J, Frankenburg FR, Baldessarini RJ, Flood JG. Determination of clozapine, norclozapine, and clozapine-N-oxide in serum by liquid *chromatography* *Clinical Chemistry.* 1993; 39 (8): 1656–1659.
- Von Bernhardt R, Eugenin J. Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* 2012 16 (9), 974–1031.
- Warnez S, Alessi-Severini S. Clozapine: a review of clinical practice guidelines and prescribing trends. *BMC Psychiatry* 2014; 14: 102
- Wassef A, Baker J, Kochan LD. GABA and schizophrenia: A review of basic science and clinical studies. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2003, 23, 601–640.
- Watkins CC, Andrews SR. Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. *Schizophr Res* 2016; 176: 14–22.
- Werner FM, Covenas R. Safety of antipsychotic drugs: focus on therapeutic and adverse effects. *Exp Opin Drug Saf* 2014; 13: 1031–1042.
- White R, Krämer-Albers EM. Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation. *Front Cell Neurosci.* 2014; 7: 284.

- Wicinski M, Weclawicz MM. Clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia: mechanisms and monitoring. *Curr Opin Hematol.* 2018; 25: 22-28.
- Winnie N, Rossoune K, Uetrecht J. Effect of clozapine and olanzapine on neutrophil kinetics: implications for drug-induced agranulocytosis. *Chem. Res. Toxicol.* 2014; 27: 1104-1108.
- Williams AM, Park SH. Seizure associated with clozapine: incidence, etiology, and management. *CNS Drugs* 2015; 29: 101–111.
- WHO. (2018 World Health Organization: Esquizofrenia. Recuperado de <http://www.who.int>)
- Xing G, Chavko M, Zhang LX, Yang S, Post RM. Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression. *Schizophr. Res.* 2002. 58 (1), 21–30.
- Yao JK, Leonard S, Reddy R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis. Markers.* 2006. 22 (1–2), 83–93.
- Yasukawa R, Miyaoka T, Yasuda H, Hayashida M, Inagaki T, Horiguchi J. Increased urinary excretion of biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2007. 153 (2), 203–207.
- Yolken RH, Dickerson FB, Fuller Torrey E. Toxoplasma and schizophrenia. *Parasite Immunol.* 2009. 31 (11), 706–715.
- Zhang JP, Gallego JA, Robinson DG, Malhotra AK, Kane JM, Correll CU. Efficacy and safety of individual second-generation vs. first-generation antipsychotics in first-

episode psychosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2013. 16 (6): 1205–1218.

- Zhang XYTan, YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, Zhou DF. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr. Res.* 2006. 81 (2–3), 291–300.
- Zoubovsky SP, Pogorelov VM, Taniguchi Y, Kim SH, Yoon P, Nwulia E, Sawa A, Pletnikov MV, Kamiya A. Working memory deficits in neuronal nitric oxide synthase knockout mice: potential impairments in prefrontal cortexmediated cognitive function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. 408 (4), 707–712.
- Zuo DY, Wu YL, Yao WX, Cao Y, Wu CF, Tanaka M. Effect ofMK-801 and ketamine on hydroxyl radical generation in the posterior cingulate and retrosplenial cortex of free-moving mice, as determined by in vivo microdialysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007. 86 (1), 1–7.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES

NOMBRE PACIENTE: _____

REGISTRO: _____

No. PACIENTE: _____

TITULO DEL ESTUDIO DE INVESTIGACION.

“Biomarcadores para la farmacovigilancia intensiva en pacientes con esquizofrenia bajo tratamiento con clozapina”.

INVESTIGADORES. Dr. Jesús Ramírez Bermudes Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” México, D.F. Tel 56063822.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO. Este es un estudio que va dirigido a pacientes que como yo han tenido resistencia a los antipsicóticos clásicos, por lo que actualmente tengo tratamiento con clozapina.

En este estudio los investigadores están midiendo las concentraciones de clozapina y su metabolito activo en sangre (cuanto medicamento tengo en la sangre), además de los leucocitos y neutrófilos para detectar agranulocitosis, una reacción adversa de la clozapina.

Si acepto participar en el estudio, que acceder a que me tomen muestras sanguíneas para analizarlas. La información que proporcione será de manera confidencial y los datos que se requieran serán utilizados exclusivamente para la divulgación científica, siempre omitiendo mi identidad.

PROCEDIMIENTO. Si yo acepto participar en este estudio sucederán los siguientes eventos: como paciente seré tratado de la forma habitual como se trata a los pacientes que tienen esquizofrenia. Si requiero de algún tratamiento para el tratamiento de la esquizofrenia, esto no cambiará por el ingreso al estudio.

La participación en el estudio no interfiere con la realización de cualquier estudio para su diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Se me realizarán revisiones continuas calendarizadas por mi médico tratante con el fin de recolectar muestras sanguíneas.

Acudiré a las citas de consulta externa con los investigadores cada semana o cada mes durante 3 meses, según los investigadores me indiquen. Se me realizarán tomas de muestra de sangre (se extraerán dos tubos).

Si yo no acepto ingresar al estudio, recibiré el tratamiento rutinario y habitual que se les da a los pacientes con esquizofrenia, esto es, procedimientos y medicamentos aceptados para su utilización en esta enfermedad, así como todos los cuidados necesarios que se requieran. BENEFICIOS. Le notificarán a mi médico tratante la cantidad de medicamento en sangre que tengo y los niveles de leucocitos que tengo, lo cual le servirá para hacer los cambios que yo requiera en mi tratamiento y tendré un seguimiento estrecho de las condiciones de salud que presente.

RIESGOS. No existe un riesgo y si decido no participar en el estudio, esto no interfiere con el tratamiento habitual que se les brinda a los pacientes con esquizofrenia.

CONFIDENCIALIDAD. Los resultados de todos los estudios y del estado clínico serán discutidos conmigo. Toda la información obtenida en este estudio será considerada confidencial y será usada solo para mi atención y con propósitos de investigación. Mi identidad será confidencial.

DUDAS. Los médicos que forman el grupo de trabajo del estudio me han explicado toda esta información y han ofrecido responder a mis preguntas. Si yo tuviera más preguntas, puedo contactarlos a través de los teléfonos 56063822 Extensiones 3048 y 2005. Podré contactar al doctor responsable de la investigación de lunes a viernes de 10 a 15 horas en la dirección del Hospital de Neuropsiquiatría.

DERECHO A SALIRME DEL ESTUDIO. Mi participación es susceptible de ser suspendida en cualquier momento en que yo lo crea conveniente sin que se afecte la atención médica. En caso de considerarlo necesario, el doctor responsable del estudio podrá dar por terminada mi participación cuando así lo crea necesario.

CONSENTIMIENTO. Yo estoy de acuerdo en participar en el estudio y se me ha proporcionado una copia de este documento y he tenido oportunidad de leerlo.

Nombre y Firma del Paciente:

Fecha _____

Nombre y Firma del Investigador _____

Nombre y firma del Primer Testigo

Nombre y firma del Segundo Testigo

ANEXO 2. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre del paciente: _____

Fecha: _____

Sexo: _____ Edad: _____

¿Fuma? _____ ¿Cuántos cigarros al día? _____ ¿Años de fumador? _____

Años con el diagnóstico de esquizofrenia: _____

Duración de tratamiento con clozapina: _____

Tratamiento no farmacológico: _____

Tratamiento (todo):

MEDICAMENTO	POSOLÓGÍA	DURACIÓN
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		

MEDICIONES:

FECHA	LEUCOCITOS/NEUTRÓFILOS	FECHA	CONC. Clozapina/ N- desmetilclozapina
1.		1.	
2.		2.	
3.		3.	



ANEXO 3. REGISTRO PROTOCOLO
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Insurgentes Sur 3877
Col. La Fama, C.P. 14269
México, D.F., Tel. 56-06-14-07
www.innn.salud.gob.mx

México, D.F., a

DR. DANIEL SAN JUAN ORTA
JEFE DEL DEPTO. DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA,
P R E S E N T E

A fin de cumplir con lo que exige la Ley General de Salud de México, y el Reglamento para Investigación Clínica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, envío a usted:

1. El protocolo titulado “Biomarcadores para la farmacovigilancia intensiva en pacientes con esquizofrenia bajo tratamiento con clozapina” elaborado de acuerdo al formato oficial, firmado por todos los autores. Original y cuatro copias.
2. El formato de identificación del ámbito de estudio del protocolo.

Para su evaluación de acuerdo con los Principios Básicos Científicos aceptados en las Declaraciones sobre Investigación Biomédica en seres humanos, del Helsinki II en 1975, Venecia en 1983, Hong Kong en 1989, Sudáfrica 1996, Edimburgo 2000, que señalan textualmente “el protocolo se remitirá a un comité independiente del investigador y de la entidad patrocinadora, para consideración, comentarios y asesoramiento”, en lo cual se basará la aprobación, en cuyo caso el investigador principal se encargará de la dirección técnica del estudio y tendrá las siguientes atribuciones: cumplir con los procedimientos indicados en el protocolo y solicitar autorización para la modificación en los casos necesarios sobre aspectos de ética y bioseguridad, documentar y registrar todos los datos generados durante el estudio en el expediente clínico y su propio archivo sobre el estudio, elaborar y presentar los informes parciales trimestrales y finales de la investigación y comprometerse en generar un producto científico.

ATENTAMENTE

Nombre y firma del Investigador Principal