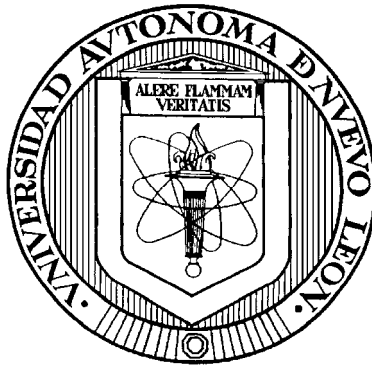


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE SEROTONINA Y FACTOR
PLAQUETARIO-4 EN PLAQUETAS DE PACIENTES
CON TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR**

Por

ROSALINDA SEPÚLVEDA SEPÚLVEDA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA**

Director

**Dr. José Carlos Jaime Pérez
Universidad Autónoma de Nuevo León.**

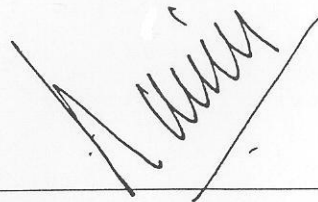
Co-Director

**Dr. Rick A. Rogers
Harvard School of Public Health**

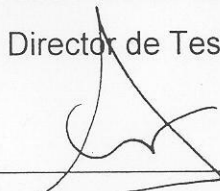
Junio, 2009

DETERMINACIÓN DE SEROTONINA Y FACTOR
PLAQUETARIO-4 EN PLAQUETAS DE PACIENTES
CON TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR

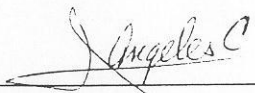
Aprobación de la Tesis:



Dr. med. José Carlos Jaime Pérez
Director de Tesis



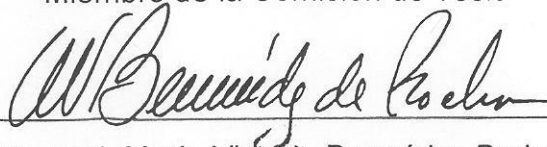
Dr. med. José Alfonso Ontiveros Sánchez de la Barquera
Miembro de la Comisión de Tesis



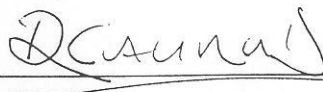
Dr. C. María de los Ángeles Castro Corona
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Norberto López Serna
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. María Victoria Bermúdez Barba
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Dionicio Galarza Delgado

Jefe de la División de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi mas sincero agradecimiento al Dr. José Carlos Jaime Pérez y al Dr. Rick A. Rogers mis asesores de tesis. A mi comisión doctoral integrada por la Dr. med. María Victoria Bermúdez Barba, Dra. María de los Ángeles Castro Corona, Dr. med. Norberto López Serna, Dr. med. José Alfonso Ontiveros Sánchez de la Barquera por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión de este trabajo.

Al BioMedical Imaging Laboratory de la Escuela de Salud Pública de Harvard y al National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) y a mi familia por el apoyo económico que recibí para llevar a cabo este estudio.

A Jean Lai, Elke Pravda, Flavia Cassiola del BioMedical Imaging Laboratory y Centro de Nanoescalas de Harvard (CNS) por enseñarme y permitirme el uso de su equipo e instalaciones y su invaluable amistad para llevar el presente estudio.

A Lic. Enf. Alfredo García Tovar y Srita. Maria Elena Blanco Sánchez por su invaluable apoyo para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mis papás, el Dr. J. Rafael Sepúlveda Garza y la Dra. Rosalinda Sepúlveda de Sepúlveda, a mis hermanos, el Dr. J. Rafael Sepúlveda Sepúlveda y el Dr. Jorge Alberto Sepúlveda Sepúlveda por su invaluable apoyo y su ejemplo de trabajo y perseverancia.

A todas las personas que contribuyeron de alguna u otra forma en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción a los trastornos psiquiátricos.....	1
1.2 Criterios diagnósticos del DSM-IV.....	2
1.2.1 Trastornos del estado de ánimo.....	2
1.2.1.1 Trastorno depresivo mayor.....	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Trastornos depresivos: Un reto diagnóstico.....	6
2.1.1 Teorías de la Etiología de la depresión...	7
2.1.2 Hipótesis Serotoninérgica.....	7
2.1.3 Teoría Inflamatoria.....	9
2.2 Plaquetas y Trastornos Psiquiátricos.....	11
2.2.1 Serotonina Plaquetaria.....	19
2.3 Procedimientos de Microscopía para el Estudio de las Plaquetas.....	23
2.4 Justificación.....	25
2.5 Hipótesis.....	26
2.6 Objetivos del Estudio.....	26
2.6.1 Objetivo General.....	26
2.6.2 Objetivos Específicos.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Selección de Participantes.....	28
3.2 Cálculo del Tamaño de la Muestra.....	29
3.3 Recolección y Procesamiento.....	31
3.4 Microscopía Electrónica.....	32
3.5 Inmunohistoquímica.....	35
4. RESULTADOS	40
4.1 Características de la Población.....	40
4.1.2 Depresión.....	40
4.2 Microscopía Electrónica.....	42
4.3 Inmunohistoquímica.....	46
4.3.1 Análisis Espacial.....	46
4.3.2 Análisis Cuantitativo.....	51
4.3.3 Análisis de Gránulos y HAM-D.....	54
4.3.4 Relación de Gránulos Denso y Alfa.....	56
5. DISCUSIÓN.....	57

6. CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS.....	65
APÉNDICES.....	71
Apéndice 1: Criterios Diagnósticos de DSM-IV.....	71
Apéndice 2: Consentimiento Informado.....	75
Apéndice 3: Escala de Depresión de Hamilton.....	77
Apéndice 4: Evaluación Multiaxial del DSM-IV.....	80
Apéndice 5: Inventario de Depresión de Beck.....	86
Apéndice 6: Ejemplo de Base de Datos.....	88
Apéndice 7: Nombre y Descripción de Micrografías.....	89

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
Tabla 1. Contenido de los Gránulos y Citoplasma de las Plaquetas.....	18
Tabla 2. Poder para Detectar la Diferencia en la Cuenta de Gránulos.....	30
Tabla 3. Cálculos de Tamaño de la Muestra Usando Diferente Poder, Desviación Estándar σ y Diferencia Δ	30
Tabla 4. Hoja de Cálculo.....	39
Tabla 5. Características Demográficas	40
Tabla 6. Características Generales de los Síntomas Depresivos en los Casos de Depresión	41
Tabla 7. Resumen por Grupos del Análisis Cuantitativo Obtenido a Partir de las Micrografías.....	52
Tabla 8. Estadísticas Comparativas de los Gránulos Densos y Alfa.....	53
Tabla 9. Relación de Gránulos Alfa y Gránulos Densos en los Casos y los Tres Controles.....	56

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Fig. 1. Interacción entre un Proceso Inflamatorio, Depresión y Plaquetas.....	12
Fig.2. Micrografía Electrónica de Transmisión de Plaquetas Normales.....	15
Fig. 3. Interacciones de Algunos de los Receptores de la Membrana Plaquetaria que se Unen con Factores de Respuesta Extracelular en Respuesta a la Activación.....	16
Fig. 4. Proceso para Obtener el Análisis Cuantitativo a Partir de las Micrografías.....	38
Fig 5. Micrografías Electrónicas (TEM) de Plaquetas	44
Fig 6. Micrografías Electrónicas de Plaquetas a Mayor Magnificación.	45
Fig. 7. Micrografías Confocales con Doble Tinción de Control Sano y Caso Depresión.....	47
Fig. 8. Micrografías Confocales con Doble Tinción de Control Bipolar y Control Esquizofrenia.....	48
Fig. 9. Grupo de Cuatro Micrografías Confocales de Plaquetas Teñidas con Anticuerpo Anti-serotonina.....	49
Fig 10. Grupo de Cuatro Micrografías Confocales de Plaquetas Teñidas con Anticuerpo Contra Factor Plaquetario-4.....	50

LISTA DE GRÁFICAS

Título	Página
Gráfica 1. Número de Gránulos Densos y Alfa por Plaqueta	53
Gráfica 2. Representación de la Cantidad de Gránulos Densos y Alfa y la Puntuación de HAM-D.....	54
Gráfica 3 Relación del Número de Gránulos Alfa por Gránulos Densos por Plaqueta.....	55
Gráfica 4. Relación del Número de Gránulos Alfa por Gránulos Densos por Plaqueta en Cada Grupo	56

NOMENCLATURA

DSM-IV	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales
HAM- D	Escala de Depresión de Hamilton
xg	Fuerza gravitacional
5-HT	Serotonina
5-HT ₂	Receptor 2 de serotonina
SERT	Transportador de serotonina
g	Gramos
µg	Microgramos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
nm	Nanómetros
M	Molar
µM	Micromoles
°C	Grados centígrados
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales)
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
IDO	indolamina 2,3-deshidrogenasa
NA	Noradrenalina
GABA	ácido γ- aminobutírico
IL	Interleucinas
GP	Glicoproteínas
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
INF-γ	Interferón- gama
NO	Óxido nítrico
APUD	Captación y Descarboxilación del Precursor de las Amias (Amine Precursor Uptake Decarboxylase)
β-FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos- beta
ME	Microscopía Electrónica
PF-4	Factor Plaquetario- 4
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
PDFG	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF-β	Factor transformador de crecimiento- beta
β-TG	Beta- tromboglobulina
MAO	Monoamino oxidasa
vWF	Factor de von Willebrand
PAF	Factor activador plaquetario
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular

SELDI-ToF [®]	Surface Enhanced Laser Desorption/ionization-time of Flight-Mass Spectrometry
D	Daltons
TEM	Transmission Electron Microscopy (Microscopio Electrónico de Transmisión)
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
PPP	Plasma Pobre en Plaquetas
PBS	Phosphate Buffer Saline (amortiguador salino fosfatado)
ddH ₂ O	Agua bidestilada (double distilled water)
NIH	National Institutes of Health (Institutos Nacionales de Salud)
SADHART	Sertraline antidepressant heart attack randomized trial (Estudio Aleatorizado del Antidepresivo Sertralina en Ataque Cardíaco)
SSRI	Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale (Escala de Síndromes Positivos y Negativos)

RESUMEN

Rosalinda Sepúlveda Sepúlveda

Fecha de Graduación: Junio, 2009

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Escuela de Salud Pública de Harvard

**Título del estudio: DETERMINACIÓN DE SEROTONINA Y FACTOR
PLAQUETARIO-4 EN PLAQUETAS DE PACIENTES
CON TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR**

Número de páginas: 89

Candidato para el Grado de
Doctorado en Medicina

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y Método del Estudio: La plaquetas de pacientes con depresión mayor presentan una disminución en la cantidad de serotonina y un aumento del factor plaquetario-4. Se estudiaron plaquetas de un grupo de pacientes con depresión y de controles sanos, bipolares y esquizofrenia. Las plaquetas se procesaron en forma de suspensión para evaluarse con el microscopio confocal (teñidas con anticuerpo contra- serotonina y PF-4) y microscopía electrónica. Se analizaron 100 plaquetas por sujeto con el microscopio confocal y procesadas con el programa *Image J*, produciendo una base de datos para su análisis estadístico con un poder de 86% para detectar una diferencia de 0.4 gránulos entre dos grupos. Este análisis de potencia esta basado en el análisis estadístico *t* de student bilateral con un nivel de significancia alfa de 0.05 analizado con el programa *SPSS* y *excel*.

Contribuciones y Conclusiones: Los gránulos densos de las plaquetas de los pacientes con depresión se encontraron disminuidos comparados con los controles sanos. La relación de gránulos alfa por gránulo denso fue mayor en pacientes con depresión mayor que los controles sanos. La relación de gránulos alfa por gránulo denso fue mayor en pacientes con depresión mayor que los pacientes con esquizofrenia. Esta relación es una herramienta potencialmente útil para brindar un complemento diagnóstico objetivo en los pacientes que sufren depresión mayor en la población general.

FIRMA DEL ASESOR: _____

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a los Trastornos Psiquiátricos

Las enfermedades psiquiátricas se clasifican con base a la identificación de síndromes y ningún síntoma es patognomónico de un trastorno psiquiátrico específico. Por lo tanto, es necesario identificar marcadores biológicos confiables con utilidad para el diagnóstico, progresión y remisión de las enfermedades. Estos marcadores pueden ser localizados en las plaquetas, los cuales combinados con un sistema de diagnóstico basado en trastornos ya establecidos como los referidos en el DSM-IV (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, APA) (1) o la CIE-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades, OMS) (2), pudieran tener la utilidad, en un futuro, para subclassificar los trastornos psiquiátricos en subgrupos neurobiológicos homogéneos.

Actualmente se estima que existen más de 450 millones de personas en el mundo que sufren enfermedades mentales, las cuales ocupan el 12% del peso global de enfermedades (3). En el año 2000, la prevalencia de depresión fue de 1.9% en los varones y de 3.2% en las mujeres, y puede variar en cada población. En México, la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica (ENEP) proporcionó las primeras estimaciones nacionales de la prevalencia de los trastornos mentales. Se estimó que 8.4% de la población ha sufrido un

episodio de depresión mayor alguna vez en la vida con una mediana de edad de inicio de 24 años (4). Los trastornos depresivos ocupan un lugar muy importante en nuestra sociedad y se encuentran en el cuarto lugar como causa de incapacidad en todos los grupos de edad. La depresión puede afectar a los individuos en cualquier etapa de la vida, sin embargo, la incidencia es mayor en los adultos jóvenes. En el 20% de los casos, la depresión tiene una presentación crónica sin remisión (5). El índice de recurrencia para aquéllos que se recuperan de un primer episodio es del 35% en 3 años y del 60% en 12 años. Un desenlace trágico para quienes sufren depresión es el suicidio que sigue siendo una consecuencia común y evitable de los trastornos depresivos. De todos los trastornos psiquiátricos, a la depresión y esquizofrenia se les atribuyen la mayoría de los suicidios (6). Desafortunadamente, se espera que la incidencia y prevalencia de los trastornos depresivos aumenten en los próximos 20 años.

1.2 Criterios Diagnósticos del DSM-IV

1.2.1 Trastornos del Estado de Ánimo

Los trastornos del estado de ánimo incluyen a los trastornos que se caracterizan principalmente con una alteración en el humor del individuo, estos son el trastorno depresivo mayor y el trastorno bipolar (1).

1.2.1.1 Trastorno Depresivo Mayor

El trastorno depresivo mayor se caracteriza por uno o más períodos depresivos mayores de al menos dos semanas de duración durante los cuales se presenta un estado de ánimo depresivo, pérdida del interés o placer en casi todas las actividades. El individuo debe presentar los siguientes síntomas:

A. Presencia de cinco (o más) de los siguientes síntomas durante un período de 2 semanas, que representan un cambio respecto a la actividad previa; uno de los síntomas debe ser **estado de ánimo depresivo o pérdida de interés o de la capacidad para el placer.**

1. Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi a diario según lo indica el propio sujeto o la observación realizada por otros.
2. Disminución acusada del interés o de la capacidad para el placer en todas o casi todas las actividades, la mayor parte del día, casi a diario.
3. Pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso (cambio de más del 5 % del peso corporal en un mes), o pérdida o aumento del apetito casi cada día.
4. Insomnio o hipersomnia casi a diario.
5. Agitación o lentitud psicomotora casi a diario (observable por los demás, no solo sensación de inquietud o de lentitud psicomotriz).
6. Fatiga o pérdida de energía casi a diario.
7. Sentimientos de inutilidad o de culpa excesivos o inapropiados (que pueden ser delirantes) casi a diario.

8. Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o indecisión, casi a diario.
9. Pensamientos recurrentes de muerte, ideación suicida recurrente sin un plan específico, o una tentativa de suicidio o un plan específico para suicidarse.
- B. Los síntomas no cumplen los criterios para un episodio mixto.
- C. Los síntomas provocan malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.
- D. Los síntomas no son debidos a los efectos fisiológicos directos de una sustancia (droga¹ o medicamento) o una enfermedad médica.
- E. Los síntomas no se explican mejor por la presencia de un duelo (después de la pérdida de un ser querido), los síntomas persisten durante más de dos meses o se caracterizan por una acusada incapacidad funcional, preocupaciones mórbidas de inutilidad, ideación suicida, síntomas psicóticos o lentitud psicomotora.

El otro trastorno de estado de ánimo es el trastorno bipolar tipo I que se presenta con episodios maníacos o mixtos (característica esencial de esta enfermedad) y también con episodios depresivos. El trastorno bipolar tiene una prevalencia del 0.4 - 1.6%, se presenta con la misma frecuencia en hombres y mujeres. Esta es una enfermedad con un claro patrón familiar con una influencia genética del 4-24% en familiares de primer grado (1).

¹ El término droga se refiere a sustancia de abuso.

La esquizofrenia es el trastorno mental con síntomas psicóticos² más conocido que se presenta con una prevalencia del 4.4% (7). Es una enfermedad crónica que se presenta en los primeros años de la vida adulta, con un inicio mas temprano en los varones que en las mujeres. Las personas que padecen esta enfermedad tienen un riesgo mas elevado de cometer suicidio. Se le considera una enfermedad de múltiple impacto ya que se ha encontrado que existe una predisposición genética, alteraciones anatómicas cerebrales (neuroimagen estructural), circuitos funcionales (neuroimagen), neuropatología, electrofisiología, neuroquímica, neurofarmacología y neuroevolución, así como factores familiares y sociales (7, 8). Una de las teorías más aceptadas sobre la fisiopatología de la esquizofrenia es la hipótesis dopaminérgica, que sugiere que los síntomas se deben a una hiperactividad del sistema dopaminérgico (9, 10, 11), esta hipótesis se apoya en la observación de la eficacia mostrada por muchos neurolépticos utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia se relaciona con su capacidad para bloquear receptores dopaminérgicos D₂ principalmente (12, 13). Hipótesis mas recientes sobre la etiología de la esquizofrenia incluyen la participación de otros neurotransmisores como la noradrenalina, serotonina, glutamato, ácido γ -amino butírico (GABA), neuropéptidos y sustancias neuromoduladoras (10, 14) que son blanco en el mecanismo de acción de los nuevos neurolep

² El término psicótico se refiere a la presencia de ideas delirantes y alucinaciones.

2. ANTECEDENTES

2.1 Trastornos Depresivos: Un Reto Diagnóstico

La depresión mayor es una enfermedad que se presenta mas frecuentemente en las mujeres. La diferencia de género se debe a una disfunción serotoninérgica que contribuye a la presentación de los episodios depresivos. Se sabe que la síntesis de serotonina es 52% mayor en los varones que en las mujeres (15). La asociación entre la serotonina y la depresión mayor nos hace pensar que hay alguna alteración en la síntesis de serotonina en las mujeres y puede estar relacionada con una mayor incidencia de trastornos depresivos. Los varones y las mujeres tienen las mismas cantidades de almacenamiento de serotonina en el cerebro. Se piensa que las mujeres bajo situaciones estresantes, presentan una mayor utilización de serotonina y una menor síntesis, este proceso pudiera ser responsable de no mantener reservas adecuadas de este neurotransmisor, produciendo una disminución de serotonina, haciéndolas mas vulnerables a episodios depresivos que a los varones (15). Se deben tener presentes alteraciones en cuatro áreas (estado de ánimo, actividad psicomotora, cognición y síntomas vegetativos) para llegar al diagnóstico clínico. En los últimos años, los mecanismos de transmisión neuronal y los mecanismos de acción de los antidepresivos han sido el foco de atención. Una limitación importante en el área de la psiquiatría es la ausencia de marcadores biológicos para diagnóstico o predictores confiables de

progresión de las enfermedades. Algunos neurotransmisores, como la serotonina, solo se pueden estudiar directamente en el cerebro o sus metabolitos en el líquido cefalorraquídeo (16).

2.1.1 Teorías de la Etiología de la Depresión

Para tratar de explicar la etiología de la depresión, se han propuesto varias teorías, de las que se destacan la teoría serotoninérgica, que se refiere a una disfunción central en la transmisión de serotonina; y la teoría inflamatoria, que asocia la sintomatología de la depresión con una activación inmunológica.

2.1.2 Hipótesis Serotoninérgica

Los neurotransmisores monoaminérgicos como la dopamina, serotonina y noradrenalina, actúan al inducir cambios bioquímicos complejos en las neuronas postsinápticas en el sistema nervioso central. El número de neuronas monoaminérgicas es aproximadamente 1: 200,000 (17). Estas neuronas mandan ramas axonales a través del cerebro estableciendo un sistema modulador intrínseco que actúa a través de otros receptores tipo proteínas G que alteran la respuesta cerebral (18). Existe una clara relación entre los efectos de medicamentos en las monoaminas y los estados afectivos y el comportamiento (19). Estos neurotransmisores interactúan con proteínas de transducción, como las proteínas G, que se encuentran acoplados a la membrana celular. Los

receptores acoplados a las proteínas G son estimulados por las monoaminas y producen un cambio en la forma en la que las neuronas postsinápticas responden a otros neurotransmisores, como el glutamato y el ácido γ -aminobutírico, que se unen a los canales por ligandos. Estos avances en el conocimiento de las bases biológicas de algunos trastornos psiquiátricos como el trastorno depresivo mayor y la esquizofrenia (20) han dado lugar al desarrollo de la hipótesis serotoninérgica de la depresión (21, 22, 23, 24) que refleja una disfunción central en la neurotransmisión de serotonina que se piensa que está involucrada en la etiología de la depresión. La serotonina (5-HT) juega un papel importante en la fisiopatología de la depresión y es el mecanismo de acción de algunos antidepresivos y estabilizadores del afecto. La hipótesis serotoninérgica sugiere que cuando se presenta una disfunción del sistema serotoninérgico, el individuo es más vulnerable al miedo, a la desesperanza y a la depresión. La serotonina tiene un rol significativo, más no exclusivo, en las alteraciones que acompañan a los trastornos depresivos, como el estado de ánimo, sueño y apetito (21, 25). La serotonina y/o sus metabolitos, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), se encuentran disminuidos en la orina y el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con enfermedades afectivas (16).

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT), neurotransmisor sintetizado en el cerebro que depende de la disponibilidad de su precursor, triptófano. La serotonina es metabolizada por la indolamina 2,3-deshidrogenasa (IDO). Ya que la serotonina compete con los aminoácidos neutrales grandes (CAAs) como la

valina, la leucina y la fenilalanina utilizando los mismos mecanismos de recaptura cerebral en la barrera hematoencefálica. Después de su liberación al espacio extracelular, la serotonina es transportada a la célula por la proteína transportadora de serotonina (SERT) que regula la magnitud y duración de la respuesta serotoninérgica (22, 26). La baja disponibilidad del triptófano en el cerebro produce una disminución significativa en la síntesis de serotonina, que es el evento representativo que acompaña a los trastornos depresivos (27, 28, 29). En los trastornos depresivos se ha encontrado una menor actividad presináptica de las neuronas serotoninérgicas (con la sucesiva disminución de la síntesis de serotonina), cambios en la recaptura de serotonina en la hendidura sináptica y alteraciones en los receptores postsinápticos (16).

2.1.3 Teoría Inflamatoria

Para explicar la teoría inflamatoria se ha propuesto que la activación inmunológica se relaciona con las proteínas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6) que producen una alteración en la noradrenalina (NA) y serotonina en algunas regiones del cerebro como en el hipotálamo, hipocampo, amígdala y corteza prefrontal que se piensa que están involucradas en la etiología de la depresión mayor (30). El daño cognitivo que se presenta en la depresión se podrían explicar por los efectos centrales de la IL-1 e IL-2 que producen alteraciones en la memoria en modelos animales y en humanos (31, 32). La depresión mayor se ha asociado con una disminución en la proliferación de células T y B, así como

una disminución en la actividad de las células NK (natural killer) (33, 34, 35). También se presentan concentraciones séricas aumentadas de indicadores de respuesta celular inmune (neopterina, PGE₂ y receptores solubles de IL-2) y concentraciones altas de proteínas reactantes de fase aguda (APPs), aumento en la liberación de citocinas proinflamatorias, como la IL-1, IL-2 e IL-6 por la activación de macrófagos, e INF- γ por células T activadas (36). Además, las citocinas son capaces de aumentar la activación serotoninérgica y reducir la síntesis de serotonina lo que disminuye la disponibilidad del triptófano, que a su vez produce una rápida disminución de serotonina cerebral. Así mismo, se les relaciona con alteraciones en el receptor postsináptico de serotonina y con cambios en el SERT. LaIDO, al metabolizar el triptófano, en combinación con una sobreestimulación por citocinas, puede contribuir a una disminución del triptófano sérico, que se acompaña de una reducción en la síntesis de serotonina que es una de las piezas clave en la mediación de los efectos entre las citocinas y la neurotransmisión (37). Hay algunas regiones cerebrales donde la barrera hematoencefálica está ausente (sitios circumventriculares) o es menos restrictiva (*organum vasculosum laminae terminalis* –OVLT- y la eminencia media). Estos sitios ofrecen a las citocinas una vía de transporte pasivo de la circulación al parénquima cerebral (38). Además del paso a través de la barrera hematoencefálica, se ha reportado que las citocinas de la circulación son capaces de unirse a receptores de citocinas en las células endoteliales de la vasculatura cerebral, lo que induce la activación de segundos mensajeros como el óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGs), que proporcionan un mecanismo

indirecto de señalización por citocinas en el sistema nervioso central (33) (ver Figura 1).

2.2 Plaquetas y Trastornos Psiquiátricos

Las plaquetas se originan en la médula ósea a partir de los megacariocitos y contienen organelos en su citoplasma: peroxisomas, mitocondrias, lisosomas, gránulos densos y gránulos alfa. Contienen al menos tres estructuras que se relacionan fisiológica y morfológicamente que presenta un sistema de transporte activo para la serotonina con sitios de unión para medicamentos y neurotransmisores (39, 40); **gránulos densos** que almacenan serotonina; y **mitocondrias**, que contienen monoamino oxidasa (MAO), la cual cataboliza la serotonina (Fig.2). La proteína de recaptura de serotonina en las plaquetas y el transportador cerebral de serotonina (SERT) son estructuralmente idénticos y están codificados por el mismo gen localizado en el cromosoma 17 (41). A pesar de estas similitudes, las plaquetas no pueden sintetizar serotonina, sino que dependen del sistema APUD (42).

Entre los organelos más representativos de las plaquetas están los peroxisomas, organelos muy pequeños que contribuyen al metabolismo de los lípidos y a la síntesis del factor de activación plaquetaria (PAF) (43), las mitocondrias (4 a 7 por plaqueta) están involucradas en el metabolismo oxidativo

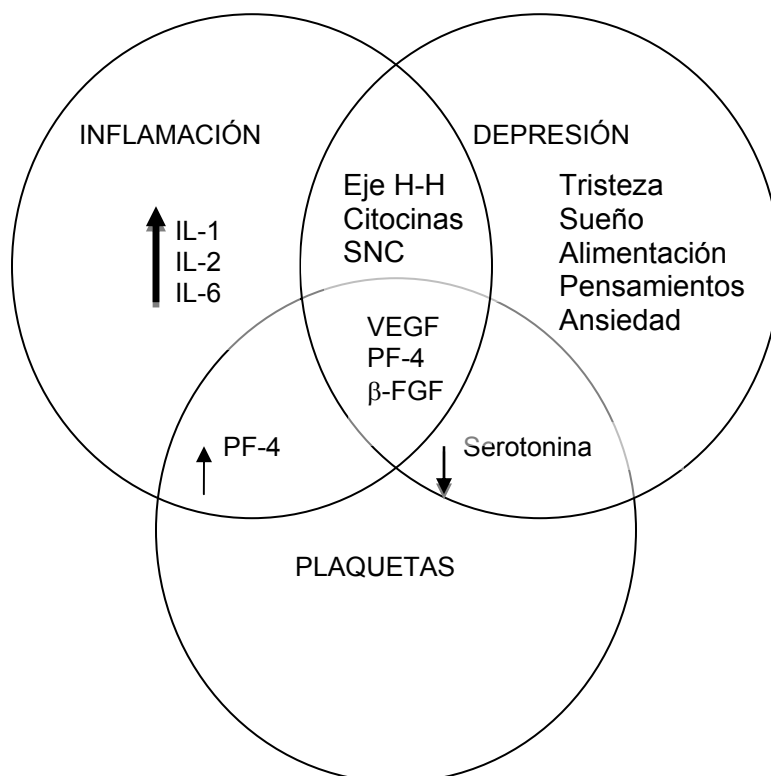


Fig. 1. Modelo de las interrelaciones entre un proceso inflamatorio y depresión a través de las plaquetas en la circulación general.

IL-1 Interleucina-1, **IL-6** Interleucina-6, **Eje H-H** Eje Hipotálamo-Hipófisis, **SNC** Sistema Nervioso Central, **VEGF** Factor de Crecimiento Vascular Endotelial, **PF-4** Factor Plaquetario-4, **β-FCF** Factor de Crecimiento de Fibroblastos.

y contienen monoamino oxidasa (MAO), que participa en el catabolismo de la serotonina (38); y lisosomas, que contienen hidrolasas ácidas como la β -glucuronidasa, catepsinas, arilsulfatasa, β -hexosaminidasa, β -galactosidasa, endoglucosidasa (heparitinasa), β -glicerofosfatasa, elastasa y colagenasa que son liberados de forma lenta y parcial, a diferencia de la liberación de los gránulos alfa o los gránulos densos durante el proceso de agregación plaquetaria.

Así mismo, las plaquetas contienen de 3 a 8 gránulos o cuerpos densos de aproximadamente 20-30 nm de diámetro los cuales tiene un gran contenido de calcio responsable de su aspecto denso al ser observados por microscopía electrónica (44, 45). También contienen grandes concentraciones de serotonina (5-HT), ADP y ATP. Estos gránulos funcionan como almacenes de ATP y ADP (Tabla 1). El almacenamiento de serotonina es diferente al de los nucleótidos de adenina, ya que la serotonina almacenada se intercambia fácilmente con la serotonina extracelular (46) y se ha demostrado que es muy sensible al tratamiento con antidepresivos (47). La membrana de los gránulos densos contiene glicoproteínas que comparte con la membrana plasmática, gránulos alfa y lisosomas. La liberación del contenido de estos gránulos durante la activación de las plaquetas constituye un mecanismo de retroalimentación positiva para la agregación plaquetaria ya que el ADP es un agonista plaquetario potente, la serotonina es un agonista débil y el ATP es un agonista parcial.

Los gránulos alfa son los organelos más abundantes (50 - 80) con un diámetro de aproximadamente 200 nm. Estos muestran densidades variables en su interior que se explica por la diferencia en la distribución de mediadores químicos. Generalmente presentan un área excéntrica más densa que contiene β - tromboglobulina (β -TG) y Factor Plaquetario-4 (PF-4) (48) (ver Tabla 1). Las áreas más electrolúcidas contienen elementos tubulares donde se localiza el Factor de Von Willebrand y el Factor V. También se pueden encontrar pequeñas cantidades de casi todas las proteínas plasmáticas y los productos que

normalmente secretan las plaquetas durante su activación (PF-4, β -TG). También productos de adhesión, factores de coagulación y factores mitogénicos (Tabla 1) (43, 49, 50, 51). Los gránulos alfa también contienen inhibidores fibrinolíticos como el inhibidor de la plasmina α -2, inhibidor del activador del plasminógeno -1 y P-selectina. El PF-4 se une a la heparina de muy alta densidad, neutralizando la actividad anticoagulante de la heparina. Otras funciones del PF-4 incluyen la liberación de histamina de los basófilos, neutrófilos y monocitos, inhibición de la angiogénesis de los tumores en crecimiento, reversión de la inmunosupresión, y la potenciación de la agregación plaquetaria (25, 49, 51). El PF-4 es un marcador de inflamación específico de las plaquetas.

Las plaquetas obtienen la mayoría de estas proteínas del plasma, excepto PDGF, PF-4 y β -TG, que se sintetizan exclusivamente en las plaquetas. Las plaquetas también expresan receptores para adrenalina (α -2 y β -2), benzodiazepinas y serotonina (43, 49, 50, 51).

Las plaquetas son la primera línea de defensa en la hemostasis. Las condiciones que contribuyen para crear una respuesta plaquetaria son: la edad del individuo, la integridad de los vasos sanguíneos y capilares, el hematocrito, las fuerzas que mueven a las plaquetas hacia la pared vascular, y el tamaño de los vasos sanguíneos.

Las plaquetas tiene capacidad de adhesión, la activación y la agregación. La adhesión se lleva a cabo cuando las plaquetas interactúan o se adhieren al subendotelio de un vaso lesionado, proceso mediado por el Factor de Von Willebrand y las glicoproteínas de membrana, colágeno, fibrinógeno y trombospondina (43, 49, 50, 51).

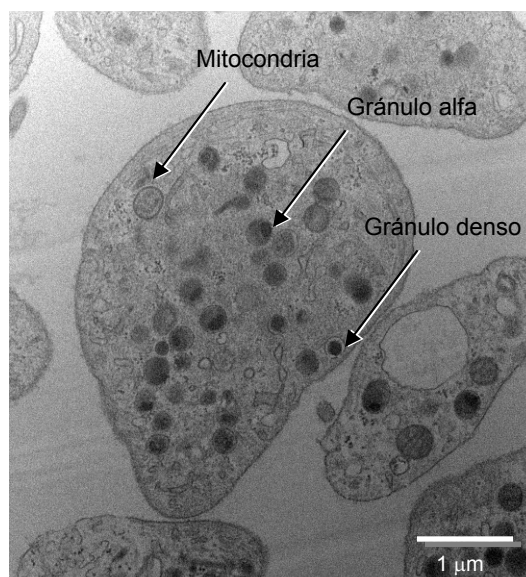


Fig. 2. Micrografía electrónica de transmisión plaquetas normales. Mag. 13,000x.

La activación ocurre como consecuencia de la adhesión y se presenta cuando las plaquetas experimentan cambios bioquímicos antes de secretar sus compuestos activos (Fig.3). El receptor de membrana del fibrinógeno (GPIIb-IIIa) es la proteína más importante en este evento ya que funciona como molécula de adhesión al fibrinógeno, fibronectina y Factor de Von Willebrand. En esta etapa, las plaquetas cambian su morfología discoide a esférica y forman pseudópodos (25, 43, 49, 52). Las plaquetas pueden ser activadas por factores fisiológicos y patológicos, como el colágeno, componentes ateroscleróticos de la pared vascular y trombina. Se encuentran así mismo, activadores débiles de las plaquetas como ADP, epinefrina, tromboxano A₂, prostaglandina H₂, serotonina y el factor activador de plaquetas (25, 43, 52).

El siguiente paso es la agregación, donde la morfología de las plaquetas sigue cambiando y preparándose para descargar los componentes de sus gránulos. Este proceso ocurre cuando las plaquetas activadas se unen, y es facilitado por la GP IIb-IIIa que ayuda a la generación de trombina. La trombina a su vez, mejora la activación de una o más plaquetas (43, 49, 53). La GP IIb-IIIa se incrementa por otros elementos secretados por las mismas plaquetas, como el ADP, 5-HT, colágeno y tromboxano A₂. Durante la secreción plaquetaria, las membranas de los gránulos se fusionan con la membrana plasmática o con las membranas que conectan la superficie al sistema canalicular abierto. Los eventos plaquetarios que ocurren después de la activación por agonistas primarios y antes de la agregación plaquetaria pueden ser detectados por citometría de flujo (54). Las células endoteliales sintetizan dos potentes factores

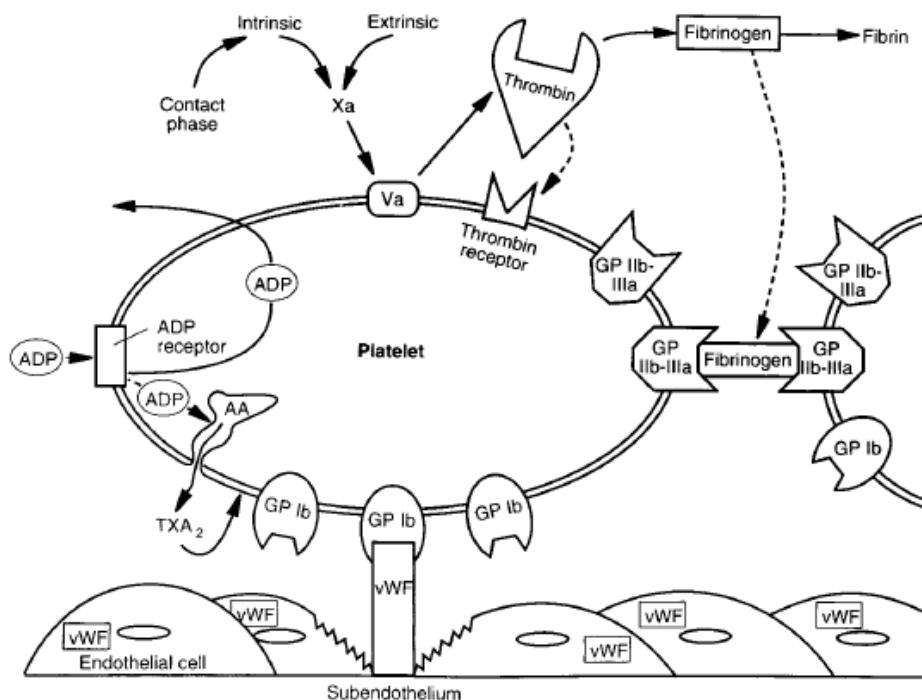


Fig.3. Interacciones de algunos de los receptores de la membrana plaquetaria que se unen con factores de respuesta extracelular en respuesta a la activación. (Besa, Williams & Wilkins Hematology) (55).

inhibitorios que previenen el depósito excesivo de plaquetas: prostaciclina y óxido nítrico.

Se conocen a detalle los factores biológicos que producen activación plaquetaria, sin embargo los mecanismos que relacionan factores emocionales como el estrés mental con la secreción plaquetaria son poco conocidos, se piensa que los cambios plaquetarios son mediados por factores neuroendócrinos, los cuales se han asociado con las propiedades activadoras de la epinefrina y norepinefrina en las plaquetas (51, 53, 56, 57, 58). Además se ha encontrado una asociación con el estrés psicológico donde los niveles de PF-4 y β -TG se encuentran elevados (59). También se ha encontrado una elevación en la liberación de ADP, en individuos sanos, después de exponerlos a factores estresantes.

Tabla 1. Contenido de los gránulos y citoplasma de las plaquetas. (Adaptada de Wilkins Hematology) (55)

Cuerpos densos	ADP ATP Calcio Serotonina Pirofosfato GDP Magnesio	Inhibidores fibrinolíticos Inhibidor del plasminógeno α -2 Inhibidor del activador del plasminógeno-1 Albúmina Inmunoglobulinas Proteínas específicas de la membrana de los gránulos P-selectina (CD62), CD63 (LAMP-3) GMP33
Gránulos alfa	Proteínas plaquetarias específicas Factor plaquetario-4 Familia β -Tromboglobulina (β -TG) (proteína plaquetaria básica, PF-4 de baja afinidad, β -tromboglobulina, β -tromboglobulina-F) Multimerina Glicoproteínas de adhesión Fibrinógeno vWF Propéptido del vWF Fibronectina Trombospondina-1 Vitronectina Factores de coagulación Factor V Proteína S Factor XI Factores mitogénicos FCDP TGF- β Factor de crecimiento endotelial EGF Factor de crecimiento parecido a la insulina-1 Factores angiogénicos VEGF Inhibidor PF-4	Otras proteínas secretadas Proteasa nexina I Gas6 Precursor de la proteína β -amiloide (Proteasa nexina II) Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) Factor XIII Inhibidor de proteasa α -1 kininógeno de bajo peso molecular α 2- macroglobulina Factor de permeabilidad vascular Interleucina-1 β Glicoproteína rica en histidina
		Quimiocinas MIP-1 α (CCL3) RANTES (CCL5) MCP-3 (CCL7) GRO- α (CXCL1) PF4 (CXCL4) ENA-78 (CXCL5) NAP-2 (CXCL7) IL-8 (CXCL8) TARC (CCL17)

2.2.1 Serotonina Plaquetaria

En los últimos años se ha utilizado a las plaquetas como un marcador periférico para el estudio de los receptores del sistema nervioso central (37, 60, 61). Por lo que se han llevado a cabo importantes estudios en los que se asocia la serotonina plaquetaria con la psicopatología y psicofarmacología. Como ya se mencionó, la serotonina es un elemento clave para entender los trastornos afectivos. Las plaquetas son una herramienta muy práctica en la investigación psicofarmacológica por la gran variedad de receptores de membrana y las diferentes interacciones fisiológicas que presentan (62, 63). Los receptores de 5-HT se han involucrado en procesos fisiológicos como la vasodilatación, vasoconstricción y agregación plaquetaria (64). Se ha observado una disminución en la recaptura de serotonina en algunos pacientes con depresión bipolar que sugiere una modificación en el proceso de recaptura que se relaciona con su estado clínico (manía o depresión) (65).

Se ha reportado un aumento significativo en la densidad del receptor 5-HT_{2A} plaquetario en los pacientes con depresión mayor. Estos resultados apoyan la hipótesis serotoninérgica y la compensación con la regulación hacia arriba y la alteración en la actividad serotoninérgica como marcador biológico de depresión (66, 67). Hrdina y cols en 1997 (68) reportaron un aumento en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en las plaquetas que se asocia a un alto riesgo suicida, más que a un trastorno depresivo propiamente (69, 70) y se ha

considerado utilizar esta observación como un marcador biológico de conductas suicidas (71, 72). A pesar de que la densidad del receptor no se modifica con el tratamiento antidepresivo, sí se reportan cambios en la recaptura de la serotonina y en la cinética de la misma (70).

El transporte de serotonina hacia las plaquetas es un proceso activo y se considera acoplado al sistema Na^+/K^+ ATPasa, dependiente de las concentraciones de sodio (26). Algunos trastornos psiquiátricos se asocian con aumento del calcio intracelular en respuesta al estímulo serotoninérgico mediados por los receptores 5HT_{2A} donde este aumento en el calcio intracelular de las plaquetas no es producido por la noradrenalina ni la dopamina (73, 74). Se ha observado un aumento del calcio intracelular plaquetario en respuesta al estímulo serotoninérgico en pacientes deprimidos, que hace suponer que el calcio intracelular es la fuente principal del aumento en la respuesta a la estimulación serotoninérgica. Así mismo, la respuesta del calcio intracelular al estímulo serotoninérgico disminuye en forma paralela a la disminución en la puntuación en la Escala de Hamilton (HAM-D), proponiéndose esta respuesta como un marcador del trastorno depresivo (73, 75). Mikuni en 1992 reportó que que la depresión mayor y la depresión subclínica, aunque pudieran tener una presentación clínica similar, son dos entidades diferentes, ya que en la depresión subclínica no se presentan estas alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular (73). El aumento del calcio plaquetario es una característica específica de los trastornos afectivos que no se observa en los pacientes con

esquizofrenia o con abuso de sustancias. Por otra parte, la serotonina plaquetaria también ha sido un componente importante en la investigación sobre esquizofrenia ya que se ha reportado un aumento en la recaptura de serotonina en los pacientes con esquizofrenia paranoide (76) y diferentes concentraciones de serotonina plaquetaria entre los diversos tipos de esquizofrenia (77, 78).

El estudio de los aspectos morfológicos de las plaquetas en individuos sanos (79) y de pacientes con depresión (80, 81) no mostró diferencia en la morfología, distribución y cantidades de los gránulos alfa. Sin embargo en los pacientes con depresión moderada y severa se observó una disminución significativa en la cantidad de gránulos densos (82). Estos resultados apoyan la hipótesis serotoninérgica al correlacionar las bajas concentraciones de serotonina con la ausencia de gránulos densos en los pacientes con depresión mayor. Otras anomalías plaquetarias que se han identificado en la depresión mayor son: concentraciones y funciones anormales de proteína G, regulación hacia arriba de los receptores adrenérgicos α_2 (α_2 -AR), mejoría de la actividad procoagulante, disminución en la densidad del transportador de serotonina y aumento en la sensibilidad del receptor 5-HT_{2A}.

Los medicamentos más utilizados para el tratamiento de la depresión son los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI) (48) que exhiben un espectro de efectos antiplaquetarios como la disminución en la afinidad en el sitio de unión de las plaquetas (83, 84); un bloqueo en la movilización del calcio

intraplaquetario (83); una reducción en la secreción plaquetaria en respuesta a la estimulación con colágeno (84); así como una reducción en los moduladores de los marcadores de activación plaquetaria, como el PF-4, las respuestas de agregación y una menor expresión en los marcadores de superficie CD-63, CD-9, GPIb, GPIIb-IIIa, p-selectina, VLA-2 y PECAM-1 (85).

La importancia de contar con marcadores biológicos en los trastornos depresivos no se limita solo a la fase de diagnóstico, sino que también podría ser una herramienta útil para predecir el desarrollo un trastorno depresivo o inclusive, la presentación de riesgo suicida. Mück-Šeler y cols., 1996 (86) demostraron una mayor concentración de serotonina plaquetaria en pacientes no suicidas, mientras que los niveles más bajos se encontraron en los pacientes que se habían suicidado. De nuevo, este descubrimiento muestra que la concentración de serotonina podría ser utilizada para pronosticar intentos suicidas. Otra aplicación de las plaquetas como marcadores biológicos en el diagnóstico diferencial de las enfermedades psiquiátricas se presenta en el caso de la hipersensibilidad del receptor del glutamato, que ha sido recientemente reportada en trastornos psicóticos y en trastornos depresivos (87). Esta hipersensibilidad puede ser utilizada como un marcador no específico de psicosis (porque también se encuentra presente en los trastornos depresivos). La relevancia de este descubrimiento se hace particularmente importante para el diagnóstico diferencial entre un trastorno depresivo mayor con síntomas psicóticos y la fase de manía del trastorno bipolar (que se presenta, también,

con síntomas psicóticos). Esta última enfermedad, sin embargo, no presenta la hipersensibilidad del calcio intracelular plaquetario en respuesta a la activación del receptor del glutamato (87, 88).

Investigaciones previas en este campo han utilizado la tecnología llamada Surface Enhanced Laser Desorption/ionization-time of Flight-Mass Spectrometry (SELDI-ToF[®]) que muestra los perfiles de las proteínas (89). Se observó un aumento en las proteínas de pesos moleculares de 17,748 Daltons (D) corresponden a β -FGF, 10,588, 73,763, 74,928 D, representan al VEGF y las de 15,314 D al PF-4, y otras proteínas a la fecha no identificadas de 5,711 D y 15,484 D en las plaquetas de pacientes con depresión mayor comparadas con los controles sanos (Sepúlveda R. Comunicación personal). Estas proteínas son marcadores de inflamación, por lo que suponemos se relacionan con la teoría inflamatoria de la depresión.

2.3 Procedimientos de Microscopía para el Estudio de las Plaquetas

Desde la primera publicación de micrografías de plaquetas en microscopio electrónico en 1964 (90, 91), éstas se han caracterizado por ser estructuras únicas por la dificultad de preservarlas sin producir activación (92). Es bien conocido que la activación y agregación plaquetaria ocurren in vivo e in vitro durante la toma de la muestra y el procesamiento, por lo que la inhibición

de los cambios artificiales durante estos procesos son pieza clave en el estudio de las plaquetas (92).

La microscopía confocal, por otro lado, se basa en el uso de fluorescencia para la obtención de las imágenes. Las moléculas fluorescentes que se usan están construidas a partir de compuestos sintéticos aromáticos en químicos orgánicos diseñados para unirse con macromoléculas biológicas o para localizar alguna región estructural específica. La historia de las moléculas fluorescentes sintéticas data de finales de 1800 cuando se desarrollaron la mayoría de las tinciones de la histología moderna. Los fluorocromos se introdujeron a la microscopia fluorescente a principios del siglo XX. En 1940, Albert Coons (93) desarrolló una técnica para marcar los anticuerpos con tintes fluorescentes, dando origen al campo de la inmunofluorescencia. Un avance muy importante en la tecnología moderna de fluorocromos fue el desarrollo de las tinciones Alexa Fluor, producto registrado de Molecular Probes, una compañía de Invitrogen, Eugene, Oregon, USA. Estos son derivados de la rodamina sulfonatada que presentan una mayor intensidad de fluorescencia. Adicionalmente, se mejoraron algunos aspectos de los fluorocromos tradicionales, como la fotoestabilidad, el espectro de absorción se iguala a las líneas de láser más comunes, resistencia a los cambios de pH, y un mayor grado de solubilidad en agua. Lo anterior conduce a que la intensidad de la fluorescencia dure por más tiempo, por lo que esta técnica tiene sus ventajas sobre la microscopia electrónica.

2.4 Justificación

Las plaquetas han sido ampliamente estudiadas por su participación en la hemostasis, aterosclerosis, trombosis y en los síndromes coronarios agudos. Se conoce su fisiopatología y terapéutica. Por lo que en los últimos años su importancia en los trabajos de investigación ha tomado una posición más significativa. Actualmente las plaquetas son de principal interés en los laboratorios de biología vascular, al investigar su participación en la angiogénesis y antiangiogénesis en el cáncer, enfermedades inflamatorias, neurológicas y cardiovasculares (90). Desafortunadamente, no ha sido suficiente el interés por investigar la participación de las plaquetas en las enfermedades psiquiátrica, de las que hasta la fecha, se conoce poco de su etiología y fisiopatología. Esta situación hace que el diagnóstico de las enfermedades psiquiátricas sea puramente clínico y con base a un sistema de clasificación complicado. En los últimos años, la depresión ha llamado la atención de las autoridades de salud internacionales por el aumento en su incidencia, prevalencia y sus consecuencias personales, laborales y sociales, como los intentos de suicidio y suicidios consumados que, se estima, seguirán en aumento. Es necesario el uso de métodos objetivos para fortalecer el diagnóstico clínico y diferencial de las enfermedades psiquiátricas. Debido a que las plaquetas son fáciles de obtener y aislar, se propone estudiar la relación que guarda el comportamiento de la serotonina plaquetaria y el factor plaquetario-4 en las enfermedades psiquiátricas. Esto podría ser de utilidad

como apoyo objetivo al diagnóstico de los pacientes con trastornos depresivos en nuestra población. En el presente trabajo se estudiaron las plaquetas de individuos con trastorno depresivo mayor comparados con controles sanos, sujetos con trastorno bipolar y esquizofrenia.

2.5 Hipótesis

Las plaquetas de pacientes con depresión mayor presentan una disminución en la cantidad de serotonina (gránulos densos) y un aumento del factor plaquetario-4 (gránulos alfa).

2.6 Objetivos del Estudio

2.6.1 Objetivo General

Determinar la relación entre la serotonina y el factor plaquetario-4 en el trastorno depresivo mayor.

2.6.2 Objetivos Específicos

1. Estandarizar la preparación de plaquetas para inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

2. Determinar el número de gránulos densos en plaquetas de pacientes con depresión, controles sanos, enfermedad bipolar en fase depresiva y esquizofrenia mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica.
3. Determinar el número de gránulos alfa en plaquetas de pacientes con depresión, controles sanos, enfermedad bipolar en fase depresiva y esquizofrenia mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica.
4. Determinar la relación entre los gránulos densos y los gránulos alfa.
5. Analizar la relación de los gránulos densos y gránulos alfa en los cuatro grupos de estudio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Selección de Participantes

Este es un estudio de casos y controles en el que se analizaron plaquetas de pacientes con depresión mayor, que corresponde a los casos y tres grupos controles. Se estudió un grupo de controles sanos para determinar las diferencias en la población general; un grupo de controles con enfermedad bipolar y; un grupo de controles con esquizofrenia, estos últimos grupos para determinar las diferencias en la población psiquiátrica.

Se analizaron las plaquetas de 51 individuos en los que se incluyeron individuos sanos y pacientes con enfermedades psiquiátricas. Los grupos se clasificaron de la siguiente forma: 12 individuos con diagnóstico de trastorno depresivo mayor; 12 individuos sanos (control sano), 12 individuos con diagnóstico de trastorno bipolares (controles) y 12 individuos con diagnóstico de esquizofrenia (controles). Todos los participantes firmaron consentimiento informado (Apéndice 2) previo a cualquier procedimiento. Se documentaron las características demográficas (edad y sexo) de los grupos, así mismo, se cumplieron los criterios diagnósticos basados en el DSM-IV ¹ para trastorno depresivo mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia, respectivamente con base en una entrevista clínica. En los casos del grupo de depresión mayor se incluyeron pacientes que obtuvieron una calificación mayor a 18 puntos en la Escala de

Depresión de Hamilton (HAM-D₂₁) (94) (Apéndice 3). Ninguno de los participantes presentaba enfermedades médicas, ni comorbilidad en eje I o eje II de acuerdo a la clasificación multiaxial del DSM-IV (Apéndice 4). Ningún paciente de este grupo presentaba síntomas psicóticos o riesgo suicida, ni antecedentes de ingesta de psicotrópicos o antiinflamatorios una semana previa a la toma de la muestra de sangre. El grupo de controles sanos no presentaban enfermedades médicas y/o psiquiátricas, por lo que se les aplicó la Escala de Depresión de Hamilton y el Inventario de Beck (95) (Apéndice 5) para depresión, obteniéndose una puntuación menor a 5 puntos.

3.2 Cálculo del Tamaño de la Muestra

Se realizó el cálculo del tamaño de la muestra de la siguiente manera: se estableció una desviación estándar de 0.35 para cada grupo, de acuerdo al estándar mundial y en el estudio estadístico de Boneu y cols 1978 (96). Este estudio cuenta con una potencia de 86% para detectar una diferencia de 0.4 gránulos entre la media de dos grupos y del 91% para detectar una diferencia del 0.5 en la media de dos grupos, aún y cuando, la desviación estándar de la media de la cuenta de gránulos fuese de 0.4 en lugar de 0.35. La Tabla 2 muestra las diferentes potencias obtenidas a partir de los cambios en la desviación estándar y la diferencia en la cuenta de gránulos. Este análisis de potencia está basado en el análisis estadístico *t* de student bilateral con un nivel de 0.05 de significancia α (alfa) de 0.05. (Tabla 2).

Desviación estándar (σ) en la cuenta de gránulos	Diferencia (Δ) en la cuenta de gránulos	
	0.4	0.5
0.3	94%	99%
0.35	86%	97%
0.4	75%	91%

Tabla 2. Poder para detectar la diferencia en la cuenta de gránulos de acuerdo a la diferencia de la media de dos grupos.

El tamaño de la muestra de acuerdo al nivel alfa α , poder β , desviación estándar σ y diferencia esperada Δ (ver Tabla 3). Se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\alpha: 0.05 = Z\alpha:1.96, \beta: 80\% = Z\beta: 0.84, \Delta:0.4, \sigma: 0.35$$

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2}{(\Delta / \sqrt{2}\sigma)^2} = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2}{(\Delta / \sigma)^2} = 12.0$$

	Poder 80%		Poder 90%	
	Δ 0.4	Δ 0.5	Δ 0.4	Δ 0.5
σ 0.3	9 (8.85)	6 (5.64)	12 (11.8)	8 (7.55)
σ 0.35	12	8 (7.68)	17 (16.07)	11 (10.28)
σ 0.4	16 (15.68)	11 (10.03)	21 (20.99)	14 (13.43)

Tabla 3. Cálculos de tamaño de la muestra usando diferente poder, desviación estándar σ y diferencia Δ . En paréntesis se muestra el número exacto. Como es un tamaño de muestra y se redondea al siguiente entero. El tamaño de la muestra está calculado para un grupo.

De acuerdo a este análisis de sensibilidad se pudo observar el comportamiento del diseño bajo las variaciones de los parámetros que están en

evaluación. El tamaño de la muestra es muy sensible a la diferencia Δ , menos sensible a la desviación estándar σ y poco sensible a los cambios en el poder.

El estudio incluyó 12 individuos en cada grupo. Esta muestra proporciona un 97% de poder para detectar una diferencia de 0.5 gránulos entre el grupo de depresión y los demás grupos. Valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos. Para este análisis, se utilizó el software estadístico SPSS y Excel (Microsoft Office).

3.3 Recolección y Procesamiento

Las plaquetas se obtuvieron a partir de sangre periférica (8 mL de sangre total) a través de una punción de la región antecubital en tubos vacutainer citratados (tapa celeste que contienen: 85 mM trisódico citrato; 65 mM cítrico ácido; 2% glucosa; pH 5) a temperatura ambiente. Los tubos vacutainer se centrifugaron (centrifuga Beckman RU-8 de rotor basculante) a 150 xg por 5 minutos para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Se obtuvo aproximadamente 1-1.3 mL de plasma (por cada tubo vacutainer) que posteriormente se transfirió a dos tubos eppendorf y se centrifugaron (microcentrifuga Fisher de rotor fijo) a 900 xg por 1 minuto para separar el concentrado plaquetario (en el fondo del tubo) y el plasma pobre en plaquetas (PPP). Se removió el PPP de ambos eppendorf con una pipeta, y posteriormente se le agregaron a las plaquetas 300 μ l de paraformaldehído al

4% (diluido en PBS (amortiguador salino fosfatado) con pH de 7.4) como fijador para microscopía confocal y al otro eppendorf con plaquetas 300 μ l glutaraldehido al 2 % (diluido en cacodilato de sodio al 0.1 molar) como fijador para microscopía electrónica por media hora a temperatura ambiente. Ambos tubos se centrifugaron para separar el fijador y las plaquetas a 900 xg por 1 minuto. Se removió el fijador con una pipeta, dejando las plaquetas en el fondo del tubo y se resuspendieron las plaquetas en 500 μ l de PBS al tubo fijado con paraformadehido (para microscopia confocal) y 500 μ l cacodilato de sodio al tubo fijado con glutaraldehido (para microscopía electrónica). Ambos tubos eppendorf se almacenaron en refrigeración a 4°C por aproximadamente una semana. Las muestras fueron enviadas a la Universidad de Harvard para su análisis en una caja de uniciel con paquetes de gel congelados por la paqueteria.

3.4 Microscopía Electrónica

Para llevar a cabo la preparación de las plaquetas para microscopía electrónica, el concentrado plaquetario se fijó con 300 μ l de glutaraldehido al 2% (diluido en cacodilato de sodio al 0.1 molar) por 30 minutos a temperatura ambiente. Los tubos eppendorf se centrifugaron para separar el glutaraldehido de las plaquetas a 1500 xg por 1 minuto. Se removió el fijador con una pipeta, dejando las plaquetas en el fondo del tubo y se resuspendieron en 500 μ l de cacodilato de sodio y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Los tubos

ependorf se centrifugaron a 78 xg por 3 minutos, se elimina el cacodilato de sodio con una pipeta y se agregó 1 mL de agarosa al 2% (agarosa en agua bidestilada a 100°C) se incorporò con el concentrado plaquetario utilizando un palillo de madera. Inmediatamente, el tubo se centrifugó a 78 xg por 1 minuto y se colocó en hielo para su gelificación durante 1 hora. El gel se removió del tubo eppendorf y se separó el concentrado plaquetario, eliminándose el exceso de agarosa con una navaja de doble filo. Posteriormente se cortó el concentrado plaquetario (con la misma navaja) en porciones de 1-2 mm². Estas porciones se colocaron en un vial al que se le agregaron 10 mL de una solución de osmio al 1% (osmio 1:1 en cacodilato de sodio al 0.1 molar a temperatura ambiente pH de 7.3, Electron Microscopy Sciences®) dejándose durante 1 hora en obscuridad. Posteriormente, el osmio se removió con una pipeta y se agregaron 10 mL de cacodilato de sodio durante 5 minutos y posteriormente 10 mL de agua bidestilada (ddH₂O) por 10 minutos. Las plaquetas se deshidrataron con series crecientes de 10 mL de etanol (etanol 200 proof diluido en agua bidestillada al 50%, 70%, 80%, 90%) durante 10 minutos en cada concentración y 2 horas en la concentración de 100% de etanol. Posteriormente, se agregaron dos veces 10 mL de óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences®) durante 8 minutos. Al remover el óxido de propileno, con una pipeta, se inició el proceso de infiltración, primero con 15 mL de una solución de 2/3 de EPON-812 (Electron Microscopy Sciences®) diluido en 1/3 de óxido de propileno durante 12 horas en rotación continua. Se removió con una pipeta esta solución y se agregaron 15 mL EPON-812 por 8 horas en rotación continua. Posteriormente se inició la fase

de polimerización con EPON-812 (sin diluir). Se colocaron los fragmentos de plaquetas en la punta de los moldes de silicón (de aproximadamente 1 x 0.3 cm cada uno, Electron Microscopy Sciences®) con ayuda de forceps y de palillos de madera y se vació la resina de EPON-812 hasta llenar los moldes usando una pipeta. Los moldes se hornearon a 65°C por 24 horas. Posteriormente se desmoldaron y se cortaron secciones finas de 70 nm de grosor con el ultramicrotomo Leica® modelo UTC. Para relajar las secciones finas se usó un asa de calor radiante. Las secciones finas, una vez relajadas, se colocaron en gradillas con una malla de 200 mesh³, cubiertas con carbón y formvar. Una vez que las secciones finas estaban colocadas en la malla, se tiñeron a temperatura ambiente con 30µl, aplicados con una pipeta, de una solución de acetato de uranilo al 2% (diluido en etanol al 70%) por 5 minutos en oscuridad. Se lavaron con 1 mL PBS por 5 minutos, y se procedió a la tinción con 30µl de citrato de plomo al 2% (diluido en etanol al 70%) por 5 minutos en obscuridad. Las gradillas se lavaron con 1mL de PBS por 5 minutos. Las imágenes se obtuvieron en el microscopio electrónico de transmisión TEM Jeol® 2100 (con 200kV).

³ Mesh: medida que se refiere al espacio abierto en la malla de las gradillas (en este caso 200 µm² cada cuadro que forma la malla) donde se colocan las muestras. Las gradillas son estructuras de cobre planas, redondas de 3.05 mm de diámetro con un lado mate y del otro brillante.

3.5 Inmunohistoquímica

Al concentrado plaquetario se le agregaron 300 μ l de paraformaldehído al 4% (diluido en PBS pH 7.4) y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Los tubos eppendorf se centrifugaron a 1500xg por 1 minuto, se removió el fijador con una pipeta y se agregaron 500 μ l de PBS y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. La tinción de las plaquetas se llevó a cabo en suspensión, por lo que en cada paso, después de agrega una nueva solución se centrifugó a 900xg por 3 minutos para separar las plaquetas y se eliminó el líquido sobrenadante. Se transfirieron 200 μ L de la suspensión de plaquetas a un nuevo tubo eppendorf. Se permeabilizaron⁴ con tritón-X 100 al 0.1% por 3 minutos y se lavaron con PBS. Se agregó el buffer bloqueador de plaquetas al 10% (500 μ L de suero fetal vacuno al 10%, albumina bovina al 1% y 0.05% de azída de sodio) por 1 hora. Las plaquetas se incubaron con 300 μ L de anticuerpo anti-serotonina (anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano DakoCytomation® Ref. S0809) a una dilución 1:100 (en diluyente de Dako) por 18 horas a 4°C. Posteriormente las preparaciones se lavaron con PBS y se agregaron 300 μ L del anticuerpo anti- PF-4 1:100 (conejo anti-humano Peprotech® Cat. 500-P05) por 1 hora. Se lavó este anticuerpo por 15 minutos y se agregaron 300 μ L de Alexa 488 (anticuerpo cabra-anti-ratón (verde) Molecular Probes/Invitrogen® Cat. A11029) y Alexa 647 (anticuerpo cabra-anti-conejo (rojo) Molecular

⁴ Permeabilización: proceso en donde se agrega una solución para permitir la penetración de tinciones y anticuerpos a través de la membrana celular sin extraer las proteínas u organelos celulares.

ProbesInvitrogen® Cat. A21245) cada uno en una dilución 1:250 (de acuerdo a las indicaciones incluidas en el producto) por una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Las plaquetas se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos con Flouramount®⁵. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica® TCS SP2 (CLSM) con objetivo 100x invertido. Las imágenes de las plaquetas se observaron usando el software del microscopio confocal Leica con un zoom de 4.

El análisis espacial (a partir de las micrográficas) se lleva a cabo para establecer la localización intracelular de los gránulos. Las plaquetas fueron teñidas simultáneamente con dos marcadores fluorescentes: anticuerpo anti-serotonina (verde) y anti-FP-4 (rojo). Las micrográficas se obtuvieron en un microscopio confocal Leica™ SP2 con un láser de kriptón-argón, helio y neón 594 y 633 que proporciona la separación espectral en el canal apropiado para propósitos de este estudio. Se utilizó un objetivo de 100x, zoom óptico de 4, de 0.5 micras de grosor por sección óptica y procesadas con el software Image J.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo donde se analizaron 100 plaquetas (promedio de 120) por cada sujeto en el estudio (n=48) con el software *Image J* (programa computacional desarrollado por NIH⁶, EUA). Todas las imágenes fueron procesadas por la misma persona, que desconocía a que grupo correspondía cada muestra analizada. Se incluyeron a todas aquellas

⁵ Flouramount: medio acuoso no fluorescente para montar laminillas teñidas para ser examinados con microscopio de fluorescencia que minimiza la transferencia de oxígeno inducida por la decadencia de fotones cuando se aplica luz fluorescente a las muestras teñidas con fluorocromos.

⁶ NIH: National Institutes of Health – Institutos Nacionales de Salud en EUA.

plaquetas en las que se pudo identificar claramente los gránulos de interés. Se excluyeron del análisis las plaquetas que estuvieran localizadas en los límites de la micrografía o incompletas.

En todas las micrografías se normalizó la fluorescencia mediante un filtro mediano⁷, para establecer los límites entre las plaquetas y entre los gránulos (Figura 4). Se obtuvo un análisis numérico en una hoja de cálculo en el que se incluyó el número de plaquetas, número de gránulos densos y alfa, área total (gránulos), e intensidad media (Tabla 4). Estas variables se analizaron usando el programa estadístico SPSS (V12.0 para Windows LEAD Technologies, INC).

Para complementar el análisis de gránulos densos y gránulos alfa en contexto con la sintomatología depresiva, se analizaron la cantidad de gránulos densos y gránulos alfa por plaqueta y la puntuación obtenida en la escala de depresión de Hamilton de cada paciente.

⁷ En el procesamiento de las imágenes es necesario llevar a cabo los pasos para reducir el ruido antes de llevar a cabo procesamiento más sofisticados como la detección de partículas o límites. El filtro mediano es una técnica de separación digital no lineal para quitar el ruido de las imágenes o de otras señales. La idea es examinar la imagen y decidir si es representativa de la señal que se busca.

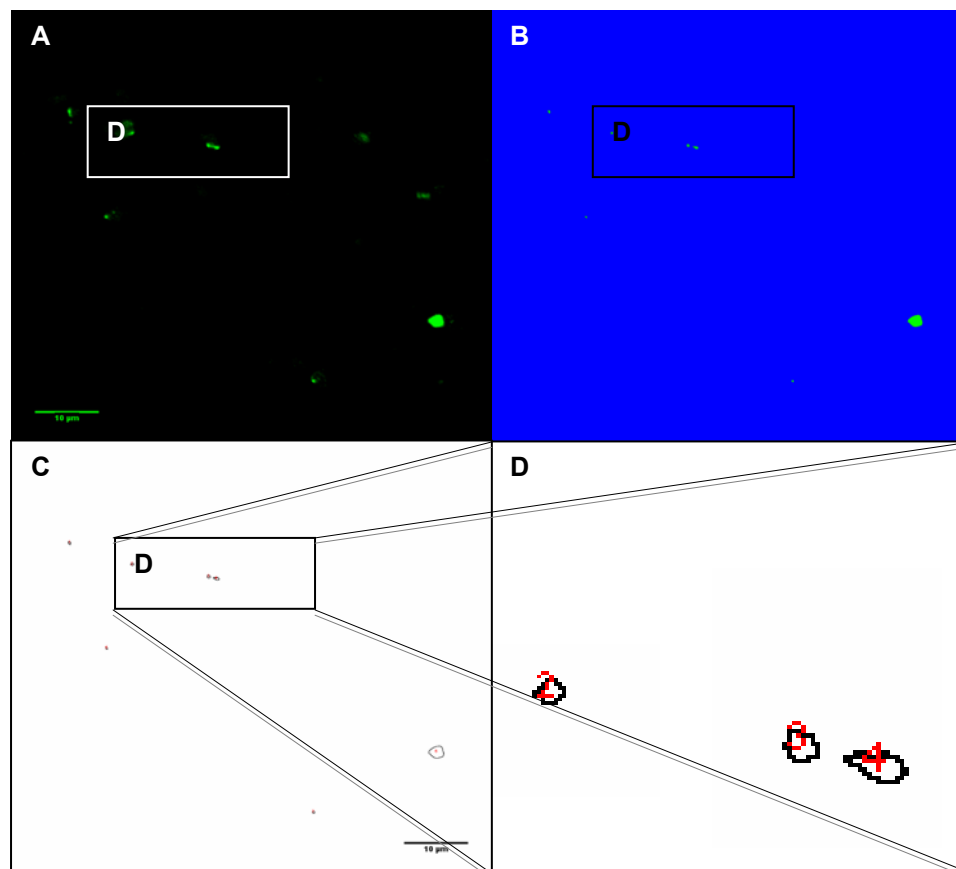


Fig. 4. Proceso para obtener el análisis cuantitativo a partir de las micrografías. **A:** Micrografía obtenida del microscopio confocal. **B:** Imagen procesada con el programa Image J, se aplica un umbral para identificar solo las partículas fluorescentes y eliminar el fondo (en azul), con un valor de 0. **C:** Muestra de las partículas fluorescentes numeradas que se observan como puntos rojos y negros. **D:** Ampliación de la micrografía C donde se presentan las partículas fluorescentes delineadas y numeradas (2, 3 y 4) para su identificación en la hoja de cálculo para el estudio estadístico (Ver Tabla 4). Barra= 10 μ m.

Obs	Area	Mean	Min	Max
1	0.504	169.809	106	255
2	0.005	109	109	109
3	0.451	156.298	105	226
4	0.091	111.529	108	119
5	0.043	105.75	105	108
6	0.225	124.905	105	148
7	0.038	122.857	117	130
8	0.257	167.229	106	239
9	0.279	175.038	107	255

Tabla 4. Hoja de Cálculo. Ejemplo de las variables de tamaño e intensidad de partículas fluorescentes detectadas en este proceso. Se incluyeron gránulos densos de tamaño de 0.030 a 0.599 μm y gránulos alfa de 0.050 a 0.599 μm . Se eliminaron gránulos de mayor o menor tamaño para el análisis estadístico. En la Figura 4, las observaciones 2, 3 y 4 (con el fondo blanco) corresponden a las partículas fluorescentes. La observación número 2 fue eliminada del análisis al ser menor a 0.030 μm . (ver apéndice 5).

4. RESULTADOS

4.1 Características de la Población

Las características demográficas de la población de estudio se resumen en la Tabla 5. La edad promedio de los pacientes del grupo de depresión fue de 35.5 años (86% mujeres), el de controles sanos fue de 30.2 años (66 % mujeres), el de bipolares 36.6 años (41% mujeres) y el grupo de esquizofrenia de 42 años (33% mujeres).

		Controles			
		Depresión	Sanos	Bipolar	Esquizo
Total	N	15	12	12	12
	Edad (años)	35.55 ± 7.6	30.2 ± 9.9	36.6 ± 11.2	42 ± 11.2
Femenino	N	13 (86.67%)	8 (66.67%)	5 (41.67%)	4(33.33%)
	Edad (años)	36 ± 10.7	32 ± 1.71	38 ± 19.9	33 ± 19.6
Masculino	N	2 (13.33%)	4 (33.33%)	7(58.33%)	8 (66.67%)
	Edad (años)	32 ± 4	26.5 ± 16.5	44 ± 16.8	38 ± 13.8

Tabla 5. Características Demográficas

4.1.2 Depresión

Para evaluar la severidad de los síntomas depresivos se utilizó la Escala de Depresión de Hamilton (HAM-D) fue utilizada en donde una puntuación de 18 o más fue el límite para identificar a los pacientes que presentaban depresión de

los controles sanos. El 20% de los pacientes del grupo de depresión presentaba depresión leve (18-23 puntos), el 60% moderada (24-28) y 20% severa (29-33); mediana de 26 puntos. La ansiedad es un síntoma común que se presenta en la enfermedad depresiva y el 46.67% (N=7) de los pacientes de esta muestra la presentó. Esta muestra, aunque pequeña es representativa de la población al tener puntuaciones y sintomatología depresiva leve, moderada y severa. La cuenta de plaquetas totales de los pacientes estudiados fue de 183,000 a 315,000/mm³ (promedio de 263,400/ mm³; mediana de 285, 000/ mm³) estos resultados se encuentran dentro de los límites normales como se muestra en la Tabla 6.

Depresión (N=15)	Tiempo Evolución (sem)	HAM-D >18	Ansiedad	Cuenta plquetaria (x 1000/mm3)
1	4	24	si	315
2	5	29	no	286
3	8	28	si	285
4	4	25	no	312
5	2	26	si	305
6	3	18	no	248
7	4	31	si	236
8	10	33	si	183
9	8	26	no	288
10	4	18	si	280
11	5	28	no	234
12	6	22	no	286
13	4	25	no	301
14	8	27	si	187
15	5	19	no	205
Mediana	5	26		285
Promedio	5.333333	25.267		263.4
Des. Stand	2.225395	4.495		44.8

Tabla 6. Características generales del grupo de depresión.

4.2 Microscopía Electrónica

Las plaquetas presentan una morfología compleja (98) ya que contienen mitocondrias, sistema tubular denso, sistema canalicular abierto, gránulos alfa, gránulos densos, microfilamentos, microtúbulos y glicógeno.

En las plaquetas de todos los grupos de estudio se observó la morfología normal de las mitocondrias, glicógeno, sistema canalicular abierto, gránulos densos, gránulos alfa, microtúbulos en secciones transversales. Todas las plaquetas presentaron extensiones de la membrana tipo pseudópodos irregulares que es un dato indicativo de activación plaquetaria que también se puede identificar con el depósito de fibrina entre las plaquetas, sistema canalicular abierto dilatado y glicógeno como se muestra en la Figura 5.

Los gránulos alfa son los gránulos más abundantes en las plaquetas, se observaron de forma ovalada, estos gránulos pueden contener o no nucleoides excéntricos (de acuerdo al plano donde se realizó el corte) algunos ligeramente más grandes que las mitocondrias. Los gránulos alfa se se observaron de morfología normal en todos los grupos de estudio.

Los gránulos densos se observaron más electrodensos (por su contenido de calcio) que los gránulos alfa. Se mostraron disminuidos en el grupo de depresión. En el resto de los grupos la morfología fue normal (Figura 5).

Solamente en el grupo de pacientes con esquizofrenia se observaron plaquetas rodeadas por una red de fibrina (Figura 5 y 6). Así mismo, se observó cambio en su morfología ya que pierden su forma ovalada por la aparición de pseudópodos como se observa en la Figura 5 y 6. Sin embargo, no se presentaron cambios en la morfología de los gránulos. Estas alteraciones son indicativas de activación plaquetaria. Por otro lado, se observó la presencia de gránulos con disposición periférica, pérdida de la morfología normal de la membrana citoplasmática y el depósito de una red de fibrina rodeando a las plaquetas como indicativo de agregación plaquetaria. Estas observaciones no se presentaron en los otros grupos.

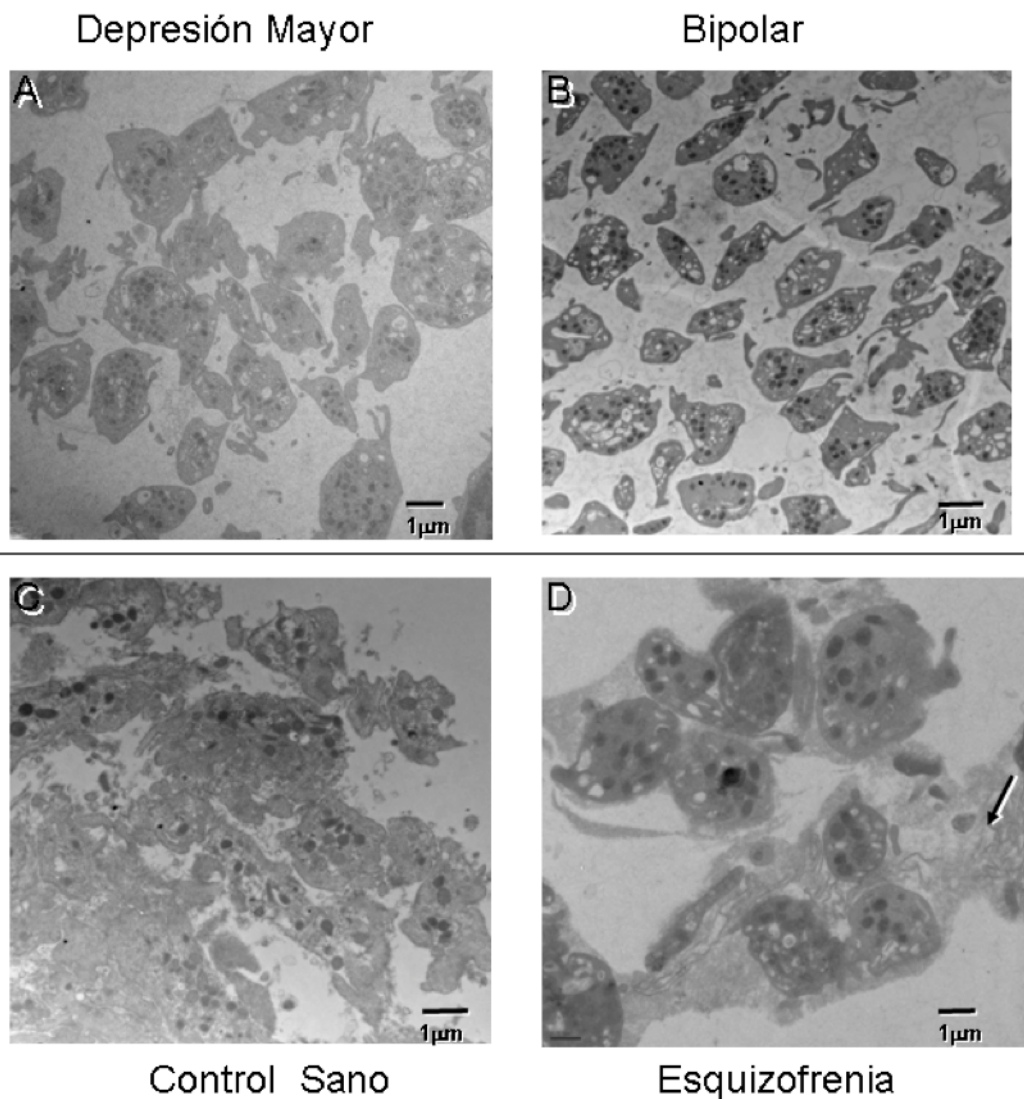


Fig. 5. Micrografías electrónicas (TEM) de plaquetas. **A:** Micrografía de plaquetas representativa del grupo de casos de depresión de apariencia normal, sistema canalicular abierto dilatado y cambio de forma con pseudópodos, datos representativos de activación plaquetaria. Magnificación de 3600x; **B:** Plaquetas de un control bipolar apariencia normal, sistema canalicular abierto dilatado y cambio de forma con pseudópodos, datos representativos de activación plaquetaria. Magnificación de 2900x; **C:** Plaquetas de control sano de apariencia normal. Magnificación de 4800x; **D:** Plaquetas representativas de un paciente con esquizofrenia con depósitos de fibrina rodeando a las plaquetas (flecha), un dato representativo de activación y agregación plaquetaria. Magnificación de 14000x Barra= 1 μ m

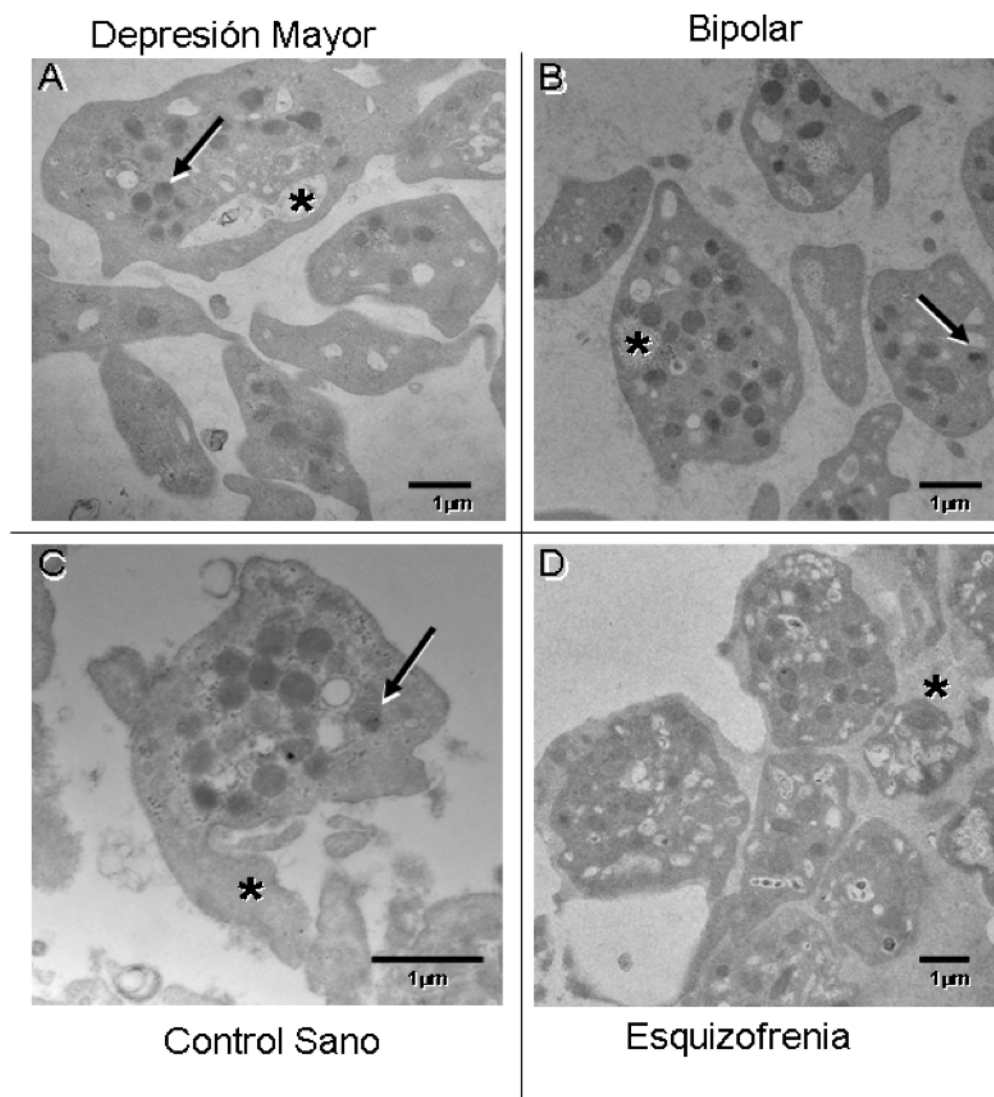


Fig 6. Micrografías electrónicas (TEM) de plaquetas a mayor magnificación. **A.** Micrografía representativa de plaquetas de pacientes con depresión. Se observa el sistema canalicular abierto dilatado (*), gránulos alfa de apariencia normal (flecha), no se observan gránulos densos. Cambio de forma y sistema canalicular abierto dilatado son datos representativos de activación plaquetaria. Magnificación 8,000x **B.** Micrografía representativa de un control bipolar donde se observa una plaqueta normal, con gránulos densos (flecha) y depósito de glicógeno (*). Magnificación 8,000x **C.** Micrografía de control sano mostrando cambio de forma parecida a pseudópodo (*), típica de una plaqueta activada, mitocondrias (flecha). Magnificación de 13,000x. **D.** Micrografía representativa de controles con esquizofrenia, se observa el depósito de fibrina (*) que rodea a las plaquetas y la disposición periférica de los gránulos es signo de activación y agregación plaquetaria. Magnificación 8,000x Barra=1μm

4.3 Inmunohistoquímica

4.3.1 Análisis Espacial

El análisis espacial consistió en la observación de las micrografías confocales fluorescentes de las plaquetas teñidas con anticuerpo contra serotonina y PF-4. Las Figuras 7 y 8 muestran unas micrografías fluorescentes representativas de cada grupo de estudio. En el grupo de controles sanos se observó una distribución uniforme en la expresión del anticuerpo anti-serotonina que tiñe los gránulos densos y del anticuerpo anti-PF-4 que tiñe los gránulos alfa. En el grupo de pacientes con depresión se observó una notable disminución en la intensidad expresión del anticuerpo anti-serotonina, así como un aumento en la intensidad de la expresión del anticuerpo anti-PF-4. En el grupo de bipolares se observó una disminución en la expresión del anticuerpo anti-serotonina serotonina, sin embargo la expresión del anticuerpo anti-PF-4 se observó de distribución normal, similar a la expresión de los conroles sanos. El grupo de esquizofrenia por presentar plaquetas envueltas en una red de fibrina autofluorescente no fue posible identificar gránulos individuales en ambos canales.

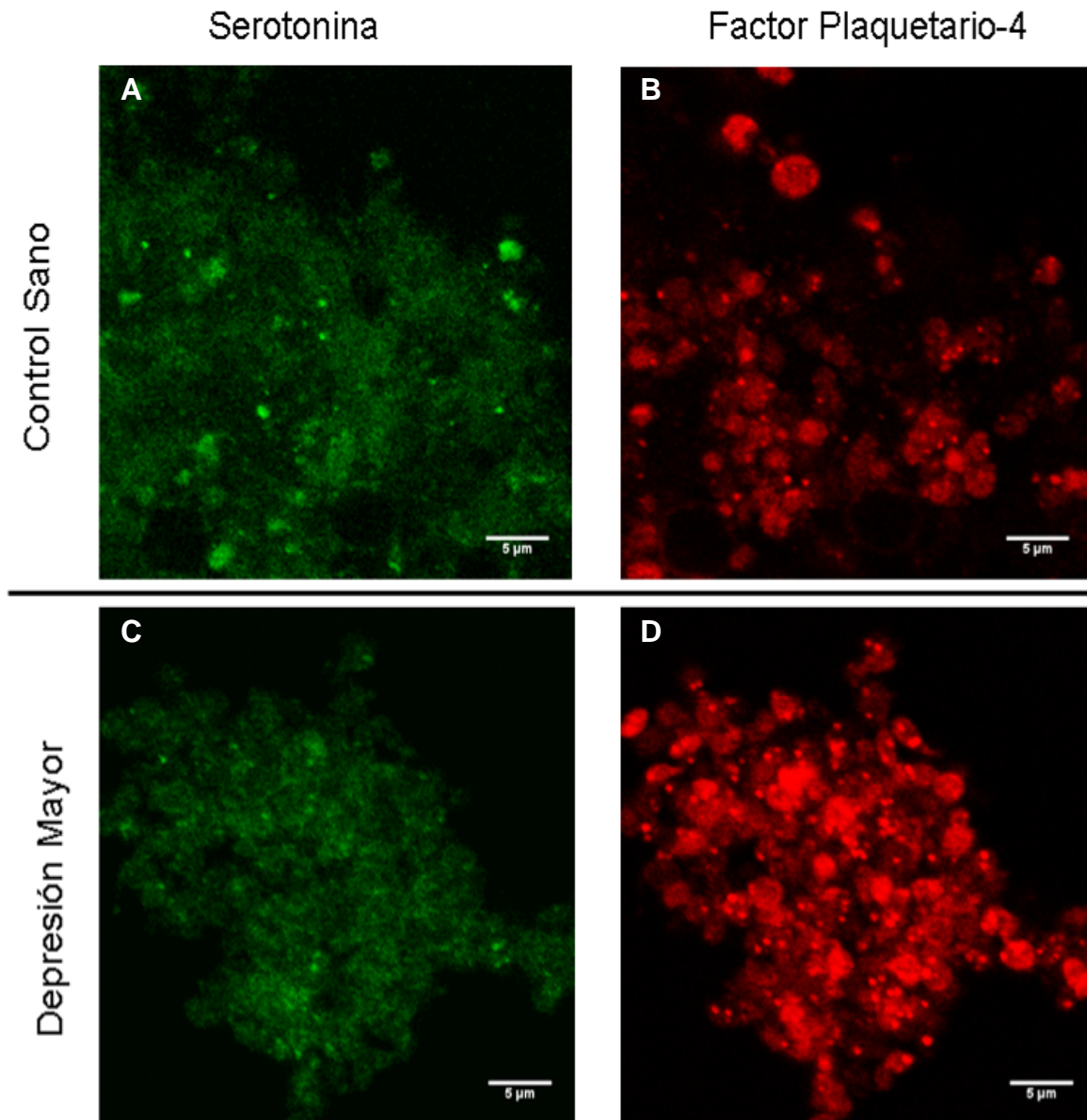


Fig 7. Micrografías confocales con doble tinción de control sano y caso de depresión. Cada par de micrografías fue obtenida simultáneamente en las mismas coordenadas espaciales. En la columna izquierda se muestran las tinciones de serotonina (verde) que tiñe a los gránulos densos y la columna derecha que se muestran las tinciones del factor plaquetario-4 (rojo) que tiñe a los gránulos alfa. **A:** Micrografía de plaquetas de control sano en donde se aprecia un grupo de plaquetas con los gránulos densos fluorescentes con una distribución normal. **B:** El mismo grupo de plaquetas de un control sano, se presenta la tinción de los gránulos alfa fluorescentes con una distribución normal. **C:** Micrografía que representa al grupo de depresión, con una notable disminución en la intensidad de la expresión de serotonina **D:** Micrografía que representa al grupo de depresión mostrando un aumento en la expresión del FP-4. Barra=5µm.

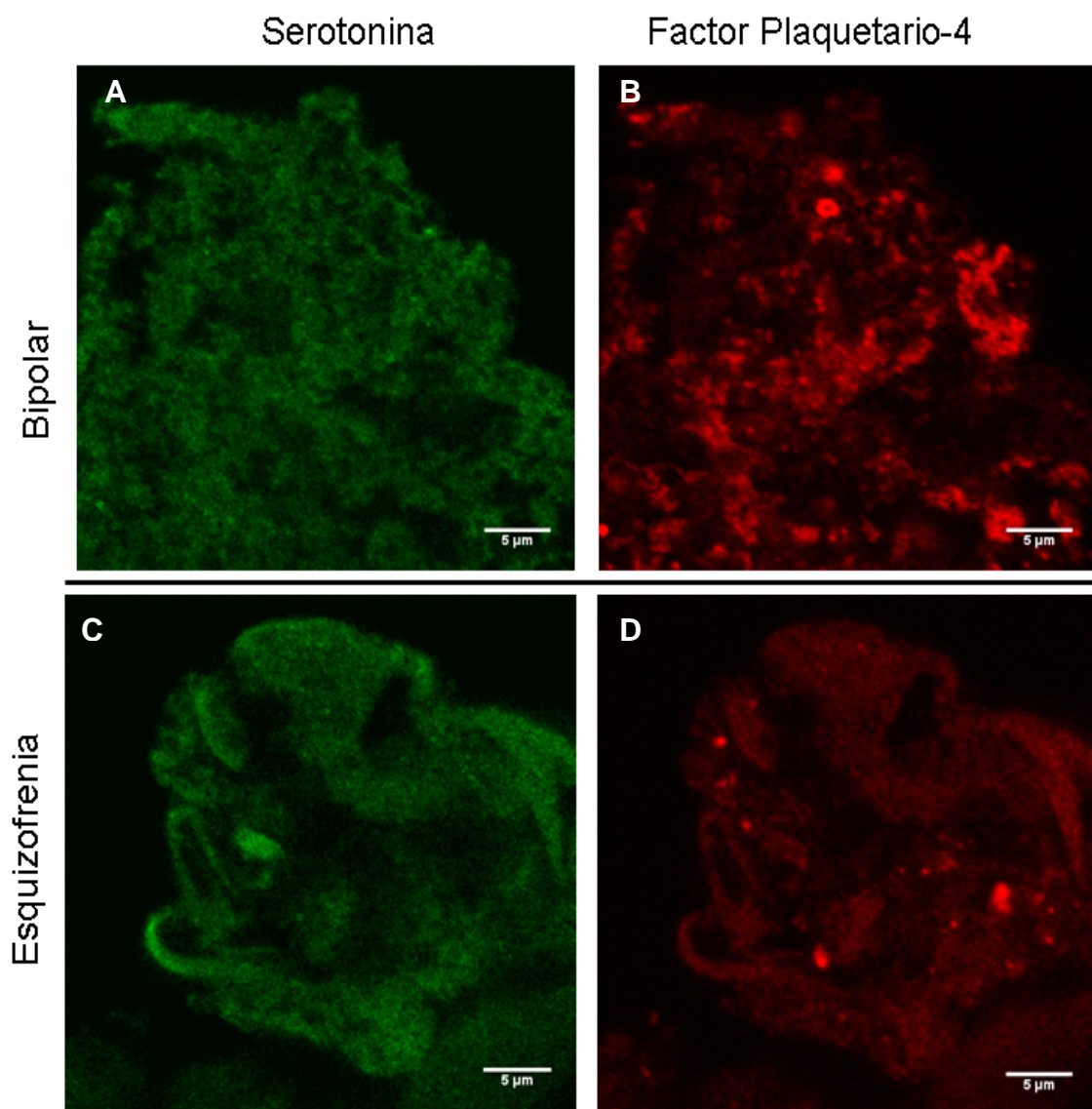


Fig 8. Micrografías confocales con doble tinción de control bipolar y control esquizofrenia. Cada par de micrografías fue obtenida simultáneamente en las mismas coordenadas espaciales. En la columna izquierda se muestran las tinciones de serotonina (verde) que tiñe a los gránulos densos y la columna derecha que se muestran las tinciones del factor plaquetario-4 (rojo) que tiñe a los gránulos alfa. **A:** Micrografía que representa el grupo de bipolares, con una disminución en la expresión de serotonina. **B:** Micrografía que representa el grupo de bipolares, la expresión del FP-4 es igual a la de un control sano. **C y D:** Micrografía representa al grupo de esquizofrenia donde se observa una red de fibrina autofluorescente difícilmente se observan los gránulos. Barra=5 μ m.

TINCIÓN DE SEROTONINA

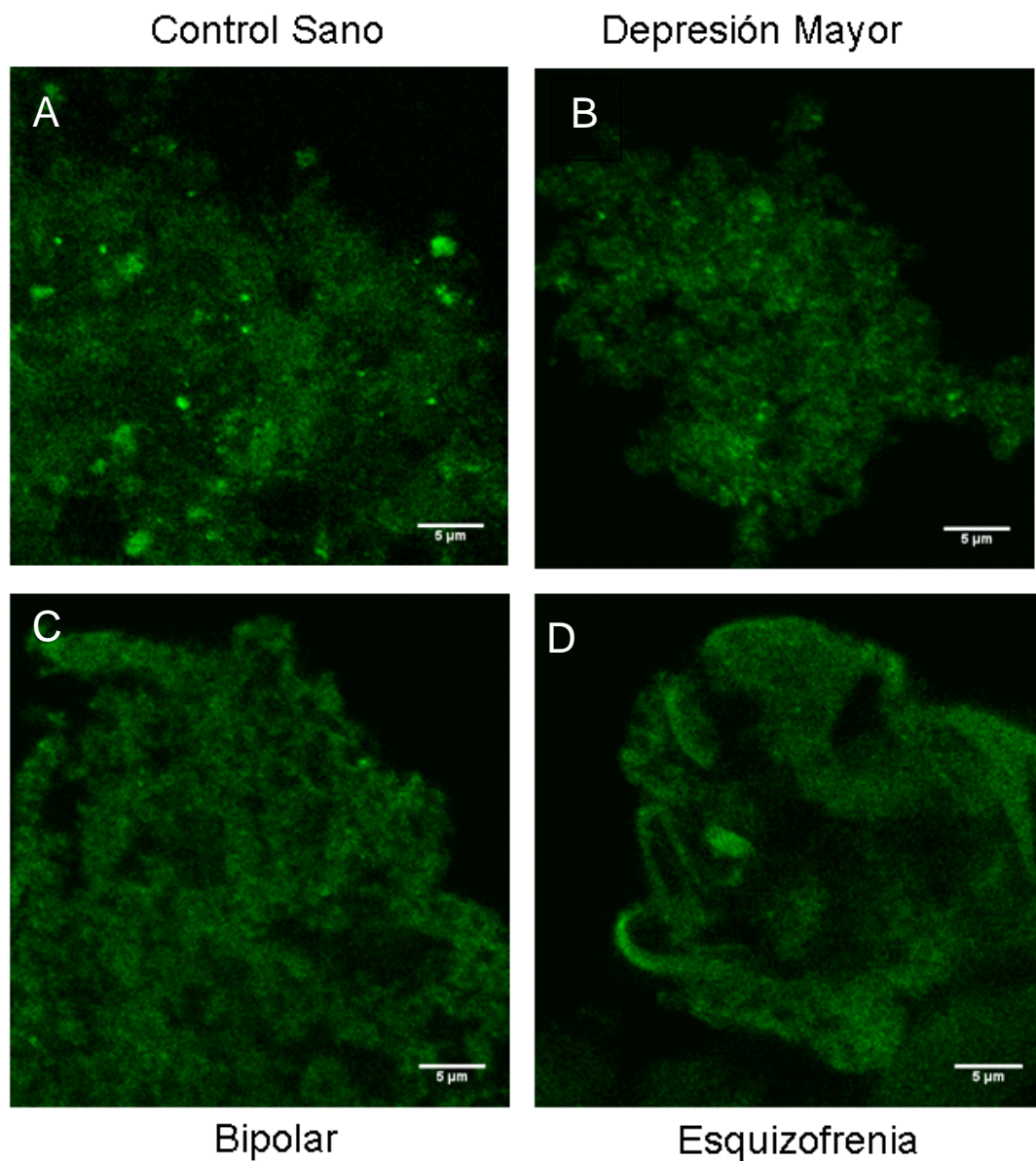


Fig 9. Grupo de cuatro micrografías confocales de plaquetas teñidas con anticuerpo contra serotonina (verde) que señala a los gránulos densos. **A.** Control sano, se muestra un grupo de plaquetas donde se aprecian un los gránulos densos fluorescentes con una distribución normal. **B.** Casos de depresión, se muestra una notable disminución en la intensidad de la expresión de serotonina comparado con los controles sanos. **C.** Controles bipolares, se muestra, también, una disminución en la expresión de serotonina. **D.** Controles esquizofrenia donde se observa una red de fibrina autofluorescente difícilmente se observan los gránulos. Barra=5µm.

TINCIÓN CON FACTOR PLAQUETARIO-4

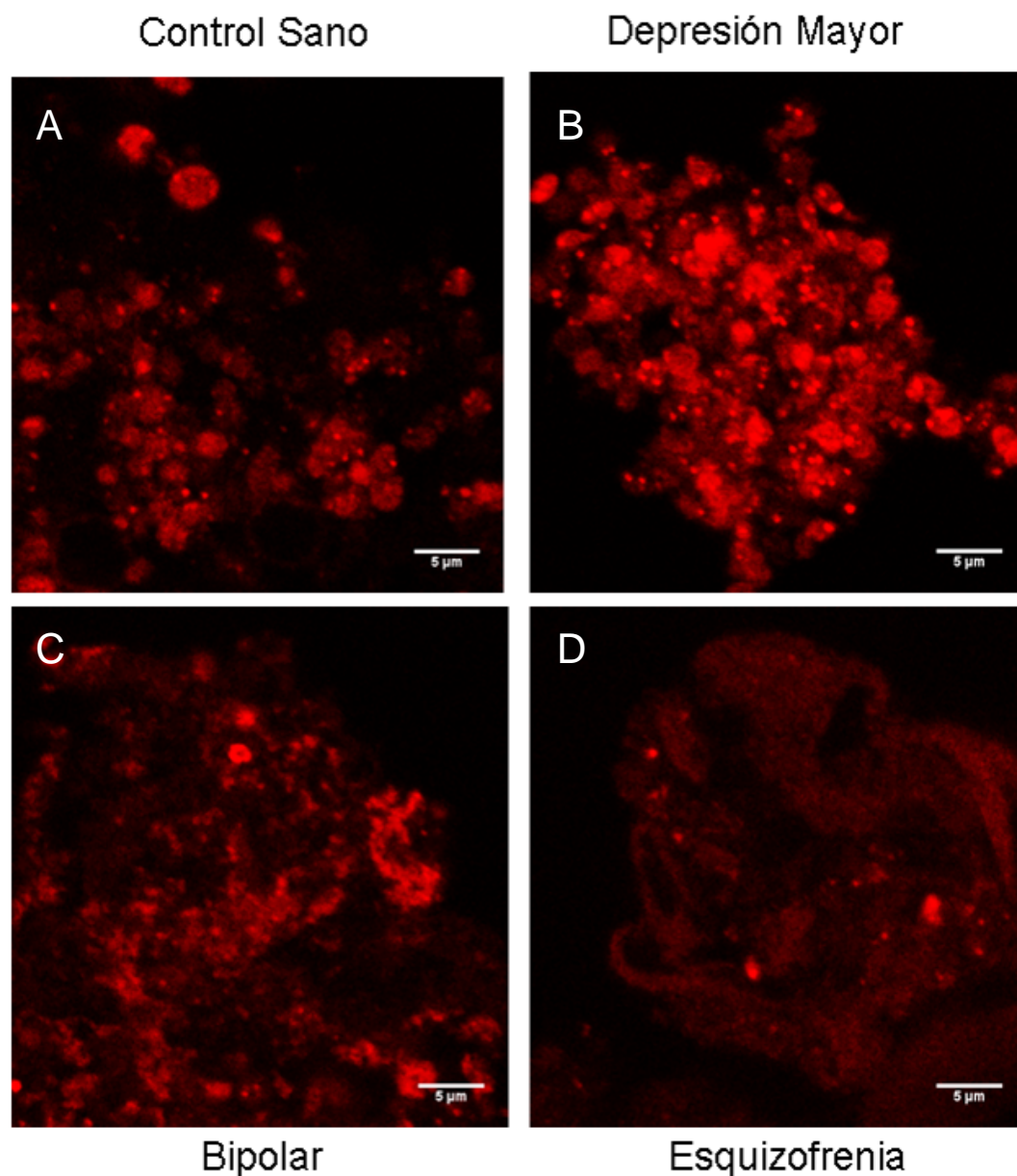


Fig 10. Grupo de cuatro micrografías confocales de plaquetas teñidas con anticuerpo contra factor plaquetario-4 (rojo) que señala a los gránulos alfa. **A.** Control sano, se muestra un grupo de plaquetas donde se aprecian un los gránulos alfa fluorescentes con una distribución normal. **B.** Casos de depresión, se muestra un aumento en la intensidad de la expresión del factor plaquetario-4 comparado con los controles sanos. **C.** Controles bipolares, se muestra una distribución normal, comparable con la de un control sano. **D.** Controles esquizofrenia donde se observa una red de fibrina autofluorescente ocasionalmente se pueden observar los gránulos. Barra=5µm.

4.3.2 Análisis Cuantitativo

Después de obtener las micrográficas, se procedió a hacer un análisis cuantitativo de las observaciones. Se estudiaron un promedio de 120.32 plaquetas por individuo. La Tabla 7 muestra el resumen de los cuatro grupos con el número de plaquetas, gránulos densos y gránulos alfa.

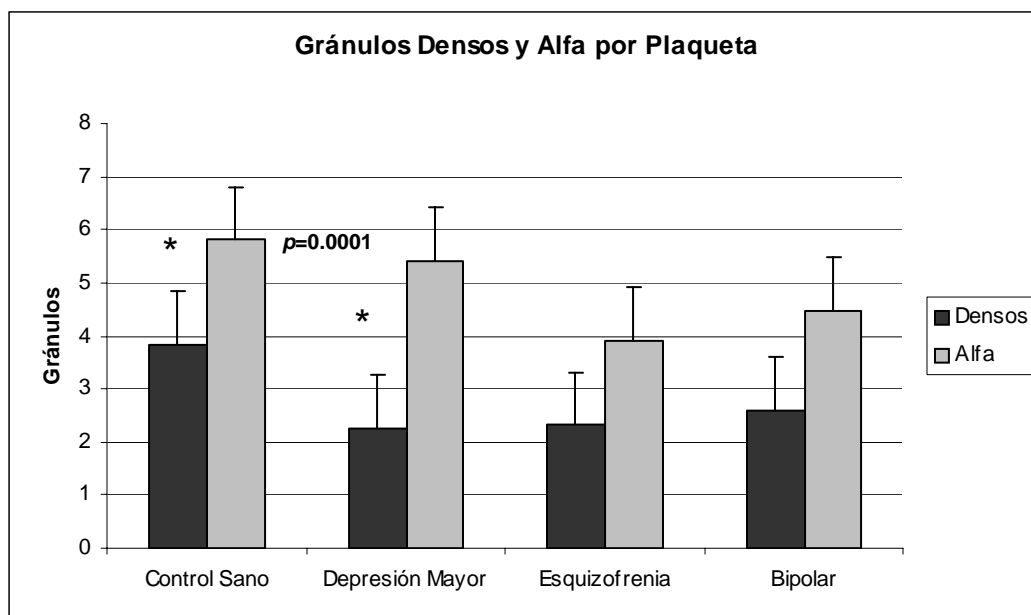
En el grupo de depresión (n= 15) se observó un promedio de 2.27 gránulos densos y 5.4 gránulos alfa por plaqueta. En el grupo de controles sanos (n=12) se observó un promedio de 3.8 gránulos densos y 5.8 gránulos alfa por plaqueta. En el grupo de controles bipolares (n=12) se observó un promedio de 2.5 gránulos densos y 4.5 gránulos alfa por plaqueta. En el grupo de controles esquizofrenia (n=12) se observó un promedio de 2.3 gránulos densos y 3.9 gránulos alfa por plaqueta. Se obtuvo un $p= 0.00001$ en la comparación de gránulos densos en los casos de depresión y controles sanos (ver Tabla 8 y Gráfica 1). El resto de los grupos y los gránulos alfa no se presentaron diferencias.

Depresión Mayor (n=15)	plaquetas analizadas	densos analizados	alfa analizados	sano (n=12)	plaquetas analizadas	densos analizados	alfa analizados
1	108	318.73	1045.27	1	107	323.73	309.32
2	104	324.74	849.47	2	129	434.57	1013.27
3	106	178.79	395.67	3	117	588.71	1037.93
4	114	342.56	932.92	4	105	496.27	860.33
5	115	244.85	628.3	5	117	528.08	790
6	116	192	453.45	6	195	573.02	907.8
7	102	231.53	497.07	7	100	347.04	549.52
8	110	288.25	845.17	8	115	747.47	465.45
9	158	445.55	432.32	9	114	396.18	317.9
10	124	244.03	457.22	10	132	388.85	490.85
11	104	180.64	640.66	11	152	442.35	929.86
12	102	306.81	326.7	12	100	441.67	941.34
13	136	301.26	492.16				
14	133	298.78	792.22				
15	165	176.6	937.34				
Promedio	119.8			Promedio	123.58		
Control Esquizo (n=12)	Número plaquetas analizadas	Gránulos densos analizados	Gránulos alfa analizados	Control bipolar (n=12)	Número plaquetas analizadas	Gránulos densos analizados	Gránulos alfa analizados
1	113	420.23	253.46	1	117	224.11	244.19
2	121	345.29	597.77	2	130	384.44	623.82
3	141	418.92	1074.72	3	124	153.33	320.24
4	117	211.69	114.27	4	133	204.79	524.5
5	104	240.53	240.53	5	111	242.47	495.81
6	127	321.25	655.79	6	109	332.32	600.82
7	106	192.99	344.34	7	109	312.86	682.63
8	102	206.77	472.76	8	149	529.35	160.67
9	147	242.49	419.9	9	104	354.51	422.77
10	109	230.62	393.85	10	106	347.57	691.7
Promedio	118.7			Promedio	119.2		

Tabla 7. Resumen por grupos del análisis cuantitativo obtenido a partir de las micrografías.

	t	Des. Stand.	Grados de libertad	Valor de p <0.05
GRÁNULOS DENSOS				
SANO/DEPRESIÓN	5.43	97.1	25	0.0001
BIPOLAR/DEPRESIÓN	1.38	93.9	25	0.18
ESQUIZO/DEPRESIÓN	2.75	78.8	25	0.79
GRÁNULOS ALFA				
SANO/DEPRESIÓN	0.714	251	25	0.48
BIPOLAR/DEPRESIÓN	-1.01	239	25	0.32
ESQUIZO/DEPRESIÓN	-1.89	240	25	0.07

Tabla 8. Estadística comparativa de los gránulos densos y gránulos alfa. Se compararon los grupos de controles (sanos, esquizofrenia y bipolares) en relación al grupo de casos de depresión.

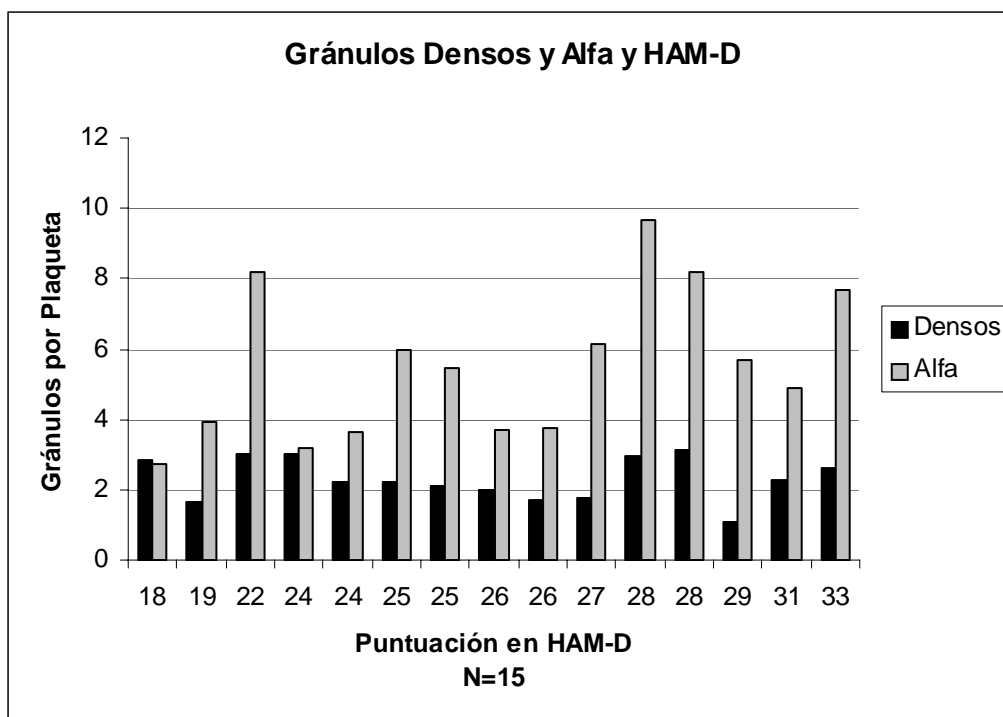


Gráfica 1. Número de gránulos densos y gránulos alfa por plaqueta. Gráfica por cada uno de los grupos de casos de depresión, controles sanos, esquizofrenia y bipolares analizado por las imágenes del microscopio confocal. Se incluye el error estándar de la media. Resultados estadísticamente significativos al 0.05.

* : $p= 0.0001$

4.3.3 Análisis de Gránulos y HAM-D

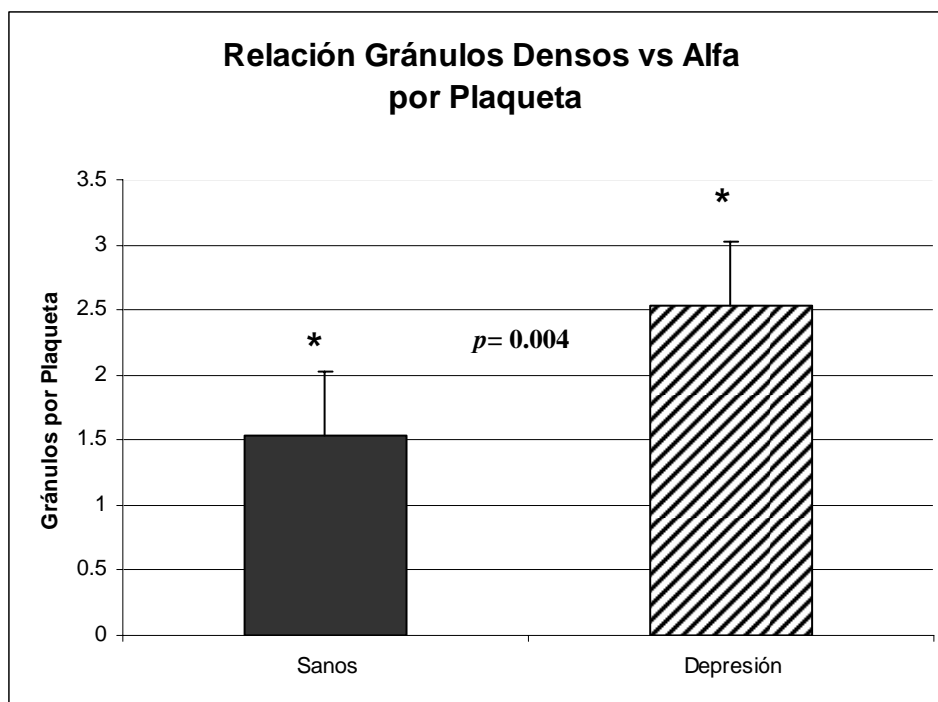
Para que un paciente con depresión fuera incluido en este estudio, era necesario contar con más de 18 puntos en la Escala de Depresión de Hamilton (HAM-D). En esta escala, entre mayor sea la puntuación, mayor es la severidad de los síntomas depresivos que presentan los individuos. El análisis entre la cantidad de gránulos densos y gránulos alfa y HAM-D se muestra en la Gráfica 2 se observa una tendencia a la disminución de los gránulos densos y al aumento en los gránulos alfa. En cuanto al factor plaquetario-4, se puede apreciar una tendencia a aumentar su expresión al aumentar la puntuación en HAM-D.



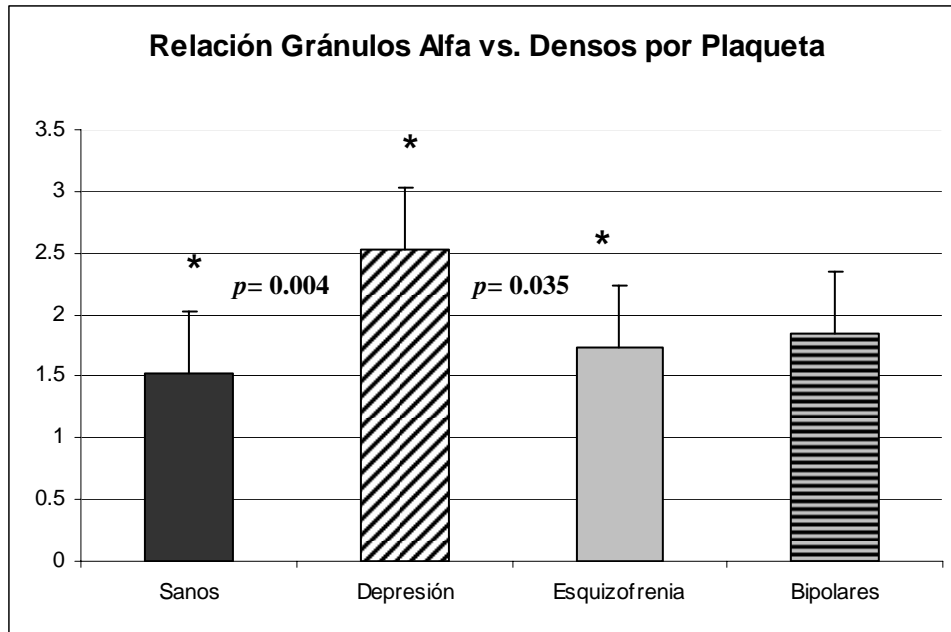
Gráfica 2. Representación de la cantidad de gránulos densos y gránulos alfa por plaqueta por cada individuo del grupo de casos de depresión y la puntuación de HAM-D.

4.3.4 Relación de Gránulos Densos y Alfa

En este trabajo se evaluaron dos elementos, que pensamos pueden contribuir a la presentación de las enfermedades mentales. Se llevó a cabo un análisis para determinar la relación que existe entre los gránulos densos y los gránulos alfa plaquetarios. Para determinar las diferencias entre el grupo de depresión, controles sanos, individuos con esquizofrenia y trastorno bipolar, se comparo la relación del número de gránulos alfa por gránulos densos por plaqueta. Los resultados se muestran en la Gráfica 3, 4 y Tabla 9.



Gráfica 3. Relación del número de gránulos alfa por cada gránulo denso por plaqueta en los pacientes con depresión y controles sanos.



Gráfica 4. Relación del número de gránulos alfa por cada gránulo denso por plaqueta en los pacientes con depresión y controles sanos, esquizofrenia y bipolares.

	n	media	Desv. Stand.	df	95% IC		t	valor de p <0.05
					inferior	superior		
Sano/Depresión	15	2.53	1.06	25	2.064	2.987	-2.96	0.004
Esquiz/Depresión	12	1.74	0.686	22	1.371	2.109	-2.23	0.035
Bipolares/Depresión	12	1.85	0.775	22	1.45	2.249	-1.85	0.076

Tabla 9. Relación de gránulos alfa y gránulos densos en los casos y los tres controles.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo se llevó a cabo bajo un riguroso proceso de selección de los pacientes en base a la presentación clínica de sus síntomas psiquiátricos. Se estudió la cantidad y el equilibrio entre la serotonina y el PF-4 en plaquetas de pacientes con depresión mayor con la intención de unir la teoría serotoninérgica y la teoría inflamatoria de la depresión. El estudio de estos componentes plaquetarios pueden servir en un futuro para ofrecer un método objetivo que apoye el diagnóstico clínico de la depresión. Este es el primer reporte que documenta experimentalmente esta relación.

El resultado del análisis espacial (micrografías) fueron representativas de plaquetas preservadas donde se observa que las plaquetas de los controles sanos contienen de 3-4 gránulos densos y 5-6 gránulos alfa por plaqueta que se encuentran distribuidos uniformemente dentro del citoplasma representativos de la morfología de las plaquetas normales que reporta en la literatura. Una de las ventajas del uso de microscopia confocal es que se hace presenta una resolución de mejor calidad en x y y, así como secciones ópticas sin alteración física de las células que elimina la imagen borrosa que se observaría con el uso de la epifluorescencia solamente, por esta razón es de esperar una reducción en el número de gránulos por plaqueta. Las plaquetas de los pacientes de todos los grupos mostraron cierto grado de activación plaquetaria, que se observó con depósito de fibrina (rodeando las plaquetas), sistema canalicular abierto dilatado

y glicógeno (Figura 5) que es común en las preparaciones de plaquetas para investigación clínica.

El análisis cuantitativo permite la observación resultados numéricos a partir de las micrografías, por lo que se tienen resultados más preciso y se elimina el sesgo para establecer las comparaciones entre los grupos de este estudio. Los resultados del análisis espacial y del análisis cuantitativo demostraron una notable disminución en la cantidad de serotonina en los pacientes con depresión comparados con los controles sanos que apoya la hipótesis serotoninérgica de la depresión (16, 21, 22, 23, 24). La serotonina también se encontró disminuida en el grupo de bipolares, haciéndonos suponer que la disminución en la cantidad de serotonina está involucrada en la presentación clínica de los síntomas de la depresión (síntomatología compartida por la depresión mayor y de la fase depresiva del trastorno bipolar). El análisis espacial del PF-4 demostró un aumento en la expresión de este marcador en el grupo de pacientes con depresión, pero no se presentó aumentado en el grupo de bipolares. El aumento en la expresión de PF-4 observado en las imágenes nos hace suponer la presencia de un componente inflamatorio que se relaciona directamente con la disminución de la serotonina plaquetaria en los pacientes que sufren depresión. El aumento en la expresión de PF-4 que observamos en el análisis espacial no fue posible confirmarlo en el análisis cuantitativo, siendo esta una de las limitantes que encontramos con el uso de microscopía óptica ya que solo tiene la resolución para el análisis de las subestructuras celulares

mayores de 200 μm . Los resultados del análisis del PF-4 no concluyentes bajo estas condiciones por lo que es necesario aumentar el número de la muestra y utilizar otros métodos de análisis como ELISA, citometría de flujo, genética y proteómica. Por otro lado, estudios con otras poblaciones han podido demostrar el aumento en la activación plaquetaria (97) a través del aumento en la P-selectina y PF-4 en el plasma de los pacientes con depresión y enfermedad coronaria (98). Se encontró que en los pacientes con enfermedad isquémica coronaria con depresión mayor comorbida presentaban una elevación del PF-4 y la β -tromboglobulina (β -TG) (97, 99, 100) produciendo un aumento en la agregación plaquetaria, asociada a una mayor mortalidad (100). El aumento del PF-4 y β -TG implica un riesgo más elevado de agregación plaquetaria con el potencial de presentar complicaciones trombóticas en los pacientes deprimidos (101). Otro ejemplo más en donde las plaquetas están involucradas en la depresión es el estudio SADHART (101), donde la sertralina (SSRI) redujo significativamente la liberación de β -TG, E-selectina, y componentes inflamatorios; redujo, también, la activación de plaquetas en presencia de regímenes antiplaquetarios tradicionales, como la aspirina y clopidogrel, por lo que se considera que la sertralina tiene un efecto antiplaquetario.

En este trabajo se estudió, también, el número de gránulos densos y gránulos alfa en relación con un instrumento estandarizado para medir la severidad de los síntomas de depresión (Escala de Depresión de Hamilton). Entre mayor es la puntuación en esta escala, mayor es la severidad de los

síntomas depresivos que se relaciona con una menor cantidad de serotonina en los gránulos plaquetarios y a un aumento en el PF-4. Siendo este el primer reporte en el que se documenta experimentalmente la relación con un instrumento estandarizado.

En la literatura médica se presentan muchos ejemplos de resultados binarios para diagnóstico de enfermedades, o estados fisiológicos, como la elevación de la gonadotropina coriónica humana en el diagnóstico del embarazo, la confirmación de infección por virus o bacterias por medio de cultivos, etc. Sin embargo, los avances en la investigación clínica han cambiado los resultados binarios a umbrales de acción de moléculas de relevancia médica, como la glucemia en el diagnóstico de la diabetes mellitus, el antígeno prostático específico en el diagnóstico de hiperplasia o el cáncer de próstata. La mayoría de los sistemas biológicos tienen moléculas que se relacionan entre si en equilibrio. La mayoría presentan un umbral, que al ser cruzado produce un estado patológico. La relación entre dos o más moléculas es lo que ha generado el interés en la investigación biomédica, ya que tienen el potencial de ser utilizadas como marcadores diagnósticos de uso clínico. Aquí se estudió el equilibrio entre la serotonina y el PF-4 donde se observó una diferencia mayor entre la cantidad de gránulos alfa (PF-4) por cada gránulo denso (serotonina) en los pacientes con depresión reflejando una menor cantidad de serotonina plaquetaria y una mayor cantidad de PF-4 en el grupo de pacientes con depresión comparado con el grupo controles sanos. Estos resultados indican

que en la serotonina y el PF-4 de las plaquetas de las personas que tienen depresión se encuentran en desequilibrio. Este desequilibrio podría apoyar en el diagnóstico de las enfermedades depresivas en la población general al introducir una medición objetiva. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa, $p=0.035$, entre los pacientes con depresión y con esquizofrenia, este resultado puede complementar el diagnóstico clínico de la depresión en la población psiquiátrica. No se encontraron diferencias entre el grupo de depresión y el grupo de pacientes bipolares ($p=0.18$). (Gráfica 4 y Tabla 9). Se necesitan más estudios para poder encontrar diferencias entre estas poblaciones tan parecidas clínicamente.

La microscopía electrónica de transmisión proporciona la resolución apropiada para investigar los componentes intracelulares, en este caso los gránulos plaquetarios. Los cambios morfológicos que se observaron en las micrografías de los pacientes con esquizofrenia fueron activación, agregación y una disminución en la cantidad de gránulos densos (serotonina) Esta es una observación que se corroboró bajo dos técnicas independientes de microscopía (óptica y electrónica). La disminución en la cantidad de gránulos densos es el resultado del proceso de agregación plaquetaria, donde se secretó el contenido de estos gránulos (ver Fig. 3). La serotonina que es el componente principal de los gránulos densos, juega un papel importante en este paso, ya que al ser liberada, activa a más plaquetas en el proceso de agregación (102, 103). Algunas de las limitaciones en el estudio de las plaquetas con microscopía

electrónica de transmisión (TEM) son el proceso de fijación de las plaquetas donde se evita producir activación química (104). El tiempo de preparación de las muestras, secciones y uso del microscopio requiere de la adquisición de un gran número de micrografías.

Los pacientes con episodios psicóticos activos (principalmente delirios, alucinaciones y conducta desorganizada) presentan un aumento en el contenido de serotonina en las plaquetas. Este aumento se correlaciona con una calificación alta en la escala de PANSS (Escala de Síndromes Positivos y Negativos) en el grupo de psicosis y una correlación negativa con los valores del transportador de serotonina. Estos resultados demuestran que el contenido de serotonina y la inmunoreactividad del transportador de serotonina en las plaquetas puede ser un marcador de psicosis, especialmente en pacientes varones (105). Las plaquetas de pacientes con esquizofrenia presentan un aumento en la agregación al estimularlas con colágeno (106). Los antipsicóticos atípicos reducen la agregación plaquetaria en pacientes con esquizofrenia y controles in vitro. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados en la literatura, adicionalmente se confirmó que las plaquetas de los pacientes con esquizofrenia se pueden activar más fácilmente que las plaquetas de los controles sanos, de los pacientes con depresión o las de los sujetos bipolares. Ertugul en el 2007 (107), demostró que los niveles de serotonina plasmática, y MAO plaquetaria se encuentran disminuidos en los pacientes con esquizofrenia, y que al ser tratados con clozapina (antipsicótico atípico) por 8

semanas los niveles de serotonina plasmática y MAO plaquetaria aumentaron de manera significativa, mientras que la serotonina plaquetaria disminuyó significativamente. Este puede ser un marcador de respuesta al tratamiento en pacientes con esquizofrenia, Una de las teorías que se han estudiado en relación a los cambios y función plaquetaria es el estrés oxidativo que se presenta en la esquizofrenia. El estrés oxidativo en las plaquetas se presenta en varias enfermedades, incluyendo enfermedades neuropsiquiátricas. La actividad de la superóxido dismutasa (enzima antioxidante plaquetaria) en pacientes con esquizofrenia se encuentra disminuida y hay una correlación negativa entre la inhibición de la actividad de este antioxidante y un aumento en la peroxidación de lípidos de las plaquetas (108).

Es necesario continuar con estudios de las plaquetas como marcadores periféricos de enfermedades psiquiátricas aumentando el número de individuos, estudiando otros marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, factor de crecimiento vascular endotelial) marcadores de activación y agregación plaquetaria adicionales (P-selectina y β -trombogloulina); neurotransmisores (glutamato, dopamina, actividad de MAO, transportador de serotonina y receptor de serotonina plaquetaria); la utilización de otros métodos (ELISA, citometría de flujo, genética y proteómica), así como de incluir en los estudios otras poblaciones con comorbilidad médica y psiquiátrica.

6. CONCLUSIONES

Las plaquetas de los pacientes con depresión mayor presentan una disminución en la cantidad de serotonina, apoyando la hipótesis serotoninérgica de la depresión. El aumento en PF-4 se observó solamente en el análisis espacial, no así en el análisis cuantitativo, por lo que se necesitan mas estudios para determinar con certeza la teoría inflamatoria de la depresión. Se encontró también una disminución en la cantidad de serotonina en la población de pacientes con trastorno bipolar, no se encontró un aumento del PF-4 en esta población. El equilibrio en la relación del número de gránulos alfa por gránulos densos tiene el potencial de ser utilizada como método objetivo para complementar el diagnóstico clínico de depresión mayor en la población general. Las observaciones muestran evidencia experimental que une a la teoría serotoninérgica y a la teoría inflamatoria de la depresión con importantes implicaciones en la fisiopatología de la depresión.

Es importante el estudio biológico de las enfermedades psiquiátricas utilizando a las plaquetas, por lo que es necesario continuar con más estudios aumentando el tamaño de la muestra, marcadores inflamatorios, marcadores de activación, agregación plaquetaria y neurotransmisores bajo otras técnicas de investigación.

REFERENCIAS

1. DSM-IV Diagnostic and statistical Manual of Psychiatric Disorders. Trastornos del estado de ánimo y trastornos psicóticos. Fourth edition. American Psychiatric Press, 2001
2. International Statistical Classification of Diseases and Health Related Problems (The ICD-10) Second Edition. World Health Organization, 2007
3. World Health Report 2001: Mental Health: A New Understanding, a new hope. Chapter 1. World Health Organization: Geneva, Switzerland
4. Medina-Mora ME, Borges G, Lara C, Benjet C, Blanco J, Fleiz C *et al.* Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Ment* 2003;26:1-16.
5. Thornicroft G, Sartorius N: The course and outcome of depression in different cultures: 10-year follow-up of the WHO Collaborative Study on the Assessment of Depressive Disorders. *Psychol.Med.* 1993; 23:1023-1032
6. Roy A: Suicidal behavior in depression: relationship to platelet serotonin transporter. *Neuropsychobiology* 1999; 39:71-75
7. Bai J, He F, Novikova SI, Undie AS, Dracheva S, Haroutunian V, Lidow MS: Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biol.Psychiatry* 2004; 56:427-440
8. Hales RE, Yudofsky SC, Talbott JA. DSM-IV Tratado de Psiquiatria. Edit. Masson, 2000
9. Carlsson A: The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1988; 1:179-186
10. Meltzer HY: Biological studies in schizophrenia. *Schizophr.Bull.* 1987; 13:77-111
11. Young SN, Leyton M: The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2002; 71:857-865
12. Creese I, Burt DR, Snyder SH: Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 1976; 192:481-483
13. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K: Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 1976; 261:717-719
14. Sternberg DE, VanKammen DP, Lerner P, Bunney WE: Schizophrenia: dopamine beta-hydroxylase activity and treatment response. *Science* 1982; 216:1423-1425
15. Nishizawa S, Benkelfat C, Young SN, Leyton M, Msengeza S, De Montigny C, Blier P, Diksic M. Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:5301-5313
16. Stahl SM: Neuroendocrine markers of serotonin responsivity in depression. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1992; 16:655-659
17. Kalia M: Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism* 2005; 54:24-27
18. US Department of Health and Human Services. Mental Health: a report of the surgeon general. Rockville (Md): DHHS,VSPHS; 1999.
19. Pryor JC, Sulser F. Evolution of the monoamine hypothesis of depression. In: Horton RW, Katona CLE, editors. *Biological aspects of affective disorders.* New York: Academic Press; 1991. pg.77-94.

20. Plein H, Berk M: The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness. *Hum.Psychopharmacol.* 2001; 16:229-236
21. Meltzer HY: Role of serotonin in depression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1990; 600:486-499
22. Coppen A, Prange AJ, Jr., Whybrow PC, Noguera R: Abnormalities of indoleamines in affective disorders. *Arch.Gen.Psychiatry* 1972; 26:474-478
23. Coppen A, Wood K: 5-Hydroxytryptamine in the pathogenesis of affective disorders. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 1982; 34:249-258
24. Coppen A, Swade C, Wood K: Platelet 5-hydroxytryptamine accumulation in depressive illness. *Clin.Chim.Acta* 1978; 87:165-168
25. Fuse I: Disorders of platelet function. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 1996; 22:1-25
26. Rausch JL, Johnson ME, Li J, Hutcheson J, Carr BM, Corley KM, Gowans AB, Smith J: Serotonin transport kinetics correlated between human platelets and brain synaptosomes. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 180:391-398
27. Dursun SM, Blackburn JR, Kutcher SP: An exploratory approach to the serotonergic hypothesis of depression: bridging the synaptic gap. *Med.Hypotheses* 2001; 56:235-243
28. Riedel WJ, Klaassen T, Schmitt JA: Tryptophan, mood, and cognitive function. *Brain Behav.Immun.* 2002; 16:581-589
29. Young SN, Chouinard G, Annable L: Tryptophan in the treatment of depression. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1981; 133:727-737
30. Dunn AJ, Wang J, Ando T: Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1999; 461:117-127
31. Banks WA, Farr SA, Morley JE: Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation.* 2002; 10:319-327
32. Kubera M, Maes M, Kenis G, Kim YK, Lason W: Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Psychiatry Res.* 2005; 134:251-258
33. Kronfol Z, Silva J, Jr., Greden J, Dembinski S, Gardner R, Carroll B: Impaired lymphocyte function in depressive illness. *Life Sci.* 1983; 33:241-247
34. Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M: Cytokines and major depression. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 2005; 29:201-217
35. Sluzewska A, Rybakowski J, Bosmans E, Sobieska M, Berghmans R, Maes M, Wiktorowicz K: Indicators of immune activation in major depression. *Psychiatry Res.* 1996; 64:161-167
36. Maes M: Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1995; 19:11-38
37. Stahl SM: The human platelet. A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders. *Arch.Gen.Psychiatry* 1977; 34:509-516
38. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE: Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci.* 1995; 57:1011-1026
39. Healy D, Leonard BE: Monoamine transport in depression: kinetics and dynamics. *J.Affect.Disord.* 1987; 12:91-103
40. Leonard BE: Sub-types of serotonin receptors: biochemical changes and pharmacological consequences. *Int.Clin.Psychopharmacol.* 1992; 7:13-21
41. Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P: Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J.Neurochem.* 1993; 60:2319-2322.

42. Pearse AG: The diffuse neuroendocrine system: peptides, amines, placodes and the APUD theory. *Prog.Brain Res.* 1986; 68:25-31
43. Ware JA, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, editors. *William's hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1995.p.1161-93.
44. White JG: Anatomy and structural organization of the platelet, in: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, edited by RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman, p 397. JB Lippincott, Philadelphia, 1993.
45. McNicol A, Israels SJ: Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb.Res.* 1999; 95:1-18
46. Holmsen H: Platelet secretion and energy metabolism, *in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, edited by RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman, p 524. JB Lippincott, Philadelphia, 1993
47. Alvarez JC, Gluck N, Arnulf I, Quintin P, Leboyer M, Pecquery R, Launay JM, Perez-Diaz F, Spreux-Varoquaux O: Decreased platelet serotonin transporter sites and increased platelet inositol triphosphate levels in patients with unipolar depression: effects of clomipramine and fluoxetine. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1999; 66:617-624
48. Shimbo D, Chaplin W, Crossman D, Haas D, Davidson KW: Role of depression and inflammation in incident coronary heart disease events. *Am.J.Cardiol.* 2005; 96:1016-1021
49. Camacho A, Dimsdale JE: Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosom.Med.* 2000; 62:326-336
50. Markovitz JH, Matthews KA: Platelets and coronary heart disease: potential psychophysiological mechanisms. *Psychosom.Med.* 1991; 53:643-668
51. Patterson SM, Zakowski SG, Hall MH, Cohen L, Wollman K, Baum A: Psychological stress and platelet activation: differences in platelet reactivity in healthy men during active and passive stressors. *Health Psychol.* 1994; 13:34-38
52. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N: Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91:2645-2657
53. Malkoff SB, Muldoon MF, Zeigler ZR, Manuck SB: Blood platelet responsivity to acute mental stress. *Psychosom.Med.* 1993; 55:477-482
54. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of Activated Platelets in Whole Blood Using Activation- Dependant Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry. *Blood.*1987;70 (1):307-315.
55. Besa EC, Catalano PC, Kant JA, Jefferes LC. Platelets. In: *Hematology*. National Medical Series for Independent Study. Baltimore: Williams& Wilkins; 1992. pg. 203.
56. Lederbogen F, Gilles M, Maras A, Hamann B, Colla M, Heuser I, Deuschle M: Increased platelet aggregability in major depression? *Psychiatry Res.* 2001; 102:255-261
57. Levine SP, Towell BL, Suarez AM, Knieriem LK, Harris MM, George JN: Platelet activation and secretion associated with emotional stress. *Circulation* 1985; 71:1129-1134
58. Patterson SM, Krantz DS, Gottdiener JS, Hecht G, Vargot S, Goldstein DS: Prothrombotic effects of environmental stress: changes in platelet function, hematocrit, and total plasma protein. *Psychosom.Med.* 1995; 57:592-599
59. Lederbogen F, Baranyai R, Gilles M, Menart-Houtermans B, Tschoepe D, Deuschle M: Effect of mental and physical stress on platelet activation markers in depressed patients and healthy subjects: a pilot study. *Psychiatry Res.* 2004; 127:55-64

60. Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG: Platelets as a model for neurones? *Experientia* 1988; 44:115-126
61. Stahl SM, Ciaranello RD, Berger PA: Platelet serotonin in schizophrenia and depression. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 1982; 34:183-198
62. Stahl SM, Meltzer HY: A kinetic and pharmacologic analysis of 5-hydroxytryptamine transport by human platelets and platelet storage granules: comparison with central serotonergic neurons. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1978; 205:118-132
63. Von Kanel R: Platelet hyperactivity in clinical depression and the beneficial effect of antidepressant drug treatment: how strong is the evidence? *Acta Psychiatr.Scand.* 2004; 110:163-177
64. Humphrey PP, Hartig P, Hoyer D: A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 1993; 14:233-236
65. Meltzer HY, Arora RC, Baber R, Tricou BJ: Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. *Arch.Gen.Psychiatry* 1981; 38:1322-1326
66. Hrdina PD, Bakish D, Chudzik J, Ravindran A, Lapierre YD: Serotonergic markers in platelets of patients with major depression: upregulation of 5-HT₂ receptors. *J.Psychiatry Neurosci.* 1995; 20:11-19
67. Quan-Bui KH, Plaisant O, Leboyer M, Gay C, Kamal L, Devynck MA, Meyer P: Reduced platelet serotonin in depression. *Psychiatry Res.* 1984; 13:129-139
68. Hrdina PD, Bakish D, Ravindran A, Chudzik J, Cavazzoni P, Lapierre YD: Platelet serotonergic indices in major depression: up-regulation of 5-HT_{2A} receptors unchanged by antidepressant treatment. *Psychiatry Res.* 1997; 66:73-85
69. Bakish D, Cavazzoni P, Chudzik J, Ravindran A, Hrdina PD: Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet serotonin parameters in major depressive disorder. *Biol.Psychiatry* 1997; 41:184-190
70. Biegon A, Essar N, Israeli M, Elizur A, Bruch S, Bar-Nathan AA: Serotonin 5-HT₂ receptor binding on blood platelets as a state dependent marker in major affective disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 1990; 102:73-75
71. Mendelson SD: The current status of the platelet 5-HT(2A) receptor in depression. *J.Affect.Disord.* 2000; 57:13-24
72. Roggenbach J, Muller-Oerlinghausen B, Franke L, Uebelhack R, Blank S, Ahrens B: Peripheral serotonergic markers in acutely suicidal patients. 1. Comparison of serotonergic platelet measures between suicidal individuals, nonsuicidal patients with major depression and healthy subjects. *J.Neural Transm.* 2006
73. Berk M, Mitchell VS, Plein H: The platelet intracellular calcium response to serotonin in subsyndromal depression. *Int.Clin.Psychopharmacol.* 1998; 13:107-110
74. Mikuni M, Kagaya A, Takahashi K, Meltzer HY: Serotonin but not norepinephrine-induced calcium mobilization of platelets is enhanced in affective disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 1992; 106:311-314
75. Plein H, Berk M, Eppel S, Butkow N: Augmented platelet calcium uptake in response to serotonin stimulation in patients with major depression measured using Mn²⁺ influx and ⁴⁵Ca²⁺ uptake. *Life Sci.* 2000; 66:425-431
76. Giret M, Launay JM, Dreux C, Zarifian E, Benyacoub K, Loo H: Modifications of biochemical parameters in blood platelets of schizophrenic and depressive patients. *Neuropsychobiology* 1980; 6:290-296
77. Freedman DX, Belendiuk K, Belendiuk GW, Crayton JW: Blood tryptophan metabolism in chronic schizophrenics. *Arch.Gen.Psychiatry* 1981; 38:655-659

78. Stahl SM, Woo DJ, Mefford IN, Berger PA, Ciaranello RD: Hyperserotonemia and platelet serotonin uptake and release in schizophrenia and affective disorders. *Am.J.Psychiatry* 1983; 140:26-30
79. Stahl K, Themann H, Dame WR: Ultrastructural morphometric investigations on normal human platelets. *Haemostasis* 1978; 7:242-251
80. Arora RC, Meltzer HY: Serotonin uptake in subpopulations of normal human blood platelets. *Biol.Psychiatry* 1982; 17:1157-1162
81. Franke L, Schewe HJ, Muller B, Campman V, Kitzrow W, Uebelhack R, Berghofer A, Muller-Oerlinghausen B: Serotonergic platelet variables in unmedicated patients suffering from major depression and healthy subjects: relationship between 5HT content and 5HT uptake. *Life Sci.* 2000; 67:301-305
82. Palmar M, Marcano A, Castejon O: Fine structural alterations of blood platelets in depression. *Biol.Psychiatry* 1997; 42:965-968
83. Butler J, Leonard BE: The platelet serotonergic system in depression and following sertraline treatment. *Int.Clin.Psychopharmacol.* 1988; 3:343-347
84. Mendelson SD: Platelet function and sertraline. *Am.J.Psychiatry* 2001; 158:823-82
85. Serebruany VL: Selective serotonin reuptake inhibitors and increased bleeding risk: are we missing something? *Am.J.Med.* 2006; 119:113-116
86. Muck-Seler D, Jakovljevic M, Pivac N: Platelet 5-HT concentrations and suicidal behaviour in recurrent major depression. *J.Affect.Disord.* 1996; 39:73-80
87. Berk M, Plein H, Csizmadia T: Supersensitive platelet glutamate receptors as a possible peripheral marker in schizophrenia. *Int.Clin.Psychopharmacol.* 1999; 14:119-122
88. Berk M, Plein H, Belsham B: The specificity of platelet glutamate receptor supersensitivity in psychotic disorders. *Life Sci.* 2000; 66:2427-2432
89. Novikova SI, He F, Cutrufello NJ, Lidow MS: Identification of protein biomarkers for schizophrenia and bipolar disorder in the postmortem prefrontal cortex using SELDI-TOF-MS ProteinChip profiling combined with MALDI-TOF-PSD-MS analysis. *Neurobiol.Dis.* 2006; 23:61-76
90. Bruce EC, Musselman DL: Depression, alterations in platelet function, and ischemic heart disease. *Psychosom.Med.* 2005; 67 Suppl 1:S34-S36
91. Bernhart W. *Atlas of Electron Microscopy. Biological Applications.* F. Scanga. Elsevier Publishing Inc. NY. 1964. Fig 324-325:218-219
92. Bocciarelli D. *Atlas of Electron Microscopy. Biological Applications.* F. Scanga. Elsevier Publishing Inc. NY. 1964. Fig 326:220
93. Coons AH. *Immunofluorescence.* Public Health Rep. 1960;75:937-43
94. Hamilton M: A rating scale for depression. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1960; 23:56-62
95. Beck AT, Beamesderfer A: Assessment of depression: the depression inventory. *Mod.Probl.Pharmacopsychiatry* 1974; 7:151-169
96. Boneu B, Caranobe C, Capdeville J, Robert A, Bierme R: Quantitative evaluation of mepacrine labelled human platelet dense bodies in normals and in cases of peripheral thrombocytopenia. *Thromb.Res.* 1978; 12:831-839
97. Musselman DL, Marzed UM, Manatunga A, Penna S, Reemsnyder A, Knight BT, Bron A, Hanson SR, Nemeroff CB. Platelet Reactivity in Depressed Patients Treated with Paroxetine.Preliminary Findings. *Arch. Gen. Psychiatry.*2000;57:875-882
98. Fielding R. Depression and acute myocardial infraction: A review and reinterpretation. *Soc Sci Med.*1991;32:1017-1027

99. Laghrissi-Thode F, Wagner WR, Pollock BG, Johnson PC, Finkel MS. Elevated Platelet Factor 4 and β -Thromboglobulin Plasma Levels in Depressed Patients with Ischemic Heart Disease. *Biol Psychiatry*. 1997;42:290-29
100. Schleider SJ, Macari-Hinson MM, Coyle DA. The Nature and course of depression following myocardial infarction. *Arch Intern Med*. 1989;149:1785-1789
101. Serebruany VL, Glassman AH, Malinin AI, Nemeroff CB, Musselman DL, van Zyl LT, Finkel MS, Krishnan RR, Gaffney M, Harrison W, Califf RM, O'Connor CM. Platelet/Endothelial biomarkers in depressed patients treated with selective serotonin reuptake inhibitor sertraline after acute coronary events. The sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART) Platelet Substudy. *Circulation*. 2003;108:939-944
102. McNicol A, Israels SJ. Platelet Dense granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thrombosis Res*. 1999; 95: 1-18
103. Payne C, Iasser L. An Ultrastructural Morphometric Analysis of Platelet Giant and Fusion Granules. *Blood*. 1986 (2) 67;229-309
104. Levine SP, Suarez AJ, Sorenson RR, Knieriem LK, Raymond NM. The importance of blood collection methods for assessment of platelet activation. *Thromb Res*. 1981;24:433-443
105. Brusov Os, Faktor MU, Zlobina GP, Dupin AM, Katasonov AB, Dmitriev AD, Pavlova EV, Beniashvili AB, Morozova MA. Platelet Serotonergic parameter and clinical symptoms of psychosis in patients with episodic progressive schizophrenia. *Zh Nevrol Psikhiatr IM S S Koroskova*. 2007;107(4):17-24
106. Dietrich-Muszalaska A, Olas B. The changes of aggregability of blood platelets in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2007;14:1-6
107. Ertugul A, Ucr G, Basar K, Demir B, Yabanogul S, Ulug B. Influence of clozapine on platelet serotonin, monoamine oxidase and plasma serotonin levels. *Psych Res*. 2007;149 (1-2):49-57.
108. Dietrich-Muszalaska A, Olas B, Rabe-Jablonska J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets* 2005;16(7):386-91
109. Hamilton M. *Handbook of Psychiatric Measures*. Rush JA, First MB, Blacker D. American Psychiatric Publishing, Inc. Second Edition 2008: 508-511
110. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. *Handbook of Psychiatric Measures*. Rush JA, First MB, Blacker D. American Psychiatric Publishing, Inc. Second Edition 2008: 504-506

APÉNDICE 1

Criterios Diagnósticos de DSM-IV

Trastorno Bipolar

Para establecer el diagnóstico de trastorno bipolar, el paciente debe cumplir con los siguientes criterios diagnósticos:

- A. Presencia de único episodio maníaco o hipomaníaco.
- B. El episodio maníaco no se explica mejor por la presencia de un trastorno esquizoafectivo y no está superpuesto a una esquizofrenia, un trastorno esquizofreniforme, un trastorno delirante o un trastorno psicótico no especificado.
- C. Presencia de al menos un episodio depresivo mayor.
- D. Los síntomas afectivos provocan un malestar clínicamente significativo o un deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo.

Episodio Maníaco

- A. Un período diferenciado de un estado de ánimo anormal y persistentemente elevado, expansivo o irritable, que dura al menos una semana (o cualquier duración si es necesaria la hospitalización).
- B. Durante el período de alteración del estado de ánimo han persistido tres (o más) de los siguientes síntomas (cuatro si el estado de ánimo es sólo irritable) y habido en un grado significativo:
 - (1) autoestima exagerada o grandiosidad.

- (2) disminución de la necesidad de dormir.
 - (3) más hablador de lo habitual o verborreico.
 - (4) fuga de ideas o experiencia subjetiva de que el pensamiento está acelerado
 - (5) distractibilidad (atención desviada fácilmente hacia estímulos externos banales o irrelevantes).
 - (6) aumento de la actividad intencionada (ya sea socialmente, en el trabajo o los estudios, o sexualmente) o agitación psicomotora.
 - (7) implicación excesiva en actividades placenteras que tienen un alto potencial para producir consecuencias graves (p. ej., compras irrefrenables, indiscreciones sexuales, o inversiones económicas riesgosas).
- C. Los síntomas no cumplen los criterios para el episodio mixto.
- D. La alteración del estado de ánimo es suficientemente grave como para provocar deterioro laboral, de las actividades sociales habituales, de las relaciones con los demás, para necesitar hospitalización con el fin de prevenir los daños a uno mismo o a los demás, o hay síntomas psicóticos.
- E. Los síntomas no son debidos a los efectos fisiológicos directos de sustancias (drogas o medicamentos u otros tratamientos) ni a una enfermedad médica.

Esquizofrenia

El término psicótico se refiere básicamente a la presencia de ideas delirantes y alucinaciones. La esquizofrenia se caracteriza por un período de síntomas de al menos seis meses de duración y debe incluir por lo menos un

mes de síntomas de fase activa (ideas delirantes, alucinaciones, lenguaje y comportamiento gravemente desorganizado o catatónico) y síntomas negativos (aplanamiento afectivo, alogia, abulia). Estos signos y síntomas están asociados con una marcada disfunción social o laboral. Los siguientes son los criterios diagnósticos de esquizofrenia:

A. Síntomas característicos: Dos (o más) de los siguientes, cada uno de ellos presente durante una parte significativa de un período de un mes (o menos si ha sido tratado con éxito): ideas delirantes, alucinaciones, lenguaje desorganizado, comportamiento catatónico o gravemente desorganizado, síntomas negativos (aplanamiento afectivo, alogia o abulia).

B. Disfunción social/laboral: Durante una parte significativa del tiempo desde el inicio de la alteración, una o más áreas importantes de actividad (trabajo, relaciones interpersonales o el cuidado de uno mismo) están claramente por debajo del nivel previo al inicio del trastorno, existe un claro fracaso en cuanto a alcanzar el nivel esperado de rendimiento interpersonal, académico o laboral.

C. Duración: Persisten los signos continuos de la alteración durante al menos 6 meses. Debe incluir al menos un mes de síntomas que cumplan el Criterio A (o menos si se ha tratado con éxito) y puede incluir los períodos de síntomas prodrómicos y residuales. Durante estos períodos prodrómicos o residuales, los signos de la alteración pueden manifestarse sólo por síntomas negativos o por dos o más síntomas de la lista del Criterio A, presentes de forma atenuada (p. ej., creencias raras, experiencias perceptivas no habituales).

D. Exclusión de los trastornos esquizoafectivo y del estado de ánimo: El trastorno esquizoafectivo y el trastorno del estado de ánimo con síntomas psicóticos se han descartado debido a: 1) no ha habido ningún episodio depresivo mayor, maníaco o mixto concurrente con los síntomas de la fase activa; o 2) si los episodios de alteración anímica han aparecido durante los síntomas de la fase activa y su duración total ha sido breve en relación con la duración de los períodos activo y residual.

E. Exclusión de consumo de sustancias y de enfermedad médica: El trastorno no es debido a los efectos fisiológicos directos de alguna sustancia o de una enfermedad médica.

F. Relación con un trastorno generalizado del desarrollo: Si hay historia de trastorno autista o de otro trastorno generalizado del desarrollo, el diagnóstico adicional de esquizofrenia sólo se realizará si las ideas delirantes o las alucinaciones también se mantienen durante al menos 1 mes (o menos si se han tratado con éxito).

Tipo Paranoide

La esquizofrenia paranoide es un tipo de esquizofrenia que se caracteriza por cumplir los siguientes criterios:

A. Preocupación por una o más ideas delirantes o alucinaciones auditivas frecuentes.

B. No hay lenguaje desorganizado, ni comportamiento catatónico o desorganizado, ni afectividad aplanada o inapropiada.

APÉNDICE 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estamos llevando a cabo un estudio de investigación en colaboración con la Universidad de Harvard en Boston, MA, EUA. Le estamos solicitando que participe Ud. en este estudio de investigación que tiene el objetivo de estudiar a la población mexicana que sufre depresión.

Las células que nos interesa investigar se llaman plaquetas, las cuales se encuentran en la sangre. El objetivo de este estudio es comparar estas células de personas sanas con personas que tienen enfermedades psiquiátricas como depresión, esquizofrenia y trastorno bipolar. Esto nos ayudará a proporcionar un diagnóstico más certero y en un futuro, a identificar a las personas que están en riesgo de depresión e inclusive, de suicidio.

Le pedimos su participación porque usted es una persona que no tiene síntomas psiquiátricos o está sufriendo depresión, esquizofrenia o trastorno bipolar y nos puede brindar información muy valiosa.

Si usted decide tomar parte de este estudio, se le hará una entrevista en este momento, se le harán preguntas para llenar una escala que sirve para medir el grado de depresión y se le tomará una muestra de sangre del brazo, procedimiento similar al que se realiza en cualquier laboratorio de análisis clínicos. Todo este proceso tendrá una duración aproximada de 1 hora en una sola ocasión.

En detalle le comentamos que la entrevista y el cuestionario son de riesgo mínimo. Serán hechas por la Dra. Rosalinda Sepúlveda Sepúlveda u otro psiquiatra entrenado y con experiencia para realizar entrevistas clínicas y cuestionarios psiquiátricos. Anticipamos que no sufrirá riesgo o malestar durante la entrevista o el cuestionario. Este es el procedimiento que se lleva a cabo en cualquier consulta psiquiátrica.

Por otro lado le describiremos sobre la muestra de sangre requerida. La toma de sangre será del brazo, aproximadamente 8 cc (cuatro tubitos). Es un procedimiento estandarizado que no implica riesgos a su salud. La complicación más grave es la de un moretón en el sitio de la punción que si se llegara a presentar, se resolvería en el transcurso de una semana sin necesidad de atención médica. Este procedimiento se llevará a cabo por personal de enfermería altamente calificado.

Los resultados obtenidos en este estudio serán confidenciales. La información de la entrevista, los cuestionarios y este formato de consentimiento informado, serán almacenados en un archivo exclusivo al que solamente tendrán

acceso los investigadores. Las muestras de sangre estarán identificadas con un número, no será posible identificarlas con su nombre. Las muestras serán destruidas tan pronto como se terminen de analizar. Al terminar el estudio, si publicamos los datos en una revista científica o en un libro, no se le identificará a Ud. de manera alguna.

No existe costo o compensación por participar en este estudio. Si decide participar, usted no obtendrá ningún beneficio en particular, pero su participación nos servirá para entender más esta enfermedad, hacer un mejor diagnóstico y ofrecer un mejor tratamiento a todas las personas que sufren depresión, esquizofrenia o trastorno bipolar.

La decisión de formar parte en este estudio es voluntaria. Usted es libre de elegir participar o no participar. Si decide hacerlo, puede detener la entrevista en cualquier momento si se siente incómodo(a). Si decide no participar o suspender la entrevista o la toma de la muestra de sangre, no afectará el diagnóstico o el tratamiento que requiere por parte de esta institución.

La Dra. Rosalinda Sepúlveda Sepúlveda, es psiquiatra certificada por el Consejo Mexicano de Psiquiatría. Es uno de los investigadores en este estudio. Si usted tiene alguna pregunta ahora, por favor, siéntase libre de hacerla en cualquier momento. Si usted tiene alguna pregunta adicional relacionada con este estudio puede comunicarse con la Dra. Sepúlveda a su celular 04481-1230-1060.

Su firma indica que se le ha explicado su participación en este estudio, ha leído y entendido este formato, no le quedan dudas y ha decidido formar parte del estudio.

Nombre del Participante

Firma del Testigo

Firma del Participante

Firma del Testigo

Lugar, fecha y hora

Nombre y Firma del Investigador

APÉNDICE 3

ESCALA DE DEPRESIÓN DE HAMILTON

Es el instrumento más utilizado en la investigación de los trastornos depresivos. La Escala de Depresión de Hamilton (91) está diseñada para describir la enfermedad y medir la severidad de los síntomas depresivos en la población psiquiátrica. Se encuentran disponibles varias versiones de 17 y 21 preguntas. Se administra por un clínico y toma de 15-20 minutos completarla. Tiene una consistencia interna relativamente baja (Cronbach α de 0.48 antes del tratamiento y de 0.85 después del tratamiento) sin embargo tiende a aumentar al aplicarse con una entrevista estructurada (109).

1. Humor depresivo:

- 0: Ausente
- 1: Lo indica solo si se le pregunta
- 2: Lo indica de manera espontánea
- 3: Lo comunica por expresión facial, postura, voz, tendencia al llanto
- 4: Expresión verbal y no verbal

2. Sentimientos de culpa

- 0: Ausente
- 1: Autoreproches, ha defraudado a la gente
- 2: Ideas de culpa por errores pasados o pecados
- 3: Considera que la enfermedad actual es un castigo, ideas delirantes de culpa.
- 4: Voces que lo acusan o denuncian, alucinaciones amenazantes

3. Suicidio

- 0: Ausente.
- 1: Siente que no vale la pena vivir
- 2: Desea estar muerto o piensa en una posible muerte
- 3: Ideas o gestos de suicidio
- 4: Intentos de suicidio

4. Insomnio inicial

- 0: Sin dificultad para dormir
- 1: Dificultad ocasional a dormirse (p. ej. más de media hora a dormirse)
- 2: Dificultades para dormirse cada noche

5. Insomnio intermedio

- 0: Sin dificultad.
- 1: Inquieto y alterado por la noche.
- 2: Se despierta durante la noche (poner una calificación de 2 si deja la cama, salvo para ir al baño).

6. Insomnio terminal

- 0: Sin dificultad.
- 1: Se despierta en la madrugada pero regresa a dormir
- 2: Incapaz de volverse a dormir si se despierta.

7. Trabajo y actividades

- 0: Sin dificultad

- 1: Pensamientos y sentimientos de incapacidad, cansancio o debilidad relacionadas con las actividades, trabajo o diversiones
- 2: Pérdida de interés en la actividad, pasatiempo o trabajo, ya sea que ésta sea reportada por el paciente o manifestada por indiferencia, indecisión o vacilación (siente que tiene que esforzarse por llevar a cabo las actividades)
- 3: Reducción del tiempo dedicado a las actividades o menor productividad
- 4: Dejó de trabajar debido a la enfermedad actual (poner una calificación de 4 si la persona, cuando este hospitalizada, no ejerce más que sus actividades rutinarias).

8. Retardo (lentitud del pensamiento y palabra, alteración en la concentración, reducción en la actividad motora)

- 0: Habla y pensamiento normales
- 1: Ligera retraso
- 2: Retraso obvio en la entrevista
- 3: Entrevista difícil.
- 4: Entrevista imposible (estupor)

9. Agitación

- 0: Ninguna
- 1: Intranquilidad
- 2: “Juega” con sus manos, sus cabellos, etc.
- 3: Continuo movimiento, no puede quedarse tranquilo.
- 4: Se aprieta las manos, se muerde las uñas, se jala el cabello, se muerde los labios.

10. Ansiedad psíquica

- 0: Ninguna
- 1: Tensión e irritabilidad subjetiva
- 2: Se preocupa por detalles
- 3: Actitud aprehensiva aparente en el rostro o en el habla
- 4: Expresa sus temores sin que se le pregunte

11. Ansiedad somática. Manifestaciones fisiológicas que acompañan a la ansiedad. Gastrointestinales: boca seca, estreñimiento, indigestión, diarrea, cólicos. Cardiovasculares: palpitaciones, dolor de cabeza. Respiratorios: hiperventilación, suspiros. Otros: micción frecuente, sudoración.

- 0: Ausente
- 1: Leve
- 2: Moderado
- 3: Severo
- 4: Incapacitante

12. Somático gastrointestinal

- 0: Ninguno
- 1: Pérdida del apetito pero come sin estímulo por parte del personal, sensación de pesadez abdominal
- 2: Dificultad para comer sin exhortación, pide o requiere laxantes o medicación intestinal para síntomas gastrointestinales

13. Somáticos generales

- 0: Ninguno
- 1: Pesadez en las extremidades o en parte posterior de la cabeza. Dolor de espalda, cabeza, y musculares. Pérdida de energía y cansancio fácil.

14. Genital. Disminución de la libido y alteraciones menstruales

- 0: Ninguno
- 1: Leves
- 2: Severos

15. Hipocondría

- 0: Ausencia
- 1: Autoabsorción corporal
- 2: Preocupaciones sobre su salud
- 3: Se queja frecuentemente, solicita ayuda
- 4: Ideas delirantes hipocondríacas

16. Insight

- 0: Reconoce estar deprimido y enfermo.
- 1: Reconoce estar enfermo pero lo atribuye a una mala alimentación, al clima, exceso de trabajo, un virus, etc.
- 2: Niega por completo estar enfermo

17. Pérdida de peso

- 0: Sin pérdida de peso
- 1: Pérdida de peso ligera o dudosa
- 2: Pérdida de peso obvia o severa

18. Variación diurna

- 0: ninguna variación diurna.
- 1: Presencia dudosa de variación diurna.
- 2: Presencia clara de variación diurna, anotar si los síntomas son mas intensos en la mañana o en la tarde

19. Despersonalización y desrealización (sentimiento de irrealidad o ideas nihilistas)

- 0: Ausentes.
- 1: Ligeros.
- 2: Moderados.
- 3: Severos
- 4: Incapacitante

20. Síntomas delirantes

- 0: Ninguno
- 1: Sospechoso
- 2: Ideas de referencia
- 3: Ideas delirantes de referencia
- 4: Delirios de persecución.

21. Síntomas de obsesión compulsivos:

- 0: Ausencia
- 1: Ligeros
- 2: Severos

Calificación Total: -----

APÉNDICE 4

EVALUACIÓN MULTIAxIAL DEL DSM-IV

Un sistema multiaxial implica una evaluación en varios ejes, cada uno de los cuales concierne a un área distinta de información que puede ayudar al clínico en el planeamiento del tratamiento y en la predicción de resultados. En la clasificación multiaxial DSM-IV se incluyen cinco ejes:

Eje I Trastornos clínicos/Otros problemas que pueden ser objeto de atención clínica

Eje II Trastornos de la personalidad/Retraso mental

Eje III Enfermedades médicas

Eje IV Problemas psicosociales y ambientales

Eje V Evaluación de la actividad global

El uso del sistema multiaxial facilita una evaluación completa y sistemática de los distintos trastornos mentales y enfermedades médicas, de los problemas psicosociales y ambientales, y del nivel de actividad, que podrían pasar desapercibidos si el objetivo de la evaluación se centrara en el simple problema objeto de la consulta. Un sistema multiaxial proporciona un formato adecuado para organizar y comunicar información clínica, para captar la complejidad de las situaciones clínicas y para describir la heterogeneidad de los individuos que presentan el mismo diagnóstico. Además, el sistema multiaxial promueve la aplicación del modelo biopsicosocial en clínica, enseñanza e investigación.

El resto de este apartado describe cada uno de los ejes DSM-IV. En algunos centros o situaciones los clínicos pueden preferir no utilizar el sistema multiaxial. Por esta razón, al final del apartado se dan ciertas directrices para informar sobre los resultados de una evaluación DSM-IV sin aplicar el sistema multiaxial formal.

Eje I: Trastornos clínicos/ Otros problemas que pueden ser objeto de atención clínica

El Eje I describe todos los trastornos incluidos en la clasificación excepto los trastornos de la personalidad y el retraso mental (que se han incluido en el Eje II). Los principales grupos de trastornos incluidos en el Eje I constan en el cuadro que aparece más adelante. También se anotan en el Eje I otros trastornos que pueden ser objeto de atención clínica. Cuando un individuo sufre más de un trastorno del Eje I, deben registrarse todos ellos. Cuando se presenta más de un trastorno del Eje I, debe indicarse en primer lugar el diagnóstico principal o el motivo de consulta. Cuando una persona presente un trastorno del Eje I y otro del Eje II, se supondrá que el diagnóstico principal o el motivo de consulta corresponde al Eje I, a menos que el diagnóstico del Eje II vaya seguido

de la frase «(diagnóstico principal)» o «(motivo de consulta)». En el caso de no presentarse ningún trastorno del Eje I, este hecho debe codificarse como Z03.2 [V71.09]. Si hay que aplazar un diagnóstico del Eje I hasta recoger alguna información adicional, este hecho se codificará como R69 [799.9].

Eje II: Trastornos de la personalidad/ Retraso mental

El Eje II incluye los trastornos de la personalidad y el retraso mental. También puede utilizarse para hacer constar mecanismos de defensa y características desadaptativas de la personalidad. Enumerar los trastornos de la personalidad y el retraso mental en un eje separado asegura que se tomará en consideración la posible presencia de trastornos de la personalidad y retraso mental, anomalías éstas que pudieran pasar desapercibidas cuando se presta atención directa a trastornos del Eje I, habitualmente más floridos. La codificación de los trastornos de la personalidad en el Eje II no implica que su patogenia o la índole de la terapéutica apropiada sean fundamentalmente diferentes de las implicadas en los trastornos codificados en el Eje I. Cuando una persona tiene más de un trastorno del Eje II, situación relativamente frecuente, deben hacerse constar todos los diagnósticos. Cuando un individuo presenta simultáneamente un trastorno del Eje I y otro del Eje II, y el diagnóstico del Eje II es el principal o el motivo de consulta, este hecho debe indicarse añadiendo la frase «(diagnóstico principal)» o «(motivo de consulta)» tras el diagnóstico del Eje II. Cuando no se presenta ningún trastorno del Eje II, este hecho debe codificarse como Z03.2 [V71.09]. Si hay que aplazar un diagnóstico del Eje II, pendientes de recoger alguna información adicional, debe codificarse como R46.8 [799.9].

El Eje II también puede utilizarse para indicar ciertas características desadaptativas de personalidad que no cumplen los mínimos necesarios para constituir un trastorno de la personalidad (en estos casos no debe utilizarse ningún número de código). También puede indicarse en el Eje II el uso habitual de mecanismos de defensa desadaptativos.

Eje III: Enfermedades médicas

El Eje III incluye las enfermedades médicas actuales que son potencialmente relevantes para la comprensión o abordaje del trastorno mental del sujeto. Estos estados están clasificados fuera del capítulo «Trastornos mentales» de la CIE-10. La distinción multiaxial entre trastornos de los Ejes I, II y III no implica que existan diferencias fundamentales en su conceptualización, ni que los trastornos mentales dejen de tener relación con factores o procesos físicos o biológicos, ni que las enfermedades médicas no estén relacionadas con factores o procesos comportamentales o psicológicos.

La razón para distinguir enfermedades médicas es la de alentar la minuciosidad de la evaluación y mejorar la comunicación entre los profesionales

de la salud mental. Las enfermedades médicas pueden relacionarse con los trastornos mentales de diferentes modos. En algunos casos es evidente que la enfermedad médica constituye un factor causal directo para el desarrollo o empeoramiento de síntomas mentales, y que los mecanismos implicados en este efecto son fisiológicos. Cuando se supone que un trastorno mental es consecuencia fisiológica directa de la enfermedad médica, en el Eje I debe diagnosticarse un trastorno mental debido a enfermedad médica, y esa enfermedad debe registrarse tanto en el Eje I como en el Eje III. Por ejemplo, cuando un hipotiroidismo es causa directa de síntomas depresivos, su designación en el Eje I es F06.32 Trastorno del estado de ánimo debido a hipotiroidismo, con síntomas depresivos [293.83], y se hace constar de nuevo el hipotiroidismo en el Eje III como E03.9 [244.9].

Cuando la relación etiológica entre la enfermedad médica y los síntomas mentales esté insuficientemente probada para garantizar un diagnóstico en el Eje I de trastorno mental debido a enfermedad médica, debe codificarse en el Eje I el trastorno mental apropiado (p. ej., trastorno depresivo mayor), y la enfermedad médica sólo se codificará en el Eje III. Hay otros casos en los que deben registrarse las enfermedades médicas en el Eje III a causa de su importancia para la comprensión general o el tratamiento del sujeto afecto del trastorno mental. Un trastorno del Eje I puede ser una reacción psicológica a una enfermedad médica del Eje III (p. ej., la presencia de un F43.20 Trastorno adaptativo con estado de ánimo depresivo [309.0] (como reacción al diagnóstico de carcinoma de mama). Algunas enfermedades médicas pueden no estar relacionadas directamente con el trastorno mental, pero pueden tener implicaciones importantes para su pronóstico o tratamiento (p. ej., cuando el diagnóstico en el Eje I es F32.9 Trastorno depresivo mayor [296.2] y en el Eje III es I49.9 Arritmia [427.9], la elección de farmacoterapia está influida por la enfermedad médica; o cuando una persona con diabetes mellitus ingresa en un hospital por una exacerbación de una esquizofrenia y debe ser controlada la administración de insulina).

Cuando una persona tiene más de un diagnóstico clínicamente relevante en el Eje III, deben hacerse constar todos ellos. Para ejemplo, véase la página 35. Si no hay ningún trastorno del Eje III, este hecho debe indicarse anotando «Eje III: ninguno». Si hay que aplazar un diagnóstico del Eje III, a la espera de recoger alguna información adicional, este hecho se indicará anotando «Eje III: aplazado».

Eje IV: Problemas psicosociales y ambientales

En el Eje IV se registran los problemas psicosociales y ambientales que pueden afectar el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico de los trastornos mentales (Ejes I y II). Un problema psicosocial o ambiental puede ser un acontecimiento vital negativo, una dificultad o deficiencia ambiental, un estrés familiar o interpersonal, una insuficiencia en el apoyo social o los recursos

personales, u otro problema relacionado con el contexto en que se han desarrollado alteraciones experimentadas por una persona. Los denominados estresantes positivos, como una promoción laboral, sólo deben hacerse constar si constituyen un problema o conducen a él, como cuando una persona tiene dificultades para adaptarse a una situación nueva. Además de desempeñar un papel en el inicio o exacerbación de un trastorno mental, los problemas psicosociales también pueden aparecer como consecuencia de la psicopatología, o pueden constituir problemas que deben tomarse en consideración en el planeamiento de la intervención terapéutica general.

Cuando una persona tiene problemas psicosociales o ambientales múltiples, el clínico debe tomar nota de todos aquellos que juzgue relevantes. En general, el clínico sólo debe hacer constar aquellos problemas psicosociales y ambientales que hayan estado presentes durante el año anterior a la evaluación actual. Sin embargo, el clínico puede decidir el registro de problemas psicosociales y ambientales acaecidos antes del año anterior si han contribuido claramente al trastorno mental o se han constituido en un objetivo terapéutico (p. ej., experiencias previas de combate conducentes a un trastorno por estrés postraumático). En la práctica, la mayor parte de los problemas psicosociales y ambientales se indicarán en el Eje IV. No obstante, cuando un problema psicosocial o ambiental constituya el centro de la atención clínica, se hará constar también en el Eje I, con un código derivado del apartado «Otros problemas que pueden ser objeto de atención clínica». Por razones de conveniencia los problemas se han agrupado en las siguientes categorías:

Problemas relativos al grupo primario de apoyo: por ejemplo, fallecimiento de un miembro de la familia, problemas de salud en la familia, perturbación familiar por separación, divorcio o abandono, cambio de hogar, nuevo matrimonio de uno de los padres, abuso sexual o físico, sobreprotección de los padres, abandono del niño, disciplina inadecuada, conflictos con los hermanos; nacimiento de un hermano.

• **Problemas relativos al ambiente social:** por ejemplo, fallecimiento o pérdida de un amigo, apoyo social inadecuado, vivir solo, dificultades para adaptarse a otra cultura, discriminación, adaptación a las transiciones propias de los ciclos vitales (tal como la jubilación).

• **Problemas relativos a la enseñanza:** por ejemplo, analfabetismo, problemas académicos, conflictos con el profesor o los compañeros de clase, ambiente escolar inadecuado.

• **Problemas laborales:** por ejemplo, desempleo, amenaza de pérdida de empleo, trabajo estresante, condiciones laborales difíciles, insatisfacción laboral, cambio de trabajo, conflictos con el jefe o los compañeros de trabajo.

- **Problemas de vivienda:** por ejemplo, falta de hogar, vivienda inadecuada, vecindad insaludable, conflictos con vecinos o propietarios.
- **Problemas económicos:** por ejemplo, pobreza extrema, economía insuficiente, ayudas socioeconómicas insuficientes.
- **Problemas de acceso a los servicios de asistencia sanitaria:** por ejemplo, servicios médicos inadecuados, falta de transportes hasta los servicios asistenciales, seguro médico inadecuado.
- **Problemas relativos a la interacción con el sistema legal o el crimen:** por ejemplo, arrestos, encarcelamiento, juicios, víctima de acto criminal.
- **Otros problemas psicosociales y ambientales:** por ejemplo, exposición a desastres, guerra u otras hostilidades, conflictos con cuidadores no familiares como consejeros, asistentes sociales, o médicos, ausencia de centros de servicios sociales.

Al utilizar el registro de evaluación multiaxial, el clínico debe identificar las categorías relevantes de problemas psicosociales y ambientales e indicar los factores específicos implicados en ellos. Si no se utiliza un formulario de registro con un listado de categorías de problemas, el clínico simplemente puede enumerar los problemas específicos del Eje IV.

Eje V: Evaluación de la actividad global

El Eje V incluye la opinión del clínico acerca del nivel general de actividad del sujeto. Esta información es útil para planear el tratamiento y medir su impacto, así como para predecir la evolución. El registro de la actividad general en el Eje V puede hacerse utilizando la escala de evaluación de la actividad global (EEAG). La EEAG puede ser particularmente útil al seguir la evolución del progreso clínico de los sujetos en términos globales, utilizando una medida simple. La EEAG sólo debe ser cumplimentada en relación a la actividad psicosocial, social y laboral. Las instrucciones especifican: «no incluir alteraciones de la actividad debidas a limitaciones físicas (o ambientales)». En la mayoría de los casos las evaluaciones de la EEAG deben referirse al período actual (es decir, el nivel de actividad en el momento de la evaluación) puesto que las evaluaciones de la actividad actual reflejarán generalmente la necesidad de tratamiento o intervención.

En algunos centros clínicos puede ser útil cumplimentar la EEAG tanto en el momento de la admisión como en el del alta. La EEAG también puede cumplimentarse en otros períodos de tiempo (p. ej., mejor nivel de actividad alcanzado por lo menos en algunos meses durante el último año). La EEAG se hace constar en el Eje V del modo siguiente: «EEAG =», seguido por la puntuación de la EEAG de 1 a 100, anotando a continuación entre paréntesis el

período de tiempo reflejado en la evaluación, por ejemplo, «(actual)», «(mayor nivel en el último año)», «(en el alta)».

En algunos centros clínicos puede ser útil evaluar la incapacidad social y laboral y verificar los progresos en la rehabilitación, independientemente de la gravedad de los síntomas psicosociales.

APÉNDICE 5

INVENTARIO DE DEPRESIÓN DE BECK

El Inventario de Depresión de Beck (92) está diseñado para medir síntomas de comportamiento depresivo en adolescentes y adultos. Este instrumento mide la severidad de los síntomas depresivos permitiendo la descripción de los síntomas o el monitoreo del cambio en la severidad. La última versión, es muy utilizada toma de 5-10 minutos aplicarla. Tiene una consistencia interna muy alta (Cronbach α de 0.94). Sin embargo, es que puede estar sesgada con enfermedades médicas (110).

- | | | |
|--|--|---|
| 1. | | 11. |
| 1. No me siento triste. | | 1. Las cosas no me irritan más que de costumbre. |
| 2. Me siento triste. | | 2. Las cosas me irritan más que de costumbre |
| 3. Me siento siempre triste y no puedo salir de mi tristeza. | | 3. Estoy bastante irritado o enfadado una buena parte del tiempo. |
| 4. Estoy tan triste e infeliz que no puedo soportarlo. | | 4. Ahora me siento irritado todo el tiempo. |
| 2. | | 12. |
| 1. No me siento especialmente desanimado ante el futuro. | | 1. No he perdido el interés por otras cosas. |
| 2. Me siento desanimado con respecto al futuro. | | 2. Estoy menos interesado en otras personas que de costumbre. |
| 3. Siento que no tengo nada que esperar. | | 3. He perdido casi todo el interés por otras personas. |
| 4. Siento que en el futuro no hay esperanza y que las cosas no pueden mejorar. | | 4. He perdido todo mi interés por otras personas. |
| 3. | | 13. |
| 1. No creo que sea un fracaso. | | 1. Tomo decisiones casi siempre. |
| 2. Creo que he fracasado mas que cualquier persona normal. | | 2. Postergo la adopción de decisiones más que de costumbre. |
| 3. Al recordar mi vida pasada, todo lo que puedo ver es un montón de fracasos. | | 3. Tengo mas dificultad para tomar decisiones que antes. |
| 4. Creo que soy un fracaso absoluto como persona. | | 4. Ya no puedo tomar decisiones. |
| 4. | | 14. |
| 1. Obtengo tanta satisfacción de las cosas como la que solía obtener antes. | | 1. No creo que mi aspecto sea peor que de costumbre. |
| 2. No disfruto de las cosas de la manera en que solía hacerlo. | | 2. Me preocupa el hecho de parecer viejo sin atractivos. |
| 3. Ya no tengo verdadero satisfacción de nada. | | 3. Tengo que obligarme seriamente con mi aspecto, y parezco poco atractivo. |
| 4. Estoy insatisfecho o aburrido de todo. | | 4. Creo que me veo feo. |
| 5. | | |
| 1. No me siento especialmente culpable. | | ir tan bien como antes. |
| 2. No me siento culpable una buena parte del tiempo. | | is esfuerzo empezar a hacer algo. |
| 3. Me siento culpable casi siempre. | | bligarme seriamente para hacer cualquier cosa. |
| 4. Me siento culpable siempre. | | bajar en absoluto. |

6.

1. No creo que este siendo castigado.
2. Creo que puedo ser castigado.
3. Espero ser castigado.
4. Creo que estoy siendo castigado.

7.

1. No me siento decepcionado de mí mismo.
2. Me he decepcionado a mí mismo.
3. Estoy disgustado conmigo mismo.
4. Me odio.

8.

1. No creo ser peor que los demás.
2. Me critico por mis debilidades o errores.
3. Me culpo siempre por mis errores.
4. Me culpo de todo lo malo que sucede.

9.

1. No pienso en matarme.
2. Pienso en matarme, pero no lo haría.
3. Me gustaría matarme.
4. Me mataría si tuviera la oportunidad..

10.

1. No lloro mas de lo de costumbre.
2. Ahora lloro mas de lo que lo solía hacer.
3. Ahora lloro todo el tiempo.
4. Solía poder llorar, pero ahora no puedo llorar aunque quiera.

16.

1. Puedo dormir tan bien como antes.
2. No puedo dormir tan bien como solía.
3. Me despierto una o dos horas mas temprano que de costumbre y me cuesta mucho volver a dormir.
4. Me despierto varias horas antes de lo que solía y no puedo volver a dormir.

17.

1. No me canso mas que de costumbre.
2. Me canso mas fácilmente que de costumbre.
3. Me canso sin hacer nada.
4. Estoy demasiado cansado como para hacer algo.

18.

1. Mi apetito no es peor que de costumbre.
2. Mi apetito no es tan bueno como solía ser.
3. Mi apetito esta mucho peor ahora.
4. Ya no tengo apetito.

19.

1. No he perdido mucho peso, si es que he perdido algo, últimamente.
2. He rebajado mas de dos kilos y medio.
3. He rebajado mas de cinco kilos.
4. He rebajado mas de siete kilos y medio.

20.

1. No me preocupo por mi salud mas que de costumbre.
2. Estoy preocupado por problemas físicos como, por ejemplo, dolores, molestias estomacales o estreñimiento.
3. Estoy preocupado por mis problemas físicos y me resulta difícil pensar en otra cosa.
4. Estoy tan preocupado por mis problemas físicos que no puedo pensar en ninguna otra cosa.

21.

1. No he notado cambio alguno reciente en mi interés por el sexo.
2. Estoy menos interesado en el sexo de lo que solía estar.
3. Ahora estoy mucho menos interesado en el sexo.
4. He perdido por completo el interés en el sexo.

Total:_____

APÉNDICE 6

EJEMPLO DE BASE DE DATOS

Se presentan los datos obtenidos para el análisis cuantitativo a partir la de las micrografías (análisis espacial). En la primera parte se presenta el análisis de serotonina y en la segunda parte el análisis del PF-4. Se identifica el número de muestra, el número de plaquetas, número de observaciones, tamaño de los gránulos que se incluyen en el análisis y la cuenta total. Se incluye en este apéndice hasta la observación 20.

Serotonina 0.030-0.599um									Factor Palquetario-4 0.050-0.599um								
Muestra #33									Muestra #33								
Micro grafia	No. Plaq	Obs.	Area	Promedi o	Min	Max	> 0.30	Tota l	Micro grafia	No. Plaq	Obs.	Area	Promedi o	Min	Max	> 0.50	Tota l
4	21	1	0.858	144.644	111	201	0.032	1	4	21	1	2.859	186.735	134	248	0.054	1
		2	6.394	164.25	111	255	0.032	1			2	0.016	134.667	134	135	0.059	1
		3	3.106	143.48	111	213	0.032	1			3	0.123	158.217	134	177	0.059	1
		4	0.048	121.778	112	126	0.032	1			4	0.37	178.42	134	226	0.059	1
		5	0.005	127	127	127	0.032	1			5	0.043	140.5	134	147	0.059	1
		6	0.032	123.167	119	128	0.032	1			6	0.027	136.6	135	141	0.064	1
		7	0.021	123.5	115	135	0.032	1			7	0.075	143.429	136	148	0.064	1
		8	0.011	122	122	122	0.032	1			8	0.172	149.312	136	166	0.064	1
		9	0.005	111	111	111	0.032	1			9	0.011	138	138	138	0.07	1
		10	0.011	128	128	128	0.032	1			10	0.021	140.75	140	143	0.07	1
		11	0.021	127.75	127	128	0.032	1			11	8.46	217.471	134	255	0.07	1
		12	0.054	126.3	113	134	0.032	1			12	4.136	202.649	134	255	0.075	1
		13	0.005	117	117	117	0.032	1			13	3.685	212.13	134	255	0.08	1
		14	0.005	116	116	116	0.032	1			14	0.198	157.459	135	205	0.08	1
		15	0.016	127	122	134	0.032	1			15	0.005	142	142	142	0.086	1
		16	0.424	151.228	112	223	0.032	1			16	1.373	177.656	134	244	0.086	1
		17	0.198	150.703	111	188	0.032	1			17	3.954	185.178	134	234	0.086	1
		18	0.043	130.125	119	154	0.032	1			18	0.016	144	138	147	0.091	1
		19	0.021	117.25	115	120	0.032	1			19	0.005	154	154	154	0.102	1
		20	0.011	111	111	111	0.032	1			20	0.005	135	135	135	0.107	1

APÉNDICE 7

NOMBRE Y DESCRIPCIÓN DE MICROGRAFÍAS

1. Fig 2: platelets081105.015-25000x 100kv
2. Fig 4 A. 2008-04-24/10c-spin/image005_ch00processbar
3. Fig 4 B. 2008-04-24/10c-spin/image005_ch00treshold
4. Fig 4 C. 2008-04-24/10c-spin/drawing 10-spin_image005_ch00
5. Fig 5 A. EM/MDD30/08-07-07/Flavia3_153 -3000x 200kv
6. Fig 5 B. EM/BIP17/Flavia3_559- 2900x
7. Fig 5 C. EM/CTL29/Flavia3_153- 4800x 80kv
8. Fig 5 D. EM/SCZ10/july08/SQZ-120000.ov-1400x-Flavia0345
9. Fig 6 A. EM-MDD30/08-21-07/Flavia3_379- 8000x 200kv
10. Fig 6 B. EM/BIP19/Flavia3_408- 8000x 200Kv
11. Fig 6 A. EM/CT29/Flavia_144 13000x 80kv
12. Fig 6 A. EM/SCZ10/Flavia3_395- 8000x 200kv
13. Fig 7 A. IHC/2008-12-13\33\1_Image031_ch00scalebar
14. Fig 7 B. IHC/2008-12-13\33\1_Image031_ch01scalebar
15. Fig 7 C. IHC/2008-12-18\20M\1_Image010_ch00scalebar
16. Fig 7 D. IHC/2008-12-18\20M\1_Image010_ch01scalebar
17. Fig 8 A. IHC/2008-12-18\13B\1_Image005_ch00scalebar
18. Fig 8 A. IHC/2008-12-18\13B\1_Image005_ch01scalebar
19. Fig 8 C. IHC/2008-12-18\10S\1_Image031_ch00scalebar
20. Fig 8 D. IHC/2008-12-18\10S\1_Image031_ch01scalebar
21. Fig 9 A. IHC/2008-12-13\33\1_Image031_ch00scalebar
22. Fig 9 B. IHC/2008-12-18\20M\1_Image010_ch00scalebar
23. Fig 9 C. IHC/2008-12-18\13B\1_Image005_ch00scalebar
24. Fig 9 D. IHC/2008-12-18\10S\1_Image031_ch00scalebar
25. Fig 10 A. IHC/2008-12-13\33\1_Image031_ch01scalebar
22. Fig 10 B. IHC/2008-12-18\20M\1_Image010_ch01scalebar
23. Fig 10 C. IHC/2008-12-18\13B\1_Image005_ch01scalebar
24. Fig 10 D. IHC/2008-12-18\10S\1_Image031_ch01scalebar

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Rosalinda Sepúlveda Sepúlveda

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina

Tesis: DETERMINACIÓN DE LA SEROTONINA Y EL FACTOR
PLAQUETARIO-4 EN PLAQUETAS DE PACIENTES
CON TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR

Campo de estudio: ciencias de la salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en la ciudad de Monterrey, N.L. México el 6 de Agosto de 1976, hija del Dr. José Rafael Sepúlveda Garza y la Dra. Rosalinda Sepúlveda García.

Educación: Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Médico, Cirujano y Partero en el 2001. Egresada del Departamento de Psiquiatría del Hospital Universitario "Dr. José E. González" con el grado de Psiquiatra General en el 2006.

Experiencia Profesional: Certificada por el Consejo Mexicano de Psiquiatría en el 2006. Fellow de investigación en la Universidad de Harvard de 2006 a 2009. Actualmete asociada de investigación en la Escuela de Salud Pública de Harvard.