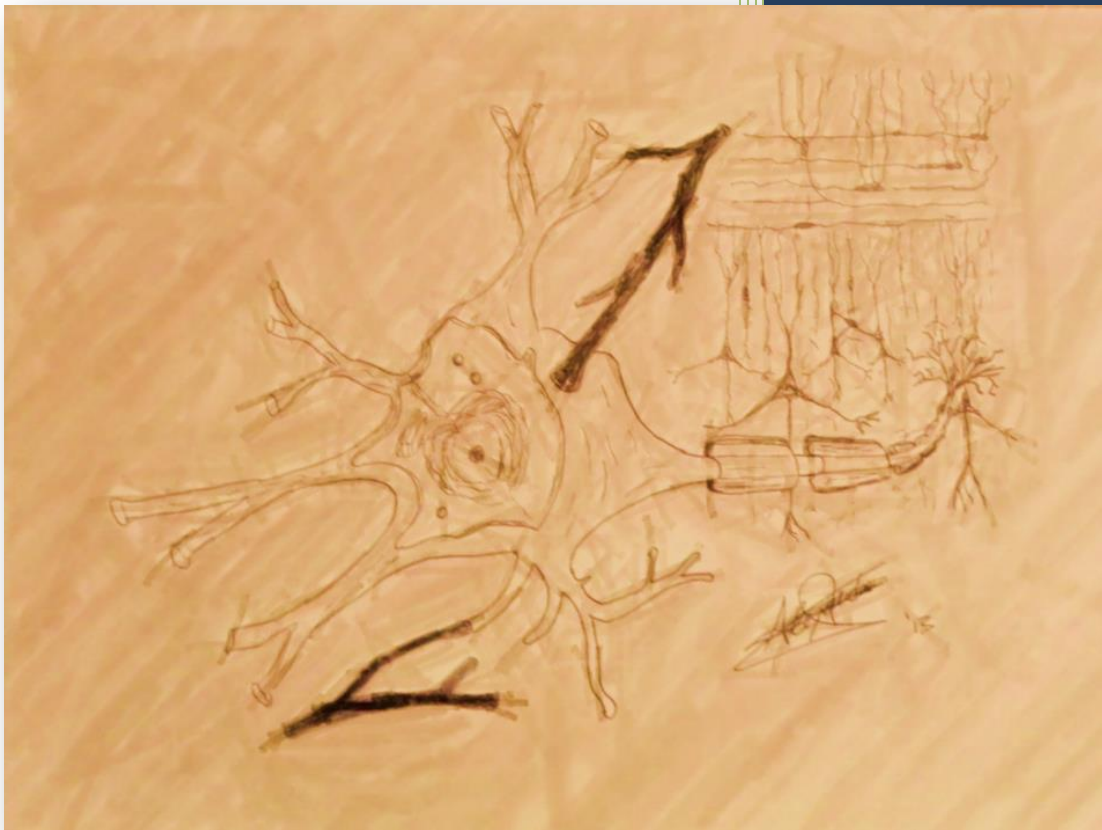


**Tesis
Doctoral**

**Estrés Oxidativo y
Esquizofrenia**



Alejandro Ballesteros Prados
Facultad de Medicina Salamanca,
2014



ESTRÉS OXIDATIVO

Y

ESQUIZOFRENIA



FACULTAD DE MEDICINA

Salamanca, 2014





AUTORES:

Director de tesis: Profesor Juan Luis Blázquez Arroyo. Universidad de Salamanca, Salamanca (España).

Tutor: Doctor Elliot Hong. Maryland Psychiatric Research Center, Baltimore (Estados Unidos).

Doctorando: Alejandro Ballesteros Prados. Universidad de Salamanca, Salamanca (España).

Correo electrónico: lballesteros@yahoo.com

Calle Játiva 5 3ª 28007 Madrid (España).

Área de conocimiento: Medicina.

Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Departamento de Anatomía e Histología Humanas.



El **Prof. Dr. D. Juan Luis Blázquez Arroyo**, Profesor Titular del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Salamanca (España)

CERTIFICA:

Que la memoria de tesis que lleva por título **“Estrés oxidativo y Esquizofrenia”** ha sido realizada bajo mi dirección por el licenciado **Don Alejandro Ballesteros Prados**, que a mi juicio reúne los requisitos de originalidad y rigor científico exigibles para optar al grado de **DOCTOR**.

Para que conste, se expide esta certificación en Salamanca a 17 de Marzo de 2014.

DIRECTOR:

Edo.

Prof. Dr. D. Juan Luis Blázquez Arroyo.

Universidad de Salamanca (USAL).



Para Sofía, mis padres y Alicia,



AGRADECIMIENTOS:

A Sofía, que ha estado en los momentos difíciles y en los alegres durante los años de esfuerzo que han hecho posible este proyecto. A a mi familia: mis padres, mi hermana Alicia y amigos más cercanos por haberme dado sabio consejo y motivación en los momentos de dificultad.

Especial agradecimiento a Ann Summerfelt y Elliot Hong que me han brindado la oportunidad de hacer un proyecto tan apasionante en pacientes con esquizofrenia así como al Dr. Blázquez Arroyo por abrirme nuevas perspectivas como un cercano maestro en esta tesis doctoral. También es especialmente importante mencionar la ayuda brindada por Pan Jiang para la recolección de datos y contribución intelectual a la obra.

A mis compañeros de profesión con los que tuve tantas charlas académicas de las que se ha inspirado la tesis. Especial mención a Benjamín Cortés, Joemir Becker, Javier Fernández, Carmen Martín y Antonio Zambrana. Profesionales que tratan cada paciente con sumo cariño y dedicación.

Por último, y sobre todo, añadir que este trabajo está realizado para y por mis pacientes. Espero devolver así una mínima parte de la riqueza humana que me aportan las personas que acuden a mi consulta. Espero que este trabajo sea un grano de arena más para reducir el gran sufrimiento de las personas con enfermedad mental.

Alejandro.



INDICE

ABSTRACT	11
RESUMEN	15
PALABRAS CLAVE	19
1.- INTRODUCCIÓN.....	21
2.- ESQUIZOFRENIA	27
2.1.- CONCEPTO.....	29
2.2.- MODELOS ETIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD	30
2.2.1.- <i>Genética</i>	31
2.2.2.- <i>Oxidación y neurodesarrollo</i>	34
2.3.- FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	43
2.3.1.- <i>Hipótesis dopaminérgica</i>	44
2.3.2.- <i>Hipótesis de la Serotonina</i>	45
2.3.3.- <i>Hipótesis del afinado neuronal (glutamato-GABA)</i>	46
2.3.4.- <i>Teoría de la alteración fosfolipídica en la membrana neuronal</i>	48
2.3.5.- <i>Alteraciones en la actividad cerebral</i>	49
2.4.- SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	52
2.5.- MEDICACIÓN ANTIPSICÓTICA Y EL METABOLISMO OXIDATIVO	57
3.- MARCADORES OXIDATIVOS.....	59
3.1.- GLUTATIÓN.....	61
3.2.- ENZIMAS DEL METABOLISMO OXIDATIVO	63
3.3.- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	65
3.4.- OTROS MARCADORES.....	66
4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA	69
4.1.- USOS CLÍNICOS Y CIENTÍFICOS DEL REGISTRO ELECTROENCEFALOGRÁFICO.....	71
4.2.- BANDAS DE FRECUENCIAS	75
4.3.- POTENCIAL RELACIONADO CON EVENTOS	77
4.4.- INTRODUCCIÓN CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES ELECTROENCEFALOGRÁFICAS DEL ESTUDIO	79
4.4.1.- <i>Banda gamma de frecuencias</i>	79
4.4.2.- <i>Mismatch Negativity (MMN)</i>	81
5.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO.....	83
5.1.- FACTORES EXÓGENOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESQUIZOFRENIA	85
5.2.- ROL DEL METABOLISMO OXIDATIVO SOBRE MMN Y BANDA GAMMA EN ESQUIZOFRENIA	88
6.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	91
6.1.- OBJETIVO PRINCIPAL	93
6.2.- HIPÓTESIS PRINCIPALES	94
6.3.- OBJETIVOS SECUNDARIOS	94
6.4.- HIPÓTESIS SECUNDARIAS.....	95
.....	96

7.-MATERIAL Y MÉTODOS	97
7.1.- CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES.....	99
7.2.- INSTRUMENTOS DE MEDIDA	102
7.2.1.- <i>La entrevista clínica estructurada para trastornos mentales según la DSM IV (SCID)</i>	102
7.2.2.- <i>Escalas utilizadas para el estudio de la naturaleza y grado de la enfermedad</i>	102
7.2.3.- <i>Cuestionario de alimentación para la estimación de ingesta de antioxidantes (Cuestionario EIA)</i>	104
7.2.4.- <i>Registro electroencefalográfico de 64 canales</i>	105
7.2.5.- <i>Muestras de fluidos corporales (biomarcadores de metabolismo oxidativo)</i>	107
7.3.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y ANÁLISIS DE DATOS	112
8.- RESULTADOS	117
8.1.- NIVELES DE GSH/%GSSG, IPs Y TBARS	119
8.2.- RESULTADOS DEL ESTUDIO 1: "BIOMARCADORES ELECTROFISIOLÓGICOS INTERMEDIOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN ESQUIZOFRENIA"	121
8.2.1.- <i>MMN y su correlación con niveles de GSH/%GSSG y sus comparadores (IPs y TBARS)</i>	121
8.2.2.- <i>Correlaciones de bandas de frecuencia de actividad neuronal respecto GSH y %GSSG</i>	125
8.2.3.- <i>Relación de la Mismatch Negativity (MMN) y las bandas de frecuencia de actividad cerebral</i>	129
8.2.4.- <i>Glutación y parámetros clínicos</i>	129
8.2.5.- <i>Marcadores intermedios en relación con el estrés oxidativo y las funciones clínicas</i>	130
8.3.- RESULTADOS DEL ESTUDIO 2: "NO HAY EVIDENCIA DE UN ORIGEN EXÓGENO DE LA ALTERACIÓN EN EL BALANCE OXIDATIVO EN ESQUIZOFRENIA"	132
8.3.1.- <i>Capacidad Total Antioxidante en la dieta (TAC)</i>	132
8.3.2.- <i>Glutación, TBARS, IPs y la medicación antipsicótica</i>	135
8.3.3.- <i>Glutación, TBARS, IPs y el tabaco</i>	136
9.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	139
9.1.- DISCUSIÓN.....	141
9.1.1.- <i>Discusión: Objetivos principales respecto al glutación</i>	142
9.1.2.- <i>Discusión: Los objetivos principales respecto a la peroxidación lipídica</i>	146
9.1.3.- <i>Discusión: los objetivos secundarios respecto al glutación y comparadores de peroxidación lipídica</i>	147
9.2.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CIERRE DE LA DISCUSIÓN.	149
9.3.- CONCLUSIONES.....	151
ANEXOS	153
ANEXO 1: CUESTIONARIO SOBRE LA ESTIMACIÓN DE LA INGESTA DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA (EIA).....	155
ANEXO 2: TABLA DE CONVERSIÓN PARA EL CÁLCULO DE INGESTA DE ANTIOXIDANTES	157
ANEXO 3: MANUAL DE PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR: MARCADORES DE OXIDACIÓN	158
PUBLICACIONES	161
ABREVIATURAS	177
REFERENCIAS	183

ABSTRACT

Objective: Diverse electrophysiological abnormalities have been associated with schizophrenia (SZ), but the underlying causes remain elusive. Natural defense against oxidative stress involves sequestration of oxidation elements by the reduced form of glutathione (GSH). SZ has been associated with decreased GSH, often attributed to genetic or other pathological causes. Therefore we tested whether altered oxidative stress in SZ contributes to the electrophysiological abnormalities. We also tested if this contribution was specific to glutathione or also existed in other biomarkers related with lipid peroxidation: a process in which free radicals "steal" electrons from the lipids in cell membranes and the consequence is cell damage. The lipid peroxidative comparators were Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS) in plasma and Isoprostanes (IPs) in urine samples.

In addition to that, low GSH (and increased peroxidative comparators) in SZ could also be due to insufficient antioxidant consumption or other exogenous factors. Consequently, we studied the role of smoking, diet and neuroleptics over redox stress found in SZ.

Methods: We used an auditory oddball task to measure Mismatch Negativity (MMN) and gamma band response on 29 SZ patients and 25 normal controls. Oxidative

stress was assessed by monomeric glutathione (GSH, reduced form), glutathione disulfide (GSSG, oxidized form) in blood samples, TBARS measured in plasma as malondialdehyde acid (MDA) and IPs in conjunction with creatinine levels in urine to normalize the rate of excretion of other analytes. We evaluated the oxidation balance with these 3 biomarkers in SZ in relation to diet, smoking, or medication sources. The Antioxidant Dietary Source Questionnaire was used to estimate the total antioxidant capacity (TAC) from participants' diet.

Results: Patients had reduced MMN Amplitude ($p=0.015$) and reduced power of gamma band responses at 21-40 Hertz (Hz) and 41-85 Hz (all $p<0.001$). GSH was significantly lower ($p<0.001$) while %GSSG was higher ($p=0.023$) in patients compared with controls. Lower GSH and higher GSSG levels were associated with low community functioning ($p=0.018$). Multivariate mediation modeling showed that gamma band at 21-40 Hz was a significant mediator for GSH effect on community functions. MMN Amplitude was correlated with GSH in controls ($r=0.45$, $p=0.024$). 21-40 Hz responses were correlated with GSH in patients ($r\geq 0.50$; $p<0.005$). As regards the comparators all of them showed no significant correlation with MMN parameters in patients and controls except the TBARS levels in control group and MMN latency (showing a negative correlation with $p=0.03$).

Regarding exogenous factors of redox balance we found no evidence for reduced TAC dietary intake. Smoking and medications did not significantly predict the GSH deficit either but there was suggestive data showing that IPs may be increased by tobacco in patients sample ($p=0.01$).

Reduced GSH was independently present in patients on clozapine ($p = 0.005$) and patients on other antipsychotics subgroup ($p < 0.001$) compared with controls. We could not observe these differences with TBARS and IPs. In patients on clozapine, a higher daily dose was significantly related to less oxidized glutathione GSSG ($r = -0.65$, $p = 0.02$) which was a specific finding of this biomarker as it was not observed in the peroxidative comparators.

Conclusions: High beta/low gamma range (21-40 Hz) responses may be an intermediate biomarker indexing the oxidative stress and its effect on clinical functions. None of the exogenous sources played a role in explaining the hyper-oxidative stress state in patients. However, there are some pathways of the lipid peroxidation (measured by IPs) that may be affected by chronic consumption of tobacco in vulnerable individuals like SZ patients.

Significance: Electrophysiological abnormalities and associated clinical functional changes may in part be associated with heightened oxidative stress in SZ. The state of oxidative stress of glutathione appears to follow neurodevelopmental factors previously linked to the pathology of SZ. Further investigations will be required to confirm or rule out this hypothesis as regards lipid peroxidation.



RESUMEN

Objetivos: Diversas alteraciones electrofisiológicas se han asociado a la Esquizofrenia (SZ). Sin embargo, las causas subyacentes a las mismas no están del todo clarificadas en la actualidad. Las defensas naturales frente al estrés oxidativo comprenden, entre otros mecanismos, el secuestro de moléculas oxidadas por la forma reducida del glutatión (GSH). En previos estudios en pacientes diagnosticados de SZ se ha asociado esta enfermedad con niveles disminuidos de GSH (a menudo atribuido a factores genéticos u otros procesos fisiopatológicos). Pretendemos comprobar si las alteraciones en el estrés oxidativo contribuyen a distintas alteraciones electrofisiológicas en SZ.

También pretendemos estudiar si esta contribución es específica del glutatión o existe también en otros biomarcadores vinculados a la peroxidación de lípidos: un proceso en el que los radicales libres "roban" electrones de los lípidos en las membranas celulares y como consecuencia se ocasiona daño celular. Los comparadores peroxidativos lípidicos analizados fueron sustancias reactivas al tiobarbitúrico (TBARS) medidos en plasma e Isoprostanos (IPs) en muestras de orina.

Por otro lado, las bajas concentraciones de GSH (y altas concentraciones de comparadores de metabolismo oxidativo) vistas en pacientes con SZ podrían ser debidas a una dieta con baja ingesta en alimentos con contenido antioxidante u otros factores exógenos. Por ello, también pretendemos estudiar el rol de la dieta, hábitos tabáquicos y medicación antipsicótica en el estrés oxidativo encontrado en pacientes con SZ.

Métodos: Utilizamos una secuencia de estímulos auditivos de paradigma “oddball” para medir la Mismatch Negativity (MMN) y la banda gamma en 29 pacientes diagnosticados de SZ y 25 Controles Sanos. El estrés oxidativo fue medido como la forma monomérica del glutati3n (GSH, forma reducida), el glutati3n disulfide (GSSG, versi3n oxidada) en muestras de sangre, TBARS medido en el plasma como 1cido malondialdehido (MDA) y los valores de IPs en relaci3n con los niveles de creatinina en orina para normalizar la tasa de excreci3n de otros analitos. Evaluamos las concentraciones de los 3 biomarcadores en SZ con factores como la dieta, tabaco y la medicaci3n neurol3ptica. Para estimar la cantidad total de antioxidante (TAC) en la dieta de los participantes se elabor3 un cuestionario de ingesta de antioxidantes presentes en la dieta.

Resultados: El grupo de pacientes con SZ tuvo una Amplitud de MMN reducida ($p=0.015$) y un respuesta reducida en la banda gamma en el rango de 21-40 Hertzios (Hz) y 41-85 Hz (siempre $p<0.001$). Los niveles de GSH fueron significativamente bajos ($p<0.001$) mientras que el % de GSSG era m1s alto ($p=0.023$) en los pacientes comparado con los controles. Unos niveles bajos de GSH y elevados de GSSG se asociaron con bajos niveles de funcionamiento social en la comunidad ($p=0.018$). El modelo de mediaci3n multivariante mostr3 que la banda gamma en el rango de 21-40 Hz fue un mediador del efecto del GSH sobre las funciones sociales en la comunidad. La Amplitud del MMN se correlacion3 con los niveles de GSH en controles ($r=0.45$, $p=0.024$). La banda de 21-40 Hz se correlacion3 con GSH en pacientes ($r\geq 0.50$; $p<0.005$). En cuanto a los comparadores todos mostraron una correlaci3n no significativa con los par1metros de MMN en pacientes y controles, excepto los niveles

de TBARS en el grupo control y latencia de la MMN (que muestran una correlación negativa con $p = 0,03$).

En relación con los factores exógenos respecto al estrés oxidativo no encontramos evidencia alguna por la que la ingesta de antioxidantes en la dieta influyese en el balance oxidativo. Tampoco la medicación y el tabaco predijeron estadísticamente el déficit de glutatión pero hay datos que sugieren que los valores de IPs pueden incrementarse por el tabaco en la muestra de pacientes ($p = 0.01$). En pacientes tratados con clozapina y otros antipsicóticos los niveles de GSH estaban reducidos ($p = 0.005$ y p menor a 0.001 respectivamente) en relación con los individuos de grupo control. En los pacientes con clozapina se observó que la dosis al día se correlacionó significativamente con menos glutatión oxidado GSSG ($r = - 0.65$, $p = 0.02$). Dichos resultados fueron específicos de este biomarcador al no observarse diferencias con los comparadores de peroxidación lipídica.

Conclusiones: Las bandas beta alta/baja gamma (21-40 Hz) pueden ser un marcador intermedio del estrés oxidativo respecto a las funciones clínicas. Ninguno de los factores exógenos pudo explicar el estrés oxidativo de nuestro grupo de pacientes diagnosticados de SZ. Sin embargo, hay algunas vías en la peroxidación lipídica (medido por IPs en orina) que pueden estar afectados por el consumo crónico de tabaco en individuos especialmente vulnerables como los pacientes esquizofrénicos.

Importancia de los resultados: Las alteraciones electrofisiológicas y la clínica asociada al funcionamiento en la comunidad pueden estar, en parte, asociadas con un estrés oxidativo elevado en SZ. El estado de estrés oxidativo parece deberse a factores

presentes en el neurodesarrollo que aparecen con anterioridad al debut de la enfermedad. Se necesitan más investigaciones para confirmar o descartar esta hipótesis en cuanto a la peroxidación lipídica.

PALABRAS CLAVE

Por orden de relevancia:

- Esquizofrenia
- Estrés oxidativo
- Electroencefalografía
- Glutación
- Peroxidación lipídica
- Mismatch Negativity
- Banda Gamma
- Dieta
- Tabaco
- Antipsicóticos



1.- INTRODUCCIÓN

1.-INTRODUCCIÓN



1.-INTRODUCCIÓN

Estudios de prevalencia detallan un 1% de la población general padece SZ con síntomas tan disfuncionales como alucinaciones, delirios, falta de motivación, déficits cognitivos o sociales (1). Probablemente la enfermedad en la población general aparezca como un continuum de modo que haya valores de prevalencia bastante superiores de personas que vivencian una experiencia psicótica sin llegar al diagnóstico de SZ (2). Por lo tanto, el lector podrá comprender que centrar el presente trabajo doctoral en una enfermedad prevalente e incapacitante (como es la SZ) pueda tener interés en el ámbito clínico y científico. A continuación veremos que, además, dicha enfermedad ha suscitado un gran interés científico surgiendo diversos modelos explicativos a lo largo de las últimas décadas.

Recientemente se han planteado modelos de genómica/genética y de neurodesarrollo que tratan de explicar la enfermedad desde diversas perspectivas. Desde el punto de vista genético parece que el modelo que postula que la alteración está ubicada de forma particular en un locus simple de nucleótidos queda descartado siendo los complejos modelos poligénicos los que explican mejor actualmente una posible transmisión de la enfermedad (3). Otros autores plantean que una cierta predisposición genética puede presentar mayor vulnerabilidad a agentes presentes en distintas etapas del neurodesarrollo (4). Esta idea se apoya en el hecho de que se han objetivado diversas anomalías en la SZ durante este proceso como alteraciones a nivel inflamatorio (5), de diferenciación, migración, poda sináptica (6) u oxidativo (4) entre otras áreas de investigación.

1.-INTRODUCCIÓN

La teoría de la alteración en el balance oxidativo como causante de anomalías en la maduración cerebral se sustenta en que durante períodos críticos en el neurodesarrollo ocurren determinados eventos prooxidativos. Este hecho conlleva la afectación de diversos receptores cerebrales, del proceso de mielinización o el funcionamiento fisiológico de neuronas de transmisión inhibitoria (4). Todas estas alteraciones tienen a su vez una repercusión importante la actividad eléctrica del cerebro. Modelos de investigación animal en SZ han demostrado que la alteración del desequilibrio oxidativo conlleva a una alteración en la sincronía neuronal en áreas específicas del cerebro que, a la postre, se traduce clínicamente en fenotipos de conducta propias de enfermedades mentales (7). Todo ello ha llevado a proponer que las alteraciones en el balance del “regulador redox” glutatión pueda contribuir a la presencia de enfermedades mentales como la SZ o el trastorno bipolar (TB) y, por tanto, surge con fuerza como potencial biomarcador del estrés oxidativo (8). Por otra parte el metabolismo lipídico puede jugar también un papel importante en el cerebro de los pacientes con SZ, ya que este órgano tiene la más alta concentración de lípidos junto al tejido adiposo de todo el cuerpo. Hay estudios sustentando esta idea en los que se da un tratamiento con ácidos grasos insaturados mostrando beneficios clínicos en la SZ (9).

Los datos mencionados sugieren que un estudio del balance oxidativo y el papel que pueda jugar en la fisiología cerebral a distintos niveles aportará información sobre la fisiopatología de la SZ. Ello facilitaría una mejor interpretación del curso clínico de los pacientes y, lo que es más importante, el descubrimiento de futuras dianas terapéuticas. Dado el efecto previamente descrito de factores endógenos y/o concurrentes previos a la eclosión de la enfermedad sobre el metabolismo oxidativo, el

1.-INTRODUCCIÓN

estudio de un posible efecto de factores exógenos sobre el estrés oxidativo en individuos adultos puede ayudar comprender mejor estos tipos de biomarcadores de cara a un diagnóstico precoz y una intervención terapéutica temprana.

Esta tesis doctoral pretende estudiar el rol de 3 marcadores biológicos del metabolismo oxidativo sobre la neurofisiología del cerebro en pacientes con SZ y el rol de diversos factores ambientales en participantes adultos en su madurez cerebral. Parte de la labor realizada se incluye en dos estudios ya publicados en revistas científicas que se centran en el papel que juega el glutatión en la SZ (adjuntos en **Publicaciones**). Por otro lado se estudia también el rol de marcadores oxidativo vinculados a la peroxidación lipídica en SZ siendo esta una labor específica de esta tesis doctoral y no publicada por otros medios de divulgación científica o académica hasta la presente fecha.

Los artículos científicos tienen como título:

1.- Electrophysiological Intermediate Biomarkers for Oxidative Stress in Schizophrenia.

Orden de autores: Alejandro Ballesteros, M.D.^{ab}, Ann Summerfelt, B.S.^a, Xiaoming Du, Ph.D.^a, Pan Jiang, B.S.^a, Joshua Chiappelli, M.D.^a, Malle Tagamets, Ph.D.^a, Patricio O'Donnell, M.D., Ph.D.^c, Peter Kochunov, PhD^a, L. Elliot Hong, M.D.^{a*}

2.- No Evidence of Exogenous Origin for the Abnormal Glutathione Redox State in Schizophrenia.

Orden de autores: Alejandro Ballesteros, M.D.^{ab}, Pan Jiang, B.S.^a, Ann Summerfelt, B.S.^a, Xiaoming Du, Ph.D.^a, Joshua Chiappelli, M.D.^a, Patricio O'Donnell, M.D., Ph.D.^c, Peter Kochunov, PhD^a, L. Elliot Hong, M.D.^{a*}

^a Maryland Psychiatric Research Center, Department of Psychiatry, University of Maryland School of Medicine. 55 Wade Avenue. (21228) Catonsville, MD (United States of America).

^b Hospital Clínico de Salamanca, Department of Psychiatry. Calle de San Vicente, 182. (37007) Salamanca (Spain).

^c Department of Anatomy & Neurobiology and Psychiatry, University of Maryland School of Medicine. 685 West Baltimore Street. (21201) Baltimore, MD (United States of America).

2.- ESQUIZOFRENIA



2.1.- Concepto

El término de esquizofrenia viene del griego, etimológicamente compuesto por el término “σχίζειν” o “schizein” que significa “dividir, escindir, hendir, romper” y “φρήν” o “phrēn” significa “entendimiento”, “razón” o “mente”. Es un trastorno grave y crónico con alteraciones perceptivas y de expresión de la realidad (10). Sustentando esto autores tradicionales como Kraepelin o Morel reseñan un inicio precoz y de mal pronóstico calificándola como “dementia praecox”, aunque hay otros autores clásicos con visión menos pesimista, como Bleuler, plantea una forma más amplia con un “grupo de esquizofrenias” en el que puede haber varios tipos con diversos pronósticos (11). De cara a la quinta edición del “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders” (DSM-V) y la Clasificación Internacional de Enfermedades 11 (CIE-11) se han realizado diversos intentos de validación neurobiológica, estudios de familiares y de seguimiento. Sus resultados desafortunadamente no han encontrado relación con la definición actual de la enfermedad por lo que se han propuesto alternativamente modelos dimensionales que se sustenten en la evidencia científica y expliquen de manera más precisa la enfermedad (12).

En los últimos años se han utilizado diversas técnicas de estudio para buscar biomarcadores que reflejen la presencia de la enfermedad o que, siguiendo la idea de “grupo de esquizofrenias” propuesta un siglo atrás por Bleuler, divida a los pacientes en grupos con una gravedad y naturaleza clínica similar. Así, en los últimos años han surgido candidatos en ámbitos como la neuroimagen (13), la electroencefalografía (EEG) (14), la inflamación o el metabolismo oxidativo (4, 15) entre otros. Estos biomarcadores a su vez podrían servir para crear endofenotipos genéticos: simples

componentes medibles sobre los que hay más base genética que el síndrome de la enfermedad en sí sugiriendo la idea de que los diagnósticos psiquiátricos se pueden descomponer o deconstruir (16).

Por tanto la futura revisión del DSM-V sobre los criterios que caracterizan a la SZ tiene como reto la búsqueda de un fortalecimiento del enfoque dimensional compaginado con diversos biomarcadores de relevancia por su impacto en el sistema de diagnóstico de la enfermedad (17).

2.2.- Modelos etiológicos de la enfermedad

La SZ es un trastorno con heterogeneidad clínica y probablemente fisiopatológica y etiológica. Hay autores que sostienen que solamente los factores de riesgo genético tienen un efecto suficiente como para ser considerados causales. En cambio, otros defienden que los factores de riesgo ambiental (tanto psicosociales como biológicos) pueden interactuar con la vulnerabilidad genética a la enfermedad incrementando el riesgo de desarrollar SZ (18). Para estudiar en más detalle dicha interacción genes-ambiente y un diagnóstico que permita una intervención precoz, muchos marcadores de la enfermedad están siendo estudiados con el fin de saber si reúnen las características propias de un endofenotipo.

Por definición el endofenotipo debe cumplir los siguientes criterios (16):

1. El endofenotipo se asocia con la enfermedad en la población.
2. El endofenotipo es heredable.

2.- ESQUIZOFRENIA

3. El endofenotipo es principalmente estado-independiente. La diferencia respecto a los marcadores de estado-dependientes es que los primeros se manifiestan de forma invariable tanto sí el paciente está en fase aguda como en remisión.

4. Co-segregación en las familias del endofenotipo y la enfermedad.

Para la identificación de endofenotipos de enfermedades que muestran patrones complejos de herencia se sugirió además una última característica:

“Que el endofenotipo encontrado estuviese presente en los miembros afectados de la familia y en los miembros de la familia no afectados en una tasa mayor (en ambos casos) que en la población general”. La SZ es una enfermedad que requiere de complejos estudios genómicos (19) por lo que sería necesario diseñar estudios experimentales que corroborasen este último criterio.

Pese a no abordar de forma directa la interacción genes/ambiente en el presente estudio, de cara al diseño e interpretación de resultados seguimos un modelo oxidativo de la SZ bajo un prisma que englobe la influencia genético/ambiental sobre la neurofisiología cerebral y el correlato clínico de la misma.

2.2.1.- Genética

La presencia de SZ en familiares es relativamente frecuente lo que hace pensar en la importancia de la heredabilidad en esta enfermedad. Así, un 10 por ciento de las personas que tienen un parentesco de primer grado con alguien que padece del trastorno (como un padre o un hermano) desarrollará la enfermedad. Las personas que tienen un parentesco de segundo grado con alguien que padece la enfermedad también tienen más

2.- ESQUIZOFRENIA

probabilidades de desarrollar SZ que la población general. El riesgo es mayor para un gemelo idéntico de una persona con SZ. En este caso, existe entre un 40 y 65 por ciento de desarrollar el trastorno (20).

Sin embargo, los investigadores han identificado un número de variantes genéticas que predisponen al cerebro a desarrollar la enfermedad que sólo explican en una escasa magnitud la presencia de SZ. En vista de esto ha tenido un especial interés el estudio de “copy number variants” (alteraciones de una o más fragmentos ADN que se traducen en la célula un número anormal de veces). Sin embargo, aún así estos estudios sobre genes como DISC1, NRG1, DTNBP1, RGS4, KCNH2 COMT, AKT1 u otros característicos de la SZ dejan sin explicar la gran mayoría de los casos de enfermos (21).

Puede ser que el mecanismo por el cual se herede esta enfermedad sea tan complejo y heterogéneo como su fisiopatología y curso clínico. Así, estudios del genoma completo denominados “Genome wide association study” (GWAS) se han publicado en los últimos años en la SZ (19). GWAS es un examen de todo el genoma en una muestra limitada donde se estudian muchas variantes genéticas comunes en diferentes individuos si están asociadas con un rasgo de enfermedad (aquel marcador que es estable durante todo el curso evolutivo de la enfermedad). Los estudios GWAS normalmente se centran en la asociación entre polimorfismos de nucleótido único (una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma, en adelante denominados SNPs) y rasgos de enfermedad. Desafortunadamente hoy los resultados con estos modelos genómicos están lejos de usarse bajo contexto clínico (22).

2.- ESQUIZOFRENIA

Otro factor que debe tenerse en cuenta es el rol del medio ambiente sobre el material genético. Modelos epigenéticos apoyan esta idea de forma que modificaciones por el medio ambiente en el ADN y las proteínas histonas pueden contribuir a fenotipos complejos. Heredados y / o adquiridos, los factores epigenéticos son parcialmente estables y tienen funciones de regulación en numerosas actividades de genómica. Por ello, la epigenética es una línea de investigación prometedora en futuros estudios etiológicos de la SZ (23).

En resumen, podemos decir que la complejidad y heterogeneidad clínica no se explica por simples modelos monogénicos ya que los mecanismos de herencia de esta enfermedad parecen ser más complejos. En los últimos tiempos se han objetivado varios genes de enzimas del metabolismo oxidativo que aportan cierta importancia etiológica al balance oxidativo alterado de esta enfermedad (24) pero hasta la fecha hay pocos estudios GWAS o basados en la epigenética como para corroborar detalladamente el rol de la oxidación en este aspecto. En éste último aspecto se cree que la oxidación sobre el material genético (sobre todo la guanósina y citosina) puede actuar como un modulador epigenético en las enfermedades psiquiátricas mayores (25). Podemos teorizar de forma particular en el campo de la oxidación que de confirmarse esto en los años venideros se habrá reforzado la hipótesis de la existencia de una predisposición genética a tener un estrés oxidativo en pacientes diagnosticados de SZ.

2.2.2.- Oxidación y neurodesarrollo

En la última década varios grupos de investigación han estudiado la oxidación, planteándose si las anomalías en este aspecto son heredables. Así, los estudios genéticos muestran cierta evidencia de que los polimorfismos en los genes clave para la síntesis de GSH están asociados con la SZ (4) pudiéndose afectar de forma indirecta otras estructuras, tales como la membrana lipídica, por disminución de estos compuestos antioxidantes y aumento de radicales libres (26). Como consecuencia de esto, en la SZ habría un funcionamiento anormal de esta estructura celular y de forma global de la actividad de la neurona (27).

Pero antes de detallar cómo estos hallazgos encajan en el modelo fisiopatológico actual de la oxidación en SZ es necesario entender antes el significado del glutatión y la peroxidación en la fisiología de la neurona y en general en la fisiología celular humana:

En las células aerobias, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres son subproductos del metabolismo oxidativo que pueden alterar estructuras básicas de la célula. Éstos se interrelacionan en una compleja cascada de oxidación en la que intervienen componentes protectores de estructuras especialmente vulnerables. A continuación explicaremos cuál es el lugar de los biomarcadores en esta cascada oxidativa:

Los mecanismos naturales de defensa frente a la oxidación son muy importantes de cara a proteger la integridad celular, y ahí es donde tiene importancia la reacción redox del primero de los biomarcadores a estudio: el glutatión. Éste pasa de la forma reducida [monomérica, (GSH)] a su forma oxidada [disulfuro de glutatión (GSSG)]

2.- ESQUIZOFRENIA

neutralizando ROS y radicales libres de forma que fisiológicamente, a nivel intracelular, el glutatión está presente principalmente (~ 99%) en forma de GSH (28).

Como explicaremos más adelante en los modelos explicativos los otros dos marcadores comparadores estudiados, el ácido malondialdehído (MDA) y los Isoprostanos (IPs), se encuentran incrementados cuando el balance intracelular del glutatión falla. En otras palabras, MDA e IPs son en parte la consecuencia de esto como productos de la peroxidación lipídica de la membrana neuronal de forma que aumentan sus concentraciones cuando el daño de la misma es mayor. Parece que el sustrato de la peroxidación lipídica es obtenido mediante la extracción de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana neuronal, reacción que es catalizada por la enzima fosfolipasa 2, en lo sucesivo denominada como FL2 (27).

Si revisamos los hallazgos en los últimos años referentes a estos biomarcadores los resultados han sido diversos y prometedores en lo que respecta a la SZ. Así, se han encontrado concentraciones anormalmente bajas de glutatión en estudios post-mortem de muestras cerebrales de pacientes diagnosticados de SZ (29, 30) y estudios in vivo de espectroscopia por resonancia magnética (31, 32). Los niveles de GSH disminuyeron en la sangre de pacientes libres de antipsicóticos y también en aquellos bajo tratamiento antipsicótico (8). También se han encontrado niveles bajos de GSH en el líquido cefalorraquídeo de pacientes sin tratamiento previo de neurolépticos (31), lo que sugiere que no es secundario a los antipsicóticos.

En lo que respecta el metabolismo lipídico las alteraciones en componentes como las prostaglandinas, los fosfolípidos y ácidos grasos insaturados pueden guardar

2.- ESQUIZOFRENIA

una estrecha relación con la aparición de la enfermedad (33-35), dado que las mismas (al igual que lo que ocurre en el glutatión) no están causadas por la medicación (36). Esto se apoya en los resultados recientes de que los mecanismos de destrucción de fosfolípidos de la membrana neuronal parecen estar aumentados en etapas más tempranas. Por otro lado la capacidad de regenerar esta estructura está mermada en todas las etapas de la enfermedad dado que la producción de de fosfolípidos de la membrana neuronal está reducida con independencia de la duración de la enfermedad (37). Puede ser que la enzima responsable de esta destrucción sea la encargada de catalizar la extracción de ácidos grasos insaturados de la membrana neuronal: la antes citada FL2. La concentración de esta enzima se ha visto aumentada en SZ favoreciendo un incremento de la peroxidación lipídica (38) lo que guarda correlación con la clínica de los sujetos (39).

En conjunto, esta línea de resultados sugiere que el bajo nivel de GSH encontrado en pacientes con SZ sea constante a lo largo del curso de la enfermedad y no se puede atribuir exclusivamente al tratamiento con medicación antipsicótica. También podemos concluir lo mismo sobre las alteraciones lipídicas oxidativas, ya desde etapas muy tempranas de la enfermedad, consolidando una teoría oxidativa de la SZ que ha sido foco de atención de cara a la búsqueda de nuevas líneas de tratamiento:

A propósito de esto último, un reciente metaanálisis sobre el resultado sintomático del tratamiento con suplementos de ácidos grasos insaturados en SZ no reveló ningún efecto beneficioso. También afirmaban que no hay resultados concluyentes en los efectos a largo plazo (40) y otro estudio en roedores sugiere el papel profiláctico de los ácidos grasos insaturados en los síntomas asociados con el inicio de

2.- ESQUIZOFRENIA

la enfermedad (41). En cambio, en lo que respecta el glutatión, han surgido candidatos que revierten la sintomatología en modelos animales como la minociclina (42) o en humanos como la administración del precursor del glutatión denominado n-acetilcisteína (NAC). Este último mejoró los síntomas clínicos de los pacientes con SZ (43) lo que apoya la asociación de estrés oxidativo con la sintomatología de la SZ y una posible mejoría en la evolución clínica si se restaura el equilibrio oxidativo encontrando posibles dianas terapéuticas.

Sin embargo, para perfeccionar y entender por qué estos candidatos terapéuticos pueden tener o no cierta eficacia es necesario responder las siguientes preguntas respecto al modelo fisiopatológico oxidativo de la SZ:

1.- El mecanismo que produce tales efectos ¿es un resultado directo de la fisiopatología asociada con la SZ?

2.- ¿Es un resultado indirecto de otra patología relacionada?

3.- ¿Es posible que se dé a partir de fuentes ambientales (fuera del proceso primario de la enfermedad) de forma que hay un impacto distinto entre pacientes y la población general?.

En una búsqueda de respuestas a estas preguntas hemos diseñado el presente trabajo para estudiar el efecto de varios factores ambientales sobre el estrés oxidativo en la SZ y de cómo las anomalías electrofisiológicas pueden ser un mediador entre oxidación y clínica. A continuación tomamos como base modelos explicativos de diversos grupos de investigación sobre los que realizaremos una síntesis a la par que

aportaremos una versión personal e integradora de los hallazgos y conclusiones obtenidas hasta la fecha:

MODELO OXIDATIVO DEL GRUPO DE KIM DO.

Aunque no hay una clara evidencia de la influencia de los factores exógenos en la población adulta, sí hay indicios de que factores externos en etapas críticas del neurodesarrollo que pueden conllevar estrés oxidativo y consecuentes alteraciones en la neurofisiología cerebral. El modelo que mejor explica esto es el que propone el equipo de Kim Do (4) centrado en el glutatión, los radicales libres de oxígeno y su vinculación a factores ambientales e inflamatorios. Entre los factores de riesgo que se han documentado en etapas tempranas de la vida se encuentran esencialmente 5 (44). Para más detalle ver **Ilustración 1**:

- Malnutrición.
- Exposición a toxinas
- Infección en el embarazo: en particular al inicio/mitad del embarazo, se ha asociado a alteraciones receptoriales en la transmisión dopaminérgica, funciones de exploración espacial o de aprendizaje. Al final del embarazo puede alterar los receptores N-metil D-aspartato (NMDA), el aprendizaje y la memoria de trabajo en funciones visuoespaciales (45, 46).
- Complicaciones obstétricas en el parto (pre-eclampsia o hipoxia).
- Estrés en el postparto o en el embarazo.

Hay además otros factores ambientales que alteran la regulación del sistema redox en etapas tardías. Se incluyen 3 (4):

- Desnutrición.
- Trauma cerebral.
- Estrés durante la infancia, la adolescencia y la edad adulta: en este aspecto la evidencia en humanos es escasa pero modelos animales de estrés psicosocial han demostrado déficits de GSH y consecuentes daños en distintos componentes celulares, lípidicos, proteínas y daños mitocondriales (47).

Así, un equilibrio redox puede prevenir el impacto ambiental sobre la maduración cerebral. Por el contrario, una predisposición genética a una alteración oxidativa (unido al estrés ambiental de estos factores) implicará alteraciones madurativas en términos de conectividad cerebral y ulteriores anomalías funcionales ya en la edad adulta temprana (4). En este sentido, el modo en el que el ambiente afecta al neurodesarrollo es por varios mecanismos relacionados con la actividad eléctrica cerebral y la neurotransmisión:

- Receptores NMDA: un desequilibrio redox causado por estos factores ambientales puede afectar estructuras como los receptores NMDA, de forma que determinadas subunidades de dicho receptor son especialmente sensibles a alteraciones del glutati6n (48). Adem6s, la alteraci6n en el receptor NMDA se ha visto asociada a mecanismos inflamatorios en los que se elevan las concentraciones de Interleukina 6 (IL-6) con una consecuente activaci6n de enzimas proinflamatorias y radicales libres. El resultado de tal desequilibrio es la alteraci6n de las interneuronas GABA6rgicas de polarizaci6n r6pida. (49, 50).
- La mielinizaci6n neuronal tambi6n puede verse afectada por procesos inflamatorios secundarios a un agente ambiental. Dichos agentes

2.- ESQUIZOFRENIA

mediante un cambio en el balance de glutatión (más vía procesos mediados por citocinas) pueden alterar las concentraciones de factores de crecimiento de las plaquetas. Estos, a su vez, son necesarios para la diferenciación de los oligodendrocitos y la microglía, esenciales en procesos de mielinización (51).

Ambos procesos son fundamentales en el funcionamiento de la señal cerebral en los citados aspectos de la sincronización neuronal o en la estructura de la conectividad de distintas áreas del cerebro. Estas alteraciones pueden ser el medio por el que el estrés oxidativo cause la sintomatología relacionada con la SZ (4) y, en parte, esta cuestión es objeto de estudio en el presente trabajo doctoral.

MODELO EXPLICATIVO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

Aunque el “punto de partida” en las alteraciones oxidativas e inflamatorias no se ha esclarecido aún, las alteraciones en los lípidos de la membrana neuronal puede que sean la consecuencia de las alteraciones anteriormente descritas. Así, unas deficientes defensas del organismo frente al metabolismo oxidativo se asocian a un aumento de radicales hidroxilo producidos por la no neutralización del óxido nítrico o la molécula H₂O₂. Ello puede llevar a promover diversos procesos: apoptosis, daño estructural en el DNA, alteraciones en las proteínas y finalmente un aumento de la peroxidación lipídica (52). Esta última ocasiona alteraciones en la membrana celular y daños mitocondriales incrementando las concentraciones de sus subproductos. El organismo puede frenar este proceso mediante defensas antioxidantes no enzimáticas como son las vitaminas D y C: la primera es la que inhibe “per sé” el proceso convirtiéndose en radicales vitamínicos que son reciclados por la acción de la segunda (53). Las más recientes teorías del

2.- ESQUIZOFRENIA

impacto de la peroxidación lipídica sobre el cerebro explican que dichas alteraciones se traducen en anomalías en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica, estrechamente relacionadas con la clínica en la SZ (54). Para más detalle ver

Ilustración 2.

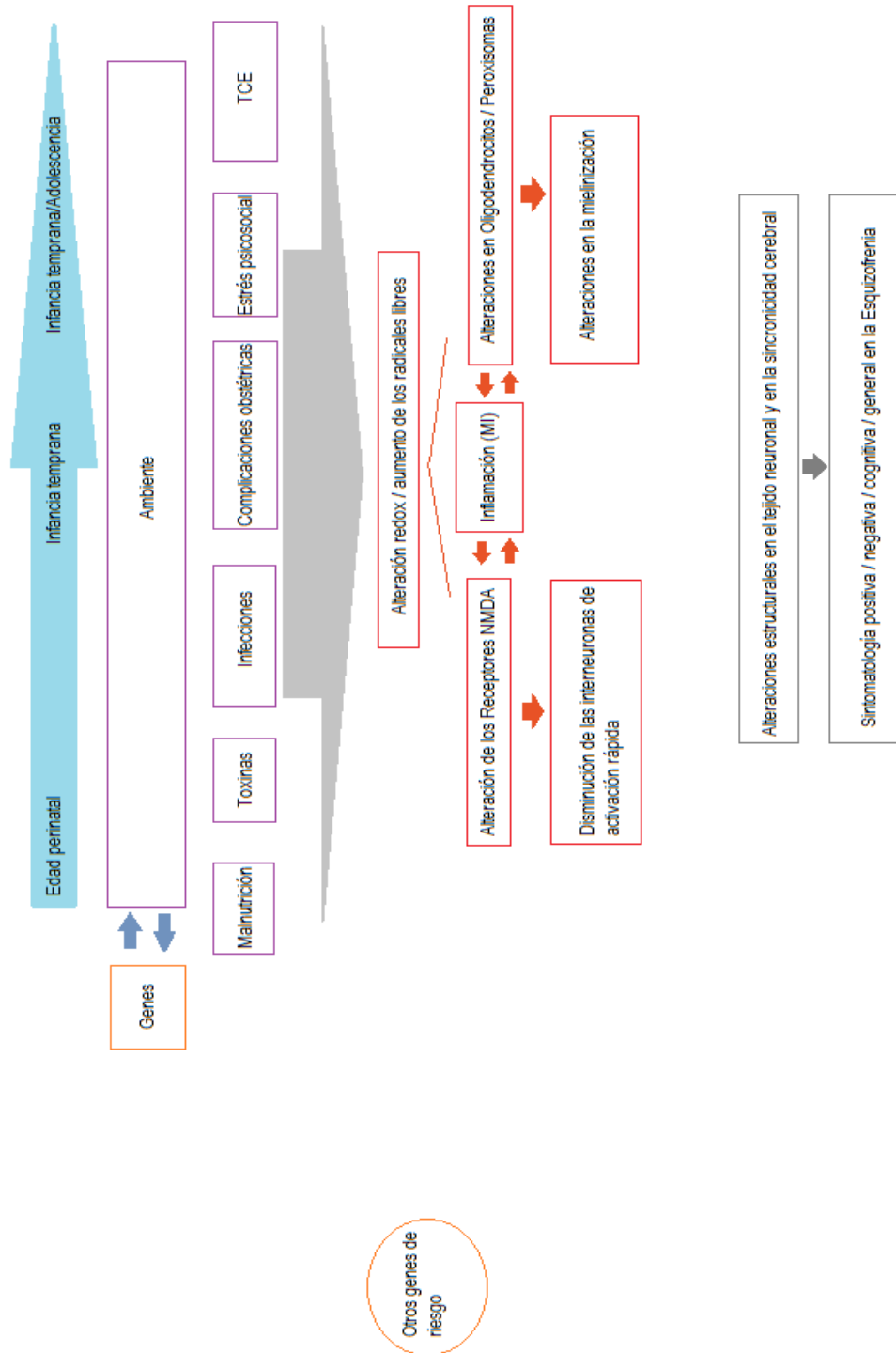


Ilustración 1.

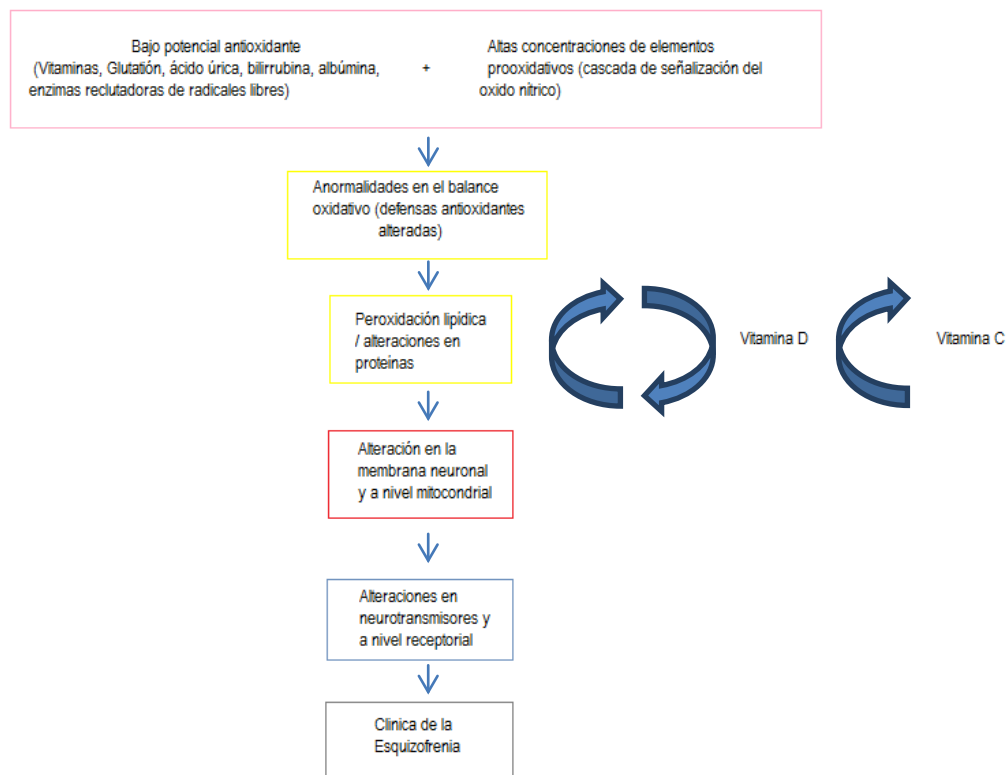


Ilustración 2.

Fuentes ilustraciones:

Ilustración 1 adaptada de (4). TCE: Traumatismo craneoencefálico MI: Mec. Inflamatorios.

Ilustración 2 adaptada de (54).

2.3.- Fisiopatología de la enfermedad

Desde el plano de la biología y la medicina tradicionalmente se han planteado varias hipótesis acerca de la fisiopatogenia de la enfermedad en función de la importancia de un determinado neurotransmisor, una estructura celular o más recientemente de la actividad cerebral de un modo más generalizado. A continuación exponemos las más importantes:

2.3.1.- Hipótesis dopaminérgica

Una de las primeras hipótesis fue la dopaminérgica: la misma surgió tras la década de los 50 en la que se introduce el primer antipsicótico, la clorpromazina, revolucionando el tratamiento de los pacientes con SZ. Pero este cambio no se ve sustentado hasta mediados de los 60, en los que se postula en diversos estudios como el de Van Rossum y la hipótesis dopaminérgica (55). Esta teoría también se sustenta en el efecto que sustancias psicotrópicas (anfetaminas o cocaína) tienen en la liberación dopaminérgica en el cerebro y en la exacerbación de los síntomas psicóticos en la SZ (56). En suma, esta teoría apoyaría la tesis de que una sobreactivación de los receptores D2 es la causa de la clínica positiva en la SZ (57). Sin embargo, hasta los años 90 los estudios de imagen no verificaron un aumento de receptores dopaminérgicos en esta enfermedad (58). Conocer el grado de bloqueo que ejercen los antipsicóticos hasta que tienen efecto terapéutico puede ser útil para usar estas herramientas correctamente en la mejora del pronóstico de los pacientes: recientes estudios sugieren para los antipsicóticos (los cuáles tienen como diana terapéutica los receptores dopaminérgicos) la existencia de una ventana terapéutica de ocupación del 60% al 78% de los receptores D2 en adultos jóvenes con SZ (59). Por tanto es razonable deducir que lo más adecuado es el uso de estos fármacos para obtener un grado de ocupación óptimo pero sin sobredosificar, dado que lejos de obtener mejoría a partir de ese punto lograremos sólo problemas de tolerancia.

Para entender mejor por qué los antipsicóticos por bloqueo dopaminérgico en la vía mesolímbica tienen efectos beneficiosos en la sintomatología positiva pero también se dan otros efectos contraproducentes en la SZ explicaremos el modelo descrito por

2.- ESQUIZOFRENIA

Stahl (60) sobre el mecanismo de acción de los neurolépticos. No sólo los efectos terapéuticos se explican por esta hipótesis, también los no deseados de esta medicación se explican por la alteración de varias vías dopaminérgicas:

1. Mesocortical: una disminución en su actividad produce síntomas negativos y un empeoramiento del rendimiento cognitivo. Se da con más frecuencia con los antipsicóticos típicos.
2. Mesolímbico: disminuir su actividad asocia con empeoramiento de los síntomas negativos secundarios y la afectividad del individuo.
3. Vía nigroestriada: en esta vía se regulan los movimientos finos del individuo (un déficit dopaminérgico provoca alteraciones extrapiramidales).
4. Vía tuberoinfundibular: regula la liberación de prolactina (a más dopamina se inhibe la liberación de dicha hormona con disfunción sexual asociada).

En tales vías predomina el receptor D2 que está a nivel presináptico. Estos funcionan como autorreceptores permitiendo la liberación de dopamina en función de la existencia de tal neurotransmisor en la sinapsis.

2.3.2.- Hipótesis de la Serotonina

Tras la aparición de los antipsicóticos atípicos, que afectan a la serotonina y causan un menor bloqueo de la dopamina, la comunidad científica empezó a pensar que dicho neurotransmisor juega también un papel importante en la fisiología de esta enfermedad. Las hipótesis propuestas para describir el rol de la serotonina en la SZ

2.- ESQUIZOFRENIA

hacen referencia a que esta actúa como freno a la activación dopaminérgica de la corteza prefrontal por medio de vías en las que está el receptor 5HT_{2A} (61). Otros autores lo describen como una interacción aberrante entre la dopamina y la serotonina en la que el tratamiento con neurolépticos atípicos puede mejorar la sintomatología (62). Sustentando la teoría de la hipodopaminergia algunos de los antipsicóticos antagonistas de los receptores 5-HT_{2A}/D₂ (por ejemplo clozapina, risperidona, sertindol y olanzapina) se han objetivado superiores a los neurolépticos típicos para el control de los síntomas negativos (60).

2.3.3.- Hipótesis del afinado neuronal (glutamato-GABA)

En los últimos años el neurotransmisor activador glutamato y su receptor (NMDA) son los candidatos más prometedores para explicar la fisiopatología de la SZ. Por ello hay numerosos fármacos en estudio centrados en tal neurotransmisor. Esto es así porque se le considera como el elemento capaz de activar y excitar gran parte de las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) que estén cerca de este neurotransmisor (denominado como el gran regulador cerebral o “the master switch”) controlando así otras vías neuroquímicas. Stahl (60) propone que las alteraciones en el mecanismo de este neurotransmisor en SZ se producen fundamentalmente por dos vías:

- La disregulación desde áreas de asociación como la corteza prefrontal en sus eferencias a áreas como el sistema mesolímbico (de eminente presencia dopaminérgica).
- Alteraciones en la vía cortico-estriatal: constituye parte de los circuitos talamo-cortico-estriatales encargados de funciones cognitivas (los

2.- ESQUIZOFRENIA

cuales en SZ se ven alterados). En estados fisiológicos una adecuada actividad glutamatérgica cortico-estriatal estimula a las neuronas gabaérgicas estriatales que establecen un filtro sobre la información procesada a nivel talámico y formación reticular. Esta es la forma en la que la corteza consigue regular estructuras inferiores para lograr el filtrado sensorial. Así el cerebro selecciona y evita la afluencia masiva de información al córtex con el consecuente “ruido cortical”. Este ruido es precisamente lo que ocurre en SZ al existir un déficit glutamatérgico que asocia a una “no estimulación” de neuronas gabaérgicas desapareciendo el mencionado filtro sensorial.

Las vías glutamatérgicas complementadas con las gabaérgicas (de transmisión inhibitoria) tienen un efecto “on-off” sobre las neuronas piramidales con el fin de “afinar” la acción de las neuronas piramidales de cara a no activar circuitos innecesarios para una determinada tarea (60). Tal es la importancia de esta regulación que algunos autores han planteado que aunque es claro el estado de hiperdopaminergia en la SZ, ésta no es la causa sino el camino final por el que se desencadena la psicosis en la SZ. Puede ser que la alteración que ocurre “aguas atrás” esté en los mecanismos explicados del GABA y glutamato en la labor de filtrado de la salida de información estriatal y procesamiento de la misma en redes glutamatérgicas rápidas (63). Dicho de otra forma, las anomalías en la transmisión del glutamato y su relación con la transmisión inhibitoria sustentan un modelo de psicosis basado en la incapacidad de mantener una actividad cerebral organizada y eficiente en la que como consecuencia un estado de hiperdopaminergia. Por otro lado las vías glutamatérgicas puede verse alteradas por muchos factores:

2.- ESQUIZOFRENIA

- Inflamación y mecanismos inmunes: antagonistas del receptor NMDA (como el componente presente en el cuerpo humano y denominado ácido kinurénico) se han visto aumentados en la SZ y han asociado a una reducción en la transmisión glutamatérgica. Mecanismos de respuesta inmune e inflamatorios parecen exacerbar este efecto de forma que los antipsicóticos modulan este efecto parcialmente, por lo que ha planteado pensar en los inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) como candidatos terapéuticos útiles sobre todo en etapas tempranas de la enfermedad (64).

- Oxidación: El estrés oxidativo puede que también afecte al funcionamiento del afinado neuronal por la vulnerabilidad de estructuras vitales en el balance de la transmisión excitatoria/inhibidora. La oxidación puede alterar elementos involucrados en dicho balance a nivel celular como las interneuronas gabaérgicas (65) o receptorial como los receptores NMDA (66, 67). El modo en que las interneuronas pueden ser especialmente vulnerables al estrés oxidativo en etapas tempranas es por fallos en la red celular perineuronal que las rodea y aporta de una envuelta polianiónica (68).

2.3.4.- Teoría de la alteración fosfolipídica en la membrana neuronal

Como hemos visto hay varias teorías sobre la causa de la SZ en la que el modelo más aceptado es la hipótesis basada en la alteración de un determinado neurotransmisor. Esto es debido a defectos en la regulación de neurotransmisores tanto en su producción como liberación, recaptación y la recepción de la señal por los receptores neuronales (69). Puesto que la membrana celular de las neuronas es un sitio estructural y funcional importante para los receptores esta estructura también ha sido foco de atención

científica. Por ello, la identificación de alteraciones en los lípidos neuronales en los cerebros postmortem de pacientes con SZ ha sido también intensamente estudiada demostrando, en algunos casos, que la distribución lipídica está alterada en la SZ en áreas como la corteza prefrontal (70).

La evidencia actual sugiere que los restos acilo grasos en los fosfolípidos de la membrana celular y ácidos grasos poliinsaturados que la componen ocupan un papel importante en la etiopatogenia de la SZ. Así, en sujetos con unos bajos niveles de ácidos grasos insaturados se pueden asociar en su neurodesarrollo efectos “aguas abajo” vía alteración de las rutas metabólicas implicadas en la señalización y modulación del crecimiento neuronal, la absorción de glucosa en el cerebro, las funciones inmunes, la neurotransmisión, la sinaptogénesis y la neurogénesis (71). Clínicamente las alteraciones en los ácidos grasos de la membrana celular se han asociado con anomalías con la memoria semántica y lenguaje en la SZ mediante cambios en la transmisión dopaminérgica (55).

2.3.5.- Alteraciones en la actividad cerebral

Otra perspectiva de la que hemos realizado breve mención en relación con la hipótesis glutamatérgica es que se pudiese explicar la enfermedad fruto de una actividad cerebral desorganizada e ineficiente que explique la sintomatología de la psicosis. Es decir, planteando un modelo en el que ocurre un fallo globalizado en el funcionamiento de distintas áreas y redes el cerebro.

2.- ESQUIZOFRENIA

La evidencia actual demuestra que las alteraciones de este tipo son encontradas en un 40 - 50% de los casos con un inicio agudo de la enfermedad, cambios que son sutiles en la mayoría de los casos (72).

Para entender un modelo de psicosis basado en un fallo entre coordinación de diversas redes cerebrales debemos explicar los dos grandes grupos de redes cerebrales que funcionan en el humano para cubrir las necesidades cognitivas, sociales y emocionales de nuestra especie:

- Las que se activan cuando estamos realizando una tarea determinada, redes funcionales (RF).
- Las redes en estado de reposo (RER) que se activan cuando no hacemos ninguna actividad en particular. Entre ellas se encuentran lo que se ha llamado en inglés “Default Mode Networks” y que en castellano podría traducirse como “redes en modo predeterminado” (RMP) aunque hay otras RER como la red de atención ventral (RAV) y la red de atención dorsal (RAD) vinculadas a tareas sensoriales.

Explicamos en qué se diferencian y como funcionan a continuación: la RMP se relaciona con pensamientos introspectivos independientes de una tarea a realizar mientras que la RAV y la RAD son unas redes encargadas de focalizar la atención de los estímulos sensoriales a los que se ve expuesto el individuo de forma voluntaria cuando no realiza ninguna actividad específica. Todas estas redes (RF y RER) se modulan unas respecto a otras en función de la situación a la que el ser humano se

2.- ESQUIZOFRENIA

expone o la tarea que realiza. De esta forma en individuos sanos hay una correlación negativa habitualmente entre las RF y RER (73).

La forma en que una actividad cerebral desorganizada se traduce en los síntomas clínicos de algunas enfermedades mentales, como la SZ y la depresión, es que la RMP se encuentra a menudo hiperactivada y hiperconectada con independencia de la actividad a realizar. En la SZ se ha visto relación con clínica de autorreferencialidad y deficiencias en su rendimiento cognitivo en áreas como la atención y la memoria de trabajo (74). Hasta la fecha no hay estudios en animales o en humanos que aborden con un método experimental la repercusión del metabolismo oxidativo sobre las RMP o su correlación con las RF.

Por otro lado, sí se ha planteado que el estrés oxidativo pueda causar una alteración de la sincronización entre distintas poblaciones neuronales en períodos críticos del desarrollo neurológico. Esto podría desempeñar un papel decisivo en la inducción de deterioro de la conectividad neuronal y la sincronización eficiente en la SZ. Los mencionados daños en los receptores NMDA, las interneuronas y la mielinización pueden ser los medios por los que aparezca esa ineficiencia en la actividad cerebral en la SZ (4) y por tanto de este modo altere la actividad de las RER y RF.

El glutatión preserva estas estructuras por lo que parecen lógicos los recientes resultados en los que hay una relación entre los Potenciales Relacionados con Eventos (PRE) atencionales, como la MMN, en pacientes esquizofrénicos con niveles reducidos de glutatión. Además, como se ha explicado antes, en este estudio se vió que la MMN

2.- ESQUIZOFRENIA

se puede normalizar por el precursor NAC (75). Por último cabe comentar que hay áreas que son de mayor interés para el diseño de futuros estudios de cara a ver la relación que pueda haber entre la regulación de las RMP y la oxidación. En particular nos referimos a aquellas que son especialmente más sensibles a la asincronía cerebral en estados de balance alterado oxidativo, como el hipocampo ventral. En esta región (pero no en el dorsal) tiene especial interés puesto que se ha objetivado relación entre la banda gamma y las concentraciones de glutatión en un estado de reposo (7).

En lo que respecta el papel la peroxidación lipídica de las estructuras neuronales es escasa la información que tenemos hasta la fecha, aunque podemos teorizar que pudiera haber algún vínculo como hemos mencionado antes en el punto 2.3.4 por la alteración vista en procesos cognitivos vía transmisión anormal de algunos neurotransmisores.

2.4.- Sintomatología de la enfermedad

En la psiquiatría actual según la DSM-IV TR para un diagnóstico de SZ se requiere la presencia de unos síntomas nucleares (síntomas de criterio A) durante al menos un período de un mes unido a un deterioro sociofuncional respecto a su estado premórbido. Además deben añadirse signos continuos de la alteración por lo menos durante 6 meses. Ver criterios en **Tabla 1**:

Criterios DSM
IV-TR de
diagnóstico de
Esquizofrenia

CRITERIO A:

Dos (o más) de los siguientes síntomas, cada uno presente durante una parte significativa de un período de **1 mes** (o menos si ha sido tratado con éxito):

- Ideas delirantes.
- Alucinaciones.
- Lenguaje desorganizado (e.g. descarrilamiento frecuente o incoherencia).
- Comportamiento catatónico o gravemente desorganizado.
- Síntomas negativos (e.g. aplanamiento afectivo o abulia).

Se requiere solo un síntoma si las ideas delirantes son extrañas o las alucinaciones consisten en voces que comentan los pensamientos y el comportamiento del sujeto o conversan.

CRITERIO B:

Una o más áreas importantes de actividad (interpersonal, académico o laboral) están claramente por debajo del nivel previo al inicio del trastorno o no alcanza el nivel esperable de rendimiento (cuando el inicio es en la infancia o adolescencia).

CRITERIO C:

Persisten signos continuos de la alteración durante al menos **6 meses**. Al menos **1 mes** de síntomas que cumplan el **Criterio A** (o menos si se ha tratado con éxito) y puede incluir los períodos de síntomas prodrómicos y residuales.

Exclusión de los trastornos esquizoafectivos y del estado de ánimo con características psicóticas:

- No ha habido ningún episodio depresivo mayor, maníaco o mixto concurrente con la fase activa de los síntomas
 - Si los episodios de alteración anímica han aparecido durante los síntomas de la fase activa, su duración total ha sido breve en relación con la duración de los períodos activo y residual.
 - La alteración no se debe a los efectos fisiológicos directos de una sustancia o condición médica general.
-

Criterios DSM
IV-TR de
diagnóstico de
Esquizofrenia

NOTA:

Si hay historia de **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).

CURSO:

Se aplica solo cuando ha transcurrido al menos un año desde la aparición inicial de los síntomas de la fase activa

- Episódico con síntomas residuales inter-episodios
(Especificar si: con prominencia de síntomas negativos)
 - Episódico sin síntomas residuales inter-episodios
 - Continuo
(Especificar si: con prominencia de síntomas negativos)
 - Episodio único en remisión parcial
 - Episodio único en remisión completa
 - Otros patrones
-

Tabla 1.

Fuente de tabla 1: (76)

Dicha clasificación se sustenta en varios modelos que han surgido en las 3 últimas décadas:

Inicialmente Tim Crow enunciaba que cada cuadro sindrómico equivalía a una entidad diferente en función de si había predominio de síntomas negativos o positivos denominados tipo I y tipo II. En ellos no había lugar para grados intermedios entre los cuadros clínicos de una u otra entidad (77). Posteriormente otros autores enunciaron que dicha gradualidad sí es posible y que por añadido se debe añadir una tercera denominada síndrome de desorganización (78). Actualmente el grupo de Jim Van Os

2.- ESQUIZOFRENIA

comienza a plantear un nuevo modelo clínico de cinco dimensiones basado modelos en multidimensionales con 5 áreas fundamentales: síntomas negativos, deterioro cognitivo, psicosis o síntomas positivos, manía y depresión (79).

Pese a este planteamiento del modelo dimensional, el modelo categorial es el más utilizado en la actualidad por los clínicos y, a grandes rasgos, los síndromes se definen de la siguiente forma:

- a) Por definición los síntomas positivos o «síndrome de distorsión de la realidad», consisten en alucinaciones y delirios.
- b) En cambio los negativos también denominados «síndrome de actividad psicomotora disminuida», consisten en la deficiencia de movimientos espontáneos, el habla y falta de interés.
- c) Los trastornos afectivos y cognitivos, o «síndrome de desorganización», consisten en la fragmentación de las ideas, pérdida asociativa de ideas y expresión emocional inadecuada (78).

Otro aspecto reseñado en los criterios DSM IV-TR es saber el grado de actividad del individuo en distintos ámbitos sociales después del inicio de la enfermedad durante un período de al menos de 6 meses. Estas áreas de funcionamiento social son variadas a lo largo de distintos estudios e incluyen el nivel de vida, la calidad de vida, la integración social, la adaptación social, el funcionamiento social, las necesidades de atención y, más recientemente, la inclusión social. Por tanto, detallar una definición estándar de rendimiento en funciones sociales y en consonancia el uso de escalas que midan dicho funcionamiento parecen esenciales para el estudio de este área en los

2.- ESQUIZOFRENIA

pacientes diagnosticados de SZ (80). Desde el punto de vista clínico e investigador el estudio integral de las funciones sociales es esencial en esta enfermedad y, aunque no parece que haya evidencia de un “gold standard”, en la actualidad parece que entre los que están disponibles el test de rendimiento personal y social (PSP) y la Evaluación de Desempeño UCSD basada en Competencias (UPSA) son los que la literatura apoya más. Su utilidad radica en la eficacia en la evaluación de los resultados psicosociales en los pacientes con SZ (81).

Dimensiones como la clínica negativa o el deterioro cognitivo se han vinculado estrechamente con el funcionamiento social necesitando, en muchos casos, rehabilitación psicosocial para superar dichos déficits (dada las limitaciones en las capacidades y el nivel de vida de estos pacientes) (82). Bajo dichos déficits es probable que haya trastornos en las oscilaciones eléctricas cerebrales y el balance entre la transmisión excitatoria/inhibitoria (E/I) y, por tanto, bandas de oscilaciones como la gamma puedan ser buenos candidatos como predictores de dicha sintomatología clínica. En relación a esto se ha visto que las alteraciones en la banda gamma alterada son predictores del rendimiento en memoria de trabajo visuoespacial y habilidades en preferencia social, mejorando los mismos tras administración de agonistas gabaérgicos. Esta alteración en el balance en la transmisión E/I parece deberse a un aumento de la excitabilidad intrínseca de células piramidales y una anomalía en la expresión de interneuronas de parvalbúmina y el funcionamiento de sus receptores NMDA (83). La descompensación en el balance en el cuerpo humano entre sustancias antioxidantes (componentes como el glutatión o enzimas que eliminan radicales libres) y prooxidantes

(como los productos derivados del óxido nitroso) pueden provocar alteraciones en dichas estructuras como hemos visto, causando así los síntomas de la enfermedad (54).

2.5.- Medicación antipsicótica y el metabolismo oxidativo

Desde el descubrimiento de la clorpromacina y la revolución que supuso en la Psiquiatría a mediados de siglo XX, varias generaciones de antipsicóticos han salido hasta la fecha.

De esta forma se han dividido en dos grandes grupos: los típicos que se agrupan por su estructura molecular mientras que los atípicos se clasifican por sus propiedades. Su efecto sobre los síntomas de la SZ todavía es motivo de debate y las teorías son variadas: localización diferencial del antipsicótico en las vías dopaminérgicas extraestriadas, constante de disociación rápida del receptor D2, actividad agonista parcial sobre los receptores D2 o afinidad por los receptores serotoninérgicos como ejemplos.

Pese a ello el estudio CATIE concluyó que tanto los típicos como los atípicos tienen propiedades terapéuticas similares siendo las diferencias en tolerabilidad y efectos secundarios lo que hace ver diferencias entre ellos. Por tanto, un buen proceder clínico, concluyeron, trata de buscar la mejor tolerabilidad sin perder la eficacia terapéutica. Sólo la clozapina demostró una eficacia superior frente a los demás (84).

Al margen de la efectividad en los síntomas de la enfermedad o su tolerabilidad, los antipsicóticos actúan como un factor exógeno sobre el glutatión y otros

2.- ESQUIZOFRENIA

biomarcadores de oxidación cerebral. Algunos autores han planteado la hipótesis de que sólo la administración crónica de los antipsicóticos típicos (pero ninguno de atípico) podría provocar estrés oxidativo disminuyendo la actividad de las enzimas antioxidantes con una consecuente peroxidación de lípidos de membrana (85). Sin embargo, el grupo de Zhang no encontró diferencias entre los antipsicóticos típicos y atípicos en la normalización parcial del metabolismo de los radicales libres en la SZ (86, 87). Los resultados comparando enfermos tratados vs Primeros Episodios de Psicosis (PEP) libres de neurolépticos Raffa (88) apoyan la idea de un estrés oxidativo (con niveles más bajos de glutatión) asociado a la aparición de la enfermedad y normalizado por el efecto de la medicación. Favoreciendo esta teoría del efecto normalizador de la medicación no se vieron diferencias en los niveles de glutatión en sangre y líquido cefalorraquídeo entre pacientes con SZ medicados con Olanzapina y controles sanos (89).

Una revisión reciente y que engloba los hallazgos anteriores concluyó que los mecanismos farmacológicos de los neurolépticos típicos y atípicos pueden ser diferentes, pero los efectos de punto final sobre el estrés oxidativo podrían ser el mismo (90). La excepción de esto es la clozapina: los pacientes tratados con este neuroléptico han mostrado mayor actividad superóxido dismutasa e inferior para la glutatión peroxidasa. Esto se interpretó como secundario a un aumento del estrés oxidativo por clozapina y por el que puede causar efectos predisponentes a síndrome metabólico o diabetes (91).

3.- MARCADORES OXIDATIVOS

3.- MARCADORES OXIDATIVOS



3.- MARCADORES OXIDATIVOS

El cerebro es un órgano del cuerpo especialmente vulnerable al estrés oxidativo. Ello es por su nivel especialmente elevado en antioxidantes, el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, metales y consumo de oxígeno (92, 93).

En este contexto suceden varios procesos a nivel estructural, receptoral, enzimático o en el equilibrio redox que se han asociado a diversos biomarcadores de metabolismo oxidativo y merecen especial interés en la enfermedad mental:

3.1.- Glutación

Un componente frecuentemente estudiado como biomarcador del metabolismo oxidativo es el glutación. El mecanismo de defensa por el que esta molécula actúa es por el secuestro de radicales libres. De esta forma, el glutación pasa de la forma reducida [monomérica glutación (GSH)] a su forma oxidada [disulfuro de glutación (GSSG)] mediante el sistema enzimático compuesto por la glutación reductasa (GR) y la glutación peroxidasa (GSH-Px). La GR es una enzima que cataliza la reducción del glutación oxidado a glutación reducido, el cual será utilizado por la GPX para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos, que son especies reactivas del oxígeno (94). El glutación está presente principalmente (~ 99%) en forma reducida en el cuerpo humano actuando como una reserva de defensa antioxidante ante cualquier situación de estrés a la que la célula se vea expuesta (28). Para más detalle ver la **Ilustración 3**.

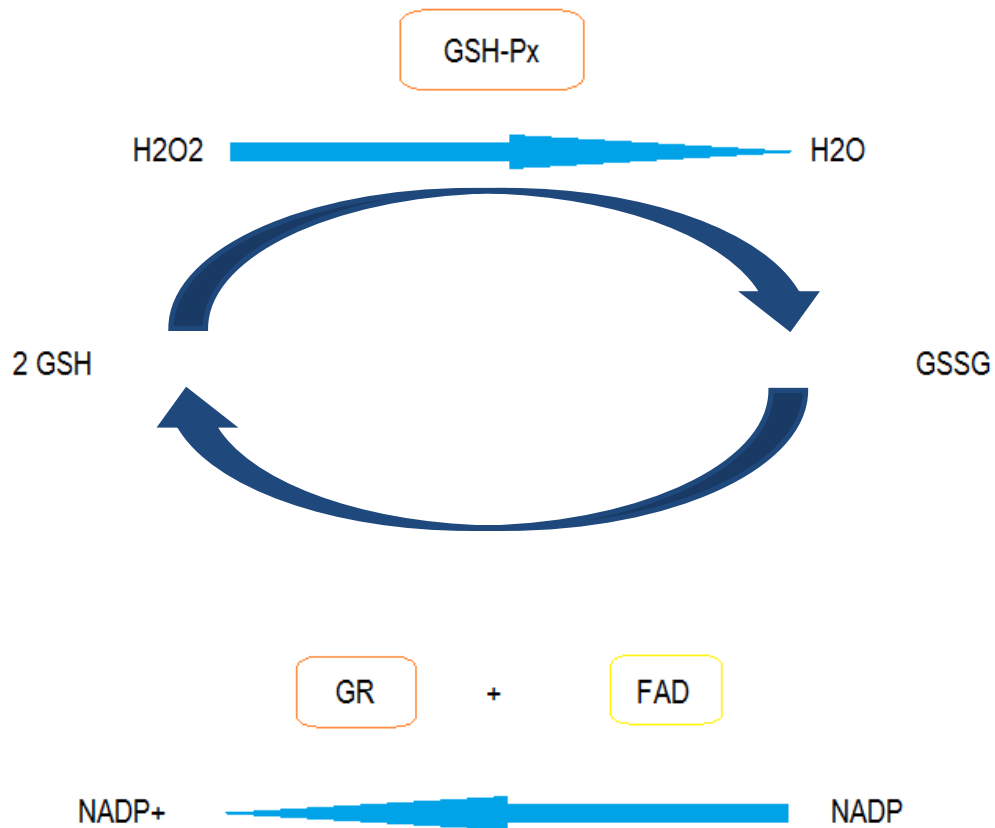


Ilustración 3.

Fuente: Elaboración propia. Abreviaturas: GSH-Px: Glutatión Peroxidasa. GSH: forma monomérica del glutatión. GSSG: forma disulfuro de glutatión. GR: Glutatión reductasa. FAD: Flavina Adenina Dinucleótido (Rivoflavina), cofactor redox donador/receptor de electrones. NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida. NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma oxidada.

Este marcador tiene un notable interés respecto a los demás puesto que, como hemos visto anteriormente, está vinculado con la fisiopatología de la SZ a nivel de integridad receptorial, actividad cerebral y parámetros clínicos. También hemos visto,

3.- MARCADORES OXIDATIVOS

como en la fisiopatología de la oxidación, que el glutatión está involucrado en muchos procesos ya desde etapas tempranas de la enfermedad.

Modelos experimentales han intentado integrar los hallazgos de este marcador a nivel bioquímico, fisiológico, clínico y terapéutico como se podrá ver a lo largo de este trabajo doctoral. Nuestro estudio pretende comprobar o descartar que la oxidación alterada o corregida repercute en la clínica mediante su efecto en las oscilaciones cerebrales:

En relación a este tema, previamente en estudios animales de tipo genético se vió que un equilibrio anormal de glutatión pudiera alterar la función del receptor de NMDA dado que su estructura es restaurada por dicho marcador redox (66, 67). Otros modelos de investigación animal demostraron que el glutatión reducido (GSH) también se asoció a déficits de la banda beta y de oscilación gamma, lo que sugiere un posible deterioro de las interneuronas (7). Por tanto, podríamos especular que el glutatión podría ayudar a preservar estructuras receptoriales responsables de una actividad eléctrica coherente esencial para un funcionamiento cognitivo y social adaptado.

3.2.- Enzimas del metabolismo oxidativo

Múltiples enzimas tienen funciones de compensar la toxicidad generada por el metabolismo oxidativo por lo que merece especial atención el papel que juegan en los pacientes diagnosticados de SZ. Entre las enzimas que actúan, encontramos la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) entre las más estudiadas. Éstas se encargan de eliminar radicales libres convirtiéndolos en agua evitando la

3.- MARCADORES OXIDATIVOS

peroxidación lipídica, apoptosis celular o alteraciones celulares. En particular sus funciones son:

- La enzima SOD cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.



- La enzima GPX cataliza la reacción de oxidación del glutatión a glutatión disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Esta enzima usa como cofactor el selenio.



Las anomalías encontradas en los estudios de población diagnosticada de SZ sobre estas enzimas son variadas y en algunos casos contradictorias. Ello puede deberse a distintos factores como la duración de la enfermedad, la heterogeneidad en los aspectos clínicos o el tratamiento. Pero en general hay un consenso en que el estrés oxidativo puede constituir un punto central en el que otros factores de vulnerabilidad confluyen y las interacciones entre ellos puedan desempeñar un papel decisivo en el patrón clínico de la SZ [para revisión ver (90)].

Sustentando esto, hay estudios que demuestran que la alteración en el metabolismo oxidativo era proporcional a la gravedad clínica. También se vio en dicho estudio que las concentraciones en enzimas como la SOD o GPX eran anormalmente más bajas en subtipos de esquizofrenia paranoide o residual que en controles o en la SZ desorganizada (95).

3.3.- Peroxidación lipídica

Un enfoque común para estimar el estrés oxidativo in vivo es determinar los productos finales de la peroxidación lipídica. Los ácidos grasos poliinsaturados, componentes principales de los fosfolípidos de membrana, son altamente susceptibles al ataque de los radicales libres y la formación de productos de la peroxidación (27). Este fenómeno es particularmente interesante en un tejido con alto contenido lipídico como el neuronal. Entre las distintas moléculas estudiadas de las primeras que salieron son las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), formadas como un subproducto de la peroxidación de lípidos (es decir, como productos de degradación de las grasas). Estas sustancias pueden ser detectadas por el ensayo de TBARS usando ácido tiobarbitúrico como reactivo constituyendo la prueba más utilizada in vitro.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen muy cortos períodos de semidesintegración y por tanto son difíciles de medir directamente. En cambio, con los TBARS son productos que señalan los daños producidos por el estrés oxidativo y no tienen dicha limitación (96). El ensayo de TBARS mide un producto denominado malondialdehído (MDA). Este producto es generado a partir de hidroperóxidos de lípidos por las hidrólisis de diversas reacciones químicas (97).

Sin embargo, sólo algunos productos de peroxidación de lípidos pueden generar MDA y, a su vez, el MDA no es el único producto final de la formación/decomposición de la peroxidación lipídica. Estas y otras consideraciones de la extensa literatura sobre MDA lleva a la conclusión de que la determinación de MDA puede ofrecer, a lo sumo,

3.- MARCADORES OXIDATIVOS

una ventana estrecha y empírica sobre el complejo proceso de peroxidación lipídica por lo que sus resultados se deben interpretar con cautela (98).

Pese a ello, se han encontrado niveles elevados de MDA en diversos fluidos corporales en muestras de pacientes diagnosticados de SZ (99), considerándose como un marcador del daño de la membrana fosfolipídica. Dicha alteración pueden afectar al funcionamiento neuronal y hasta ser indicativo de muerte celular (100, 101). Estos productos se correlacionan positivamente con la severidad clínica (102), lo que ha hecho que estos componentes sean frecuentemente utilizados como marcadores.

Frente a los TBARS cabe especial mención a unos componentes fruto de la peroxidación lipídica que, pese a haberse utilizado en pocos estudios hasta la fecha, aparecen como unos marcadores prometedores del metabolismo oxidativo: los Isoprostanos. Estos son una familia de isómeros de prostaglandinas que se producen en reacciones oxidativas catalizadas partir del ácido araquidónico y son medidos habitualmente en orina. Son útiles como unos específicos, sensibles, químicamente estables y no invasivos índices de generación de radicales libres in vivo. Recientes estudios han demostrado que son un indicador más sensible y específico que otros comparadores, como los tromboxanos (productos enzimáticos de la oxidación del ácido araquidónico), del estado de estrés oxidativo in vivo en la SZ (27).

3.4.- Otros marcadores

Por último mencionar otros marcadores no enzimáticos que ayudan a comprender por completo el modelo oxidativo y sus anomalías en la SZ:

3.- MARCADORES OXIDATIVOS

Entre ellos tenemos las vitaminas C y D que, como antes habíamos descrito, pueden inhibir la peroxidación lipídica. Además, en particular la vitamina C, estos compuestos intervienen en otros procesos como en la prevención de la formación de radicales hidroxilo, siendo una defensa más del organismo frente al estrés “redox”.

El nitrito en plasma ha sido otro biomarcador frecuentemente estudiado; es considerado como producto oxidativo que incrementa sus concentraciones cuando las defensas antioxidantes fallan. Se ha comprobado que este último compuesto es “marcador de estado” en SZ. Para más detalle acerca de estos marcadores ver el metaanálisis de distintos marcadores de oxidación publicado por el grupo de Flatow (52).

3.- MARCADORES OXIDATIVOS



4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA



4.1.- Usos clínicos y científicos del registro electroencefalográfico

Por definición la Electroencefalografía (EEG) es el registro de la actividad eléctrica cerebral en el cuero cabelludo. Mide las fluctuaciones de voltaje fruto de la actividad cerebral debidas a las corrientes iónicas en las neuronas del sistema nervioso central (103).

En contextos clínicos, la EEG se centra en la grabación de la actividad eléctrica espontánea del cerebro durante un período corto de tiempo, normalmente 20-40 minutos, desde múltiples electrodos distribuidos a lo largo del cráneo. Sus aplicaciones de diagnóstico generalmente se centran en el contenido espectral de EEG, es decir, el tipo de oscilaciones neuronales que se pueden observar en las señales de EEG. A pesar de su resolución espacial limitada, el EEG sigue siendo una herramienta valiosa para la investigación y el diagnóstico, especialmente cuando se requiere una resolución temporal de milisegundos. Este es un aspecto que no es posible tener con la tomografía computerizada o la resonancia magnética (104). Las citadas características han hecho a la EEG una herramienta muy útil en el ámbito clínico en el SNC:

Así en neurología la principal aplicación de diagnóstico de la EEG es en el caso de la epilepsia (105), el diagnóstico de coma (106) o como herramienta para la indicación de hipotermia terapéutica en neonatos (107). Un cuarto uso clínico de la EEG es para el estudio de los trastornos del sueño donde las grabaciones se hacen típicamente a lo largo de una noche completa (108).

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

En el ámbito de la psiquiatría también se puede usar la EEG para aplicaciones clínicas de rutina como la evaluación de etiologías orgánicas, síntomas de la demencia, el delirio, la toxicidad del litio o evaluación antes de la terapia electroconvulsiva (108).

Sin embargo, los registros electroencefalográficos también son objeto de estudio en diversos ámbitos (como en las ciencias cognitivas, la psicología cognitiva y la investigación psicofisiológica), no siendo posible que muchas de estas aplicaciones de uso en el ámbito científico-investigador sean aplicables en el momento actual a la práctica clínica. Recientemente muchos estudios en el campo investigador han optado por otras técnicas con mejor resolución espacial pero el EEG hoy en día sigue siendo una herramienta atractiva. Para hacer una descripción completa de esta técnica a continuación expondremos las principales ventajas y limitaciones que hacen interesante esta herramienta para el estudio de la biología de la enfermedad mental.

Ventajas de la electroencefalografía:

- a) Los costes de hardware son más baratos que otras técnicas que estudian la fisiología cerebral (109).
- b) Los aparatos usados son más manipulables pudiéndose realizar en diversos lugares de trabajo en comparación con técnicas que requieren maquinaria más pesada como la resonancia magnética funcional o tomografía de emisión de positrones por ejemplos (110).
- c) La EEG tiene una resolución temporal muy alta, del orden de milisegundos en lugar de segundos. Los EEG se registran comúnmente a velocidades de muestreo entre 250 y 2000 Hz en el ámbito clínico y de

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

investigación aunque los modernos sistemas de recopilación de datos de la EEG son capaces de filmar a velocidades de muestreo superiores a 20.000 Hz si se desea. La Magnetoencefalografía (MEG) es la única técnica no invasiva en neurociencia que se acerca a este nivel de resolución temporal (110).

- d) La EEG es relativamente compatible con el movimiento del sujeto (a diferencia de todas las otras técnicas de neuroimagen). Incluso existen métodos para minimizar e incluso eliminar los artefactos de movimiento en los datos de EEG como hemos realizado en el presente estudio con Neuroscan software (ver sección de métodos para más detalle).
- e) Es silencioso, lo que permite estudiar de forma adecuada la actividad cerebral ante estímulos auditivos.
- f) Se pueden diseñar estudios con secuencia de estímulos que no requieren respuesta como el presente estudio (ejemplo: secuencia de sonidos estándar intercalados con sonidos con diferente duración perteneciendo al paradigma usado en estudios de MMN), con secuencias que requieren respuesta por el individuo como aquellos del paradigma “oddball” (111) o incluso en individuos sin estímulo ni respuesta alguno (112). El paradigma oddball es aquel usado en SZ (entre otras enfermedades o ámbitos de investigación) en el que el sujeto se le pide que reaccione ya sea contando o pulsando el botón ante la aparición de estímulos objetivo que se intercalan aleatoriamente en una serie de estímulos más comunes y que no requieren respuesta (111).

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

- g) La EEG no implica exposición a alta intensidad (> 1 Tesla) de campos magnéticos, como en la resonancia impidiendo el uso de estas técnicas a los participantes que tienen implantes de metal en su cuerpo, como los marcapasos (113).
- h) A diferencia de otros medios de estudio del tiempo de respuesta, en los PRE se pueden dilucidar las etapas de procesamiento (y no sólo el resultado final) (114).

Limitaciones de la técnica:

- a) El uso de gel para la implantación de electrodos puede ser molesto para los participantes de la prueba. Por ello recientemente se están diseñando nuevos productos no adhesivos con similares propiedades a los actuales para sobrellevar dicha limitación (115).
- b) La baja resolución espacial registrada desde el cuero cabelludo. La resonancia magnética funcional, por ejemplo, puede mostrar directamente las actividades de áreas del cerebro que están activas sin importar la profundidad de las mismas. En cambio, la electroencefalografía requiere interpretación detallada para saber qué áreas se activan por una respuesta particular (116).
- c) En nuestro estudio uno de los inconvenientes que encontramos fue el tiempo que requiere preparar a los pacientes en el emplazamiento de los electrodos como en la posterior limpieza del instrumental, en parte por el número de canales utilizados (un total de 64).

- d) La proporción señal-ruido es pobre (117): son necesarios sofisticados análisis de datos y un número relativamente grande de sujetos para extraer información útil con el electroencefalograma.

4.2.- Bandas de frecuencias

Las actividades de las distintas poblaciones de neuronas tienen distintas tasas de disparo y en función del estado fisiológico/patológico del cerebro conlleva que en el electroencefalograma predomine una determinada banda. El estudio de bandas en la enfermedad mental se centra en rangos de frecuencia relativamente bajos si lo comparamos con la epilepsia que rondan por valores superiores a los 80 hertzios (118). En el campo de investigación de la enfermedad mental y en particular de las psicosis podemos encontrar los siguientes grupos de bandas electroencefalográficas (aunque los límites de frecuencia puede ser que varíen ligeramente de unos estudios a otros):

- a) Delta: alcanza de 0 hasta 4 hertzios (Hz). Se ha objetivado en épocas tempranas de la vida y en el sueño de ondas lentas (119).
- b) Theta: de 4 a 7 hertzios. En las primeras etapas del sueño y en varias enfermedades neurológicas y psiquiátricas los ritmos alfa se sustituyen por una actividad en la banda theta (3-7 Hz) (120).
- c) Alfa: este es el rango de frecuencia de 8 Hz a 12 Hz. Visto en las regiones posteriores de la cabeza de ambos lados, pero en mayor amplitud en el lado dominante. Surge con el cierre de los ojos, con la relajación y se atenúa con apertura de los ojos o el esfuerzo mental. El ritmo básico posterior en los niños pequeños es en realidad más lento que 8 Hz (por lo tanto técnicamente en el

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

rango de theta). Hay otros ritmos alfa normales, tales como el ritmo mu (actividad alfa en las áreas de corteza contralateral sensorial y motor que surge cuando las manos y los brazos están inactivos) y el denominado "tercer ritmo" (actividad alfa fisiológica en los lóbulos temporales o frontales que aparece de forma intrínseca e independiente de la mencionada de los lóbulos occipitales) (121, 122). La presencia de oscilaciones alfa puede ser también anormal, por ejemplo, un EEG que tiene alfa difusas que se producen en coma y no es sensible a los estímulos externos. Esto se conoce como "alfa coma", presente en estados de hipoxia o bajo efectos de drogas o fármacos (123).

d) Beta: de 12 a 30 hertzios. Esta es una banda que se atenúa en movimientos activos (124). Por otro lado el uso de psicofármacos como las benzodiacepinas incrementa su presencia en los registros (125). En nuestro estudio los participantes bajo este tipo de tratamiento fueron instados a abstenerse a su uso el día de la prueba.

e) Gamma: su rango va de 30 a 100 Hz. Los ritmos gamma se cree que representan la unión de la actividad de diferentes poblaciones de neuronas pertenecientes a una red con el fin de llevar a cabo una cierta función cognitiva o motora (103). Se ha afirmado que tienen presencia en tareas de memoria cuando el individuo observa, por ejemplo, las distintas características de un objeto (126). Las anomalías en sincronía gamma son omnipresentes en la SZ y probablemente reflejan una elevación en la asincronía gamma cortical basal ("ruido"), junto con la reducción de banda gamma evocada ante un estímulo ("señal") (83). En el presente estudio pretendemos medir la banda gamma evocada ante una secuencia de estímulos de tipo MMN y su rol como mediador

del efecto del glutatión sobre la clínica de los pacientes diagnosticados de SZ desde un plano observacional.

f) Banda mu: es una banda a caballo entre otros subtipos al estar entre 12 y 30 Hz. Su supresión se ha vinculado al autismo y parece que tiene relación con el funcionamiento de las “neuronas espejo” (127). Las neuronas espejo son una clase específica de neuronas que se activan y descargan tanto durante la observación de un acto motor realizado por otro individuo como durante la ejecución del mismo acto motor. Estas redes se activan cuando las personas aprenden a través de la ejecución de acciones motoras (como en el aprendizaje motor tradicional), la imitación, la observación (como en el aprendizaje por observación) y la imaginación de una acción motora (128).

4.3.- Potencial relacionado con eventos

A parte de las bandas con la EEG se pueden registrar patrones de registro ante una determinada tarea de forma que algunos de ellos se han visto alterados en diversas enfermedades mentales y aquí es donde entra en juego el potencial relacionado con evento (PRE) (129). Un PRE es la medida de la respuesta cerebral que es resultado directo de un evento específico sensorial, cognitivo o motriz (130). El primer PRE se plantea en los 60 con el parámetro “variación negativa contingente” (VNC): es un cambio de potencial [evocado promediado] negativo lento y de larga duración que se desarrolla sobre la región frontocentral del cerebro durante el intervalo entre dos estímulos: el primero que funciona como aviso y el segundo que funciona como estímulo imperativo y al que el sujeto debe responder de forma externa o encubierta. La

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

VNC es una deflexión negativa que comienza después del último componente positivo del potencial evocado correspondiente al primer estímulo (E1), entre 200 y 400 milisegundos, y termina abruptamente con la presentación del segundo estímulo (E2) (131).

Posteriormente se estudian distintos PRE en los que el sujeto requiere reacción activa o simplemente recibir los estímulos de una forma pasiva. En aquellos que el sujeto tiene que intervenir se realizan unas técnicas que cumplen con el “paradigma oddball”: una técnica utilizada en la que las secuencias de estímulos, que suelen ser auditivos o visuales, se usan para evaluar las reacciones neuronales a eventos impredecibles pero reconocibles. Al sujeto se le pide a reaccionar (ya sea contando o pulsando un botón) en el momento que perciben los estímulos objetivo que se ocultan como entre una serie de estímulos más comunes, que no requieren ninguna respuesta. Hay que asegurarse de que el sujeto ha entendido lo que debe hacer, qué se considerará un acierto en su realización y dar una recompensa tangible. Para evaluar los procesos cerebrales que ocurren al detectar un estímulo objetivo debemos monitorizarlo. Esto lo hacemos solicitando al sujeto una respuesta conductual registrable que puede ser, por ejemplo, la anteriormente mencionada opresión de un botón cuando perciba el estímulo objetivo. Esta respuesta debe ser lo más limpia posible en lo que se refiere a artefactos (del tipo muscular o de parpadeo).

No se pueden solapar estudios en los que se exige una respuesta medible (como en una secuencia donde se estudian PRE de paradigma oddball tales como p300 o N2b) con otros que no es necesario (como el MMN). Esto es porque si el individuo está pendiente de los estímulos auditivos responsables de PRE como la p300 o N2b estarían

dificultando la aparición de los hallazgos electroencefalográficos del MMN. Para más detalle ver la revisión realizada por el grupo de Picton (130).

En el caso del registro en nuestro estudio los sujetos estuvieron escuchando pasivamente una secuencia de estímulos sin superposición de PRE. Previo a la prueba se les explicó las características de la prueba de forma clara, la posibilidad de interrumpir la misma y el hecho que su único cometido era escuchar dichos estímulos mirando a un punto determinado sin realizar ninguna actividad (ver Métodos en adelante para más detalle).

4.4.- Introducción conceptual de las variables electroencefalográficas del estudio

4.4.1.- Banda gamma de frecuencias

Como hemos visto antes, son muy conocidas las funciones del cerebro que están asociadas con la actividad eléctrica a frecuencias específicas. Recientes estudios sobre PRE en SZ se han centrado en la banda gamma, debido al papel fundamental en funciones cognitivas (132) y a la reducción de la actividad organizada de la banda gamma en la SZ (133, 134).

La banda gamma se ha visto relacionada con diversos procesos fisiológicos y funciones cognitivas:

- En modelos teóricos como en experimentales en animales se apoya la hipótesis de que la sincronización transitoria de conjuntos neuronales en frecuencias gamma (30-100 Hz) está estrechamente asociada con el

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

procesamiento sensorial. Datos recientes obtenidos de estudios con animales y humanos han sugerido que la actividad de la frecuencia gamma también tiene un papel importante en la atención y en la memoria, tanto de trabajo como a largo plazo.

- En lo que a procesos fisiológicos neuronales se refiere, la actividad oscilatoria de frecuencia gamma tiene un papel importante en la comunicación neuronal y la plasticidad sináptica.

Así, la banda gamma podría proporcionar una clave para la comprensión del procesamiento neuronal en las redes corticales locales, y en aquellas distribuidas por diferentes áreas cerebrales que participan en funciones cognitivas complejas como la atención, la memoria de trabajo y la memoria a largo plazo. [Para más detalles sobre estos aspectos ver la revisión de Jensen (135)].

En cuanto al neurodesarrollo se ha visto que la aparición de actividad neuronal coordinada aparece en el final de la adolescencia (136). Estos procesos de maduración neuronal pueden ser aberrantes en algunos individuos desarrollando semiología psicótica a consecuencia de una desintegración a gran escala de las redes neuronales (137). Podemos especular que este fenómeno ocurra como consecuencia de un desbalance redox, provocando un cambio en la actividad eléctrica mediante un deterioro en determinadas estructuras neuronales: estudios con roedores que simulan modelos animales de SZ han demostrado que un déficit de glutatión provoca una disminución selectiva de interneuronas de parvalbúmina en determinadas áreas del cerebro, con una reducción concomitante de las oscilaciones beta / gamma. El deterioro de estas interneuronas emerge al final de la adolescencia / edad adulta temprana a medida que

aumenta el estrés oxidativo, por lo que esta sería la forma en la que un déficit de glutatión afectaría a la integridad de las interneuronas y a la sincronía neuronal (7).

4.4.2.- Mismatch Negativity (MMN)

La MMN es un componente de los PRE que aparece cuando se da un estímulo distinto en una secuencia de estímulos estándar. Puede ocurrir en cualquier sistema sensorial, pero ha sido estudiada con más frecuencia para la audición y la visión.

En el caso de estímulos auditivos, la MMN se produce después de la aparición de un sonido distinto en algún aspecto de su naturaleza respecto a la secuencia de sonidos estándar (que son los que aparecen más frecuentemente en el test). Dicho sonido se presenta en varias ocasiones de forma reiterada entre los estímulos estándar. El sujeto no requiere realizar ninguna actividad y, en este caso de estimulación auditiva, se le explica al paciente que simplemente escuche pasivamente durante la prueba. Por tanto, el MMN es evocado sólo por aquel estímulo característico por ser presentado con poca frecuencia y diferente en uno (o varios) parámetros físicos como la duración, la intensidad o la frecuencia (138). Por último cabe mencionar características de interés respecto a este PRE:

- El MMN se ve intrínsecamente relacionado con procesos atencionales: favoreciendo esto se ha visto que la latencia del MMN determina el tiempo de respuesta comportamental frente a los cambios de los estímulos auditivos (139).
- Muestra una intrínseca relación con la banda gamma encontrándose ambos constantemente alterados en la SZ (140-143). Es más, para

4.- ELECTROENCEFALOGRAFÍA

que aparezca en los registros electroencefalográficos el MMN es condición necesaria que haya en ese momento actividad sincronizada gamma en determinadas áreas del cerebro (144).

5.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO

5.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO



5.1.- Factores exógenos sobre el estrés oxidativo en Esquizofrenia

Como hemos comentado anteriormente; las alteraciones genéticas con repercusión ulterior en las defensas antioxidantes y los factores de vulnerabilidad ambiental durante el neurodesarrollo conforman un modelo etiopatogénico que explica como aparece el estrés oxidativo en la SZ (4). También expusimos que no está claro si el mecanismo que produce tales efectos es un resultado directo de la fisiopatología asociada con la SZ, un resultado indirecto de otra patología/agente relacionado o un resultado de la exposición a agentes (fuera del proceso de enfermedad primaria) que puedan diferir en su respuesta oxidativa entre pacientes y controles no pacientes. Por lo tanto, revisaremos los estudios realizados hasta la fecha sobre el papel potencial de factores exógenos en el estrés oxidativo en la SZ, incluyendo entre ellos los medicamentos, la dieta, el tabaquismo y los antipsicóticos:

- En primer lugar, la dieta es una fuente importante de variación en el estrés oxidativo en la población general (145, 146). Evaluar si la ingesta de alimentos podría regular parcialmente el equilibrio del glutatión y de otros marcadores de peroxidación lipídica parece un abordaje especialmente interesante. La razón es que el glutatión y determinados componentes de la dieta comparten vías de regulación de redox (147). Además, algunos alimentos median el control de tasa de síntesis del glutatión por medio de las propiedades activadoras de éstos sobre enzimas limitantes de la síntesis del glutatión (148). La peroxidación lipídica también parece ser sensible a la dieta en el ser humano. Así, las concentraciones plasmáticas de MDA varían en función del contenido

5.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO

antioxidante de los alimentos ingeridos (149). Los IPs también se han perfilado como otro marcador sensible a fuentes nutricionales: recientemente se ha visto que en fumadores con suplementos de vitamina C se reducen las concentraciones de estos marcadores de la peroxidación lipídica (150). En cambio, el efecto de la dieta en el estrés oxidativo visto en la SZ no está claro hoy en día: algunos estudios no han mostrado la evidencia de que la ingesta de antioxidantes esté especialmente reducida en la SZ (151). Otro estudio encontró que los bajos niveles de antioxidantes en plasma no se han encontrado correlacionados con el estado nutricional general (medido por el índice de masa corporal) (152). Por otro lado, respecto a la peroxidación lipídica se ha visto que una dieta hipocalórica puede asociar a más niveles elevados de TBARS en pacientes con SZ que pacientes con una dieta normal (153). En último lugar, un estudio con animales se vio que los suplementos con ácidos grasos Omega 3 han mostrado resultados positivos sobre la reducción de algunos parámetros de oxidación como los TBARS. Concluyeron que el medio en el que ocurría esto era vía activación de enzimas como la SOD (154). Hasta la fecha ningún estudio ha evaluado directamente si la ingesta dietética antioxidante afecta el equilibrio del glutatión en la SZ.

- En segundo lugar, fumar puede contribuir al estrés oxidativo a través de la peroxidación de lípidos (155) pero también modelos de experimentación animal proponen “mecanismos compensatorios” de respuesta al tabaco. Esta respuesta potente antioxidante consistiría en un aumento de la producción sistémica de glutatión en una exposición aguda al tabaco y que tiende a fallar con una exposición crónica al mismo mediante cambios

5.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO

fisiopatológicos que pudieran también darse en el desarrollo de enfermedades como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (156). Ya en un estudio de pacientes con SZ se encontró un aumento de las enzimas antioxidantes en el grupo de pacientes que fuman sugiriendo que esto podría tener un efecto protector contra la peroxidación lipídica (86). Se necesitan más datos para aclarar si el tabaco ocasiona/contribuye a los cambios en los diversos marcadores oxidativos en la SZ y (al igual que lo teorizado en EPOC) si similares mecanismos compensatorios fallan en esta enfermedad ante el consumo crónico de tabaco.

- En tercer lugar, y en añadido a lo explicado en el punto 2.5, el perfil oxidativo de los antipsicóticos sigue siendo incierto: algunos estudios muestran propiedades antioxidantes (85, 87, 91, 157), de mejora del balance del glutatión y los enzimas antioxidantes (8, 87). Por otra parte, los pacientes tratados con clozapina han mostrado mayor actividad de la superóxido dismutasa e inferior respecto a la glutatión peroxidasa. Este es un hallazgo que puede ser interpretado como secundario a un aumento del estrés oxidativo causado por este fármaco (91). En lo que a peroxidación lipídica se refiere, cabe mencionar que la terapia con fármacos antipsicóticos puede afectar al metabolismo lipídico (158). Si bien algunos estudios inicialmente sugieren que los antipsicóticos clásicos pueden presentar efectos prooxidativos (158, 159), los antipsicóticos de segunda generación no presentan estos efectos, es más, pueden tener incluso efectos antioxidantes (159, 160). Como hemos comentado en el punto 2.5, el consenso actual es que los antipsicóticos en general tienen un efecto normalizador en el estrés oxidativo (con excepción del perfil un tanto

particular de la clozapina). Por lo tanto, otro factor a estudiar es el efecto de la medicación en la oxidación sobre los pacientes con SZ.

5.2.- Rol del metabolismo oxidativo sobre MMN y banda gamma en Esquizofrenia

Alteraciones electrofisiológicas en determinadas frecuencias oscilatorias (133, 134, 161, 162) y PRE como la MMN (141, 163-165) se han publicado de forma consistente en pacientes con SZ. Aunque nuestra comprensión sobre las causas de estas anomalías eléctricas sea limitada, los últimos años se han sacado algunas conclusiones acerca de su origen fisiopatológico:

- Son fruto de una descompensación en la transmisión excitatoria e inhibitoria: modelos animales de SZ sugieren que los déficits cognitivos y de comportamiento puede ser fundamentado por alteración en el equilibrio de la E / I en los circuitos corticales (166), y este desequilibrio puede asociarse a las oscilaciones de frecuencia gamma (83).

- Estas anomalías se dan porque aparecen alteraciones a nivel receptorial y celular. Alteraciones que a su vez están estrechamente interrelacionadas como explicamos a continuación: el bloqueo de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) puede producir alteración en el equilibrio de E/ I principalmente porque se dificulta la función del NMDA en las interneuronas inhibitoras (167). A su vez, las interneuronas inhibitoras de parvalbúmina, que destacan por ser críticamente responsables del equilibrio E / I, están directamente involucradas en la generación de las oscilaciones gamma (168).

5.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO

Por otra parte, la integridad funcional del receptor NMDA es necesaria para que aparezca el MMN sin alteraciones en los registros (hecho que se ha contrastado tanto en animales como seres humanos) (142, 169). Esto es razonable puesto que la MMN se encuentra constantemente alterada en la SZ (140, 142, 143) necesitando (como hemos mencionado antes) actividad sincronizada gamma (144).

- Las alteraciones receptoriales y celulares mencionadas pueden ser afectadas por el estrés oxidativo: Las interneuronas parvalbúmina y los receptores NMDA también comparten la característica común de que son sensibles al daño por estrés oxidativo (66, 67, 88, 170).

Como explicaremos mas adelante, parte de nuestros objetivos tratan de esclarecer la relación causal entre todos estos hallazgos: trataremos de comprobar si las alteraciones en la oxidación pueden alterar parámetros electroencefalográficos como MMN o la banda gamma (para un registro normal de los mismos, como hemos visto antes, parece preciso la integridad de determinadas estructuras celulares y receptoriales con sensibilidad redox). Además, nuestros objetivos tratan de ver si estos parámetros electroencefalográficos pueden ser mediadores del estrés oxidativo con respecto de la clínica de los sujetos diagnosticados con SZ.

El rol de la membrana neuronal, la cual es sensible a mecanismos como la peroxidación lipídica, tiene gran importancia sobre el funcionamiento receptorial y en la neurotransmisión como hemos explicado en el punto 2.2.1. Pese a que ha sido menos estudiado el papel de la peroxidación lipídica respecto a la actividad cerebral de los pacientes con SZ, estudios preliminares parecen sustentar lo siguiente:

5.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO

- Que los niveles de ácidos grasos esenciales (presentes en la membrana neuronal y sensible a la peroxidación) pudieran estar asociados al funcionamiento de la memoria semántica y el lenguaje en la SZ. Dichas funciones que fueron medidas electrofisiológicamente con la N400 (un PRE sensible a déficits en estas áreas cognitivas) de forma que parece que dicha relación pudiera estar mediada por trastornos en la transmisión dopaminérgica (55).

No hemos encontrado hasta la fecha estudios en que vinculen la MMN, la banda gamma o estructuras anatómico-celulares relacionadas con ellas con los marcadores TBARS e IPs. Por ello, cabe dilucidar si la peroxidación lipídica tiene un papel análogo al del glutatión a este respecto o si por el contrario este biomarcador tiene un papel específico a nivel estructural y/o electrofisiológico.

6.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

6.-OBJETIVOS E HIPÓTESIS



6.1.- Objetivo principal

Estudio 1 “Parámetros electrofisiológicos como marcadores intermedios entre el estrés oxidativo y la clínica en la Esquizofrenia”.

El objetivo principal se basa en evaluar la relación entre las concentraciones de glutatión y las alteraciones electrofisiológicas en las oscilaciones gamma y MMN.

Ambas pueden ser un biomarcador mediador entre los niveles de glutatión y su impacto en las funciones clínicas en la SZ evaluados con las escalas UPSA-2 y BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale).

En el caso de la MMN también estudiamos la relación de la misma con los 2 comparadores de metabolismo oxidativo vinculados a la peroxidación lipídica. La finalidad es ver si las anomalías en la MMN, vinculada con procesos de naturaleza atencional, tienen sensibilidad específica a alteraciones redox vinculadas al glutatión o está relacionada con varias alteraciones oxidativas de distinta naturaleza.

Ello justificaría la realización de estudios más específicos desde un marco experimental con el peso suficiente para postular una relación causal entre estrés oxidativo medido con glutatión (o sus comparadores) y la sintomatología clínica de la SZ, como modelos animales en el que se controlen otras variables.

6.2.- Hipótesis principales

En este estudio analítico planteamos como hipótesis etiológica de la SZ las alteraciones del glutatión como reflejo del estrés oxidativo. Lo hacemos de la siguiente forma:

1.- Un estado de estrés oxidativo traducido en niveles bajos de glutatión reducido (GSH) o elevados de tanto de la versión oxidada (GSSG) como los productos de la peroxidación lipídica (como los TBARS y los IPs) en la SZ se correlacionan con:

- Alteraciones en la amplitud y latencia MMN (bidireccional).
- Una menor actividad en las oscilaciones de la banda gamma (en este caso estudiamos sólo a las distintas formas de glutatión).

2.- Intentaremos contrastar la hipótesis de si estos parámetros electrofisiológicos actuarán como mediador respecto al nivel de glutatión con el deterioro en la clínica del paciente medido con la puntuación de la BPRS y la UPSA-2.

6.3.- Objetivos secundarios

Estudio 2: “No evidencia de un origen exógeno de la alteración en el balance oxidativo en la Esquizofrenia”

Como objetivos secundarios planteamos estudiar el papel de los factores exógenos sobre el balance alterado del glutatión reducido, el oxidado y los 2 biomarcadores comparadores de peroxidación lipídica en pacientes adultos

diagnosticados de SZ. Entre ellos estudiamos factores como la ingesta de alimentos con alto contenido en antioxidantes, hábitos tabáquicos o la medicación.

6.4.- Hipótesis secundarias

1.- El estrés oxidativo traducido en bajos niveles de glutatión reducido, elevados de oxidado, TBARS e IPs en nuestros pacientes con SZ se correlacionarían con una ingesta baja en alimentos con alto contenido antioxidante.

2.- Dicha alteración en el balance hacia un estrés oxidativo se correlacionaría con la dosis de clozapina. Nuestra hipótesis con respecto a los pacientes con otros antipsicóticos sería la inversa: altos niveles de glutatión reducido y bajos de glutatión oxidado, TBARS e IPs se correlaciona con la dosis de neuroléptico.

3.- Por último pretendemos estudiar el rol antioxidante del tabaco: el consumo de tabaco correlacionaría con niveles altos de glutatión reducido y bajos de glutatión oxidado, TBARS e IPs.



7.-MATERIAL Y MÉTODOS

7.- MATERIAL Y MÉTODOS



7.1.- Criterios de selección de los participantes

Reclutamos para el presente estudio 54 participantes con rango de edad de 18 a 62 años. 29 de ellos eran pacientes diagnosticados de SZ, estables y bajo medicación antipsicótica. Los controles sanos sumaron un total de 25, ajustados respecto al grupo de pacientes en edad, sexo y hábitos tabáquicos (**Tabla 2**). Los pacientes fueron reclutados desde consultas externas del Maryland Psychiatric Research Center de Baltimore (Maryland, Estados Unidos de América) y comunidades vecinas de la citada área. Por otro lado, los controles se reclutaron mediante anuncios en los medios de comunicación locales.

Como criterios de exclusión propusimos los siguientes:

- a) Enfermedad médica o neurológica de importancia.
- b) Historia de traumatismo craneoencefálico con secuelas en la esfera cognitiva.
- c) Retraso mental.
- d) Dependencia o abuso de alcohol u otra sustancia adictiva de uso ilícito durante los últimos 6 meses.
- e) Pacientes con suplementos dietéticos con contenido alto en antioxidantes o fármacos con un efecto inhibitorio en la beta-oxidación metabólica como el acetaminofeno o el ibuprofeno (171) fueron excluidos también del estudio.

Se realizó la entrevista clínica estructurada para la DSM-IV (SCID) a todos los sujetos con el fin de obtener los diagnósticos según los criterios de la DSM-IV. La SCID se realizó también sobre los controles sanos sin objetivarse diagnóstico DSM-IV

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

en el Eje I y se seleccionó a los mismos de forma que no hubiera episodio de psicosis en las 3 últimas generaciones. Los pacientes clínicamente estables que componen nuestra muestra estaban con las siguientes medicaciones: 3 pacientes estaban con antipsicóticos de primera generación (en equivalentes de clorpromacina la dosis media = 117.1 ± 23.4 mg), el resto estaba con antipsicóticos de segunda generación incluyendo 12 tratados con clozapina (368.8 ± 137.5 mg), 3 con aripiprazol (18.3 ± 10.4 mg); 3 con risperidona (6.7 ± 4.6 mg); 2 con olanzapina (10.0 ± 7.1 mg); 2 con quetiapina (800.0 ± 282.8 mg); y los restantes con 2 o más medicaciones antipsicóticas. Todos los sujetos realizaron consentimiento informado por escrito de acuerdo a los protocolos actuales de las instituciones en las que se realizó el estudio.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

	Controles (N = 25)	Pacientes (N = 29)	Valores F o χ^2	Valores P
Edad (años)	38.76±13.72	41.10±13.81	0.009	0.55
Sexo (masculino:femenino)	11:14	20:9	2.48	0.12
Fumador: No fumador	7:18	8:21	0.00	1.00
Puntuación BPRS	n/a	43.28±9.93	n/a	n/a
Puntuación UPSA-	102.9±10.3	90.7±10.5	17.62	<0.001
Duración del ayuno para analítica (horas)	12.18±2.81	12.48±3.64	0.11	0.74
Ingesta de TAC/semana ($\mu\text{mol FRAP/semana}$)	12 620.6±1046.2	15 257.7±1800.0	1.48	0.23

Tabla 2.- Características demográficas, clínicas, duración de ayuno de la analítica y respecto a la Capacidad Antioxidante Total (TAC) proveniente de la dieta. ^aValores proporcionados son medias \pm sd. ^bBPRS: Brief Psychiatric Rating Scale total score. UPSA-2: the University of California San Diego Performance-based Skills Assessment, 2nd edition total score (los datos de los controles corresponde a 23 sujetos al no cumplimentar la escala UPSA-2 2 controles sanos).

7.2.- Instrumentos de medida

7.2.1.- La entrevista clínica estructurada para trastornos mentales según la DSM IV (SCID)

La Entrevista Clínica Estructurada para los Trastornos del DSM-IV (SCID) es una entrevista semiestructurada destinada a realizar los diagnósticos más importantes de los distintos ejes DSM IV-TR (172) y, por tanto, sirve para confirmar el diagnóstico de nuestra muestra de pacientes. El tiempo de administración se sitúa entre una y dos horas.

Sigue un modelo de entrevista diagnóstica clínica: empieza con un repaso de la enfermedad actual y los episodios de psicopatología anterior y prosigue con preguntas sobre síntomas específicos que se inician con un examen para incluir o descartar trastornos específicos.

La SCID se puede usar de manera modular de tal forma que el investigador pueda seleccionar para un estudio concreto únicamente los módulos de diagnóstico relevantes en una muestra particular de sujetos.

7.2.2.- Escalas utilizadas para el estudio de la naturaleza y grado de la enfermedad

Para determinar si GSH y GSSG se relacionan con los síntomas clínicos y las funciones cotidianas en la comunidad, se utilizó la escala de 20 ítems BPRS. La puntuación total de esta escala nos da una idea cuantitativa para estimar la gravedad general de los síntomas en los pacientes con SZ.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

Esta escala permite a un clínico o investigador medir síntomas psiquiátricos tales como la depresión, ansiedad, alucinaciones y comportamiento extraño (173). Esta escala es heteroaplicada y consta de puntos de anclaje, que son descripción o definición de los ítems, y de valoración de los mismos que nos ayudan a realizar su cumplimentación. Cada síntoma tiene 1-7 puntos y suman un total de 20 síntomas que se puntúan. El tiempo utilizado en su realización y puntuación es de en torno 20 a 30 minutos. Habitualmente se pregunta por los síntomas durante la última semana siendo esta escala de las más antiguas para medir los síntomas psicóticos dado que fue publicada por primera vez en 1962.

Para evaluar las funciones en todas las áreas de funcionamiento social se utilizó la UPSA-2. Esta es una medida aproximada de las habilidades de la persona funcionando en la comunidad y tiene especial interés al correlacionarse con la clínica negativa y cognitiva de los pacientes (174-176). Esta escala estudia el rendimiento en 5 áreas: las tareas del hogar, la comunicación, las finanzas, el transporte y las actividades recreativas. Al sujeto se le pregunta qué decisiones podría tomar en distintas situaciones de la vida diaria, variando en función del área a examinar, obteniendo una puntuación bruta en cada una de las áreas. Estas puntuaciones se transforman en sus valores proporcionales respecto al total. La UPSA-2 se tarda en cumplimentar unos 30 minutos, es heteroaplicada y se puede realizar por personal no clínico con un adiestramiento previo.

7.2.3.- Cuestionario de alimentación para la estimación de ingesta de antioxidantes (Cuestionario EIA)

Cada sujeto cumplimentó un cuestionario de respuesta múltiple para estimar la cantidad de antioxidantes proveniente de la dieta durante los últimos seis meses. Diseñamos el cuestionario basado en estudios con diseños similares (177-179) e incluimos los alimentos con mayor contenido en antioxidantes entre los alimentos comunes en los hábitos dietéticos del Nordeste e Interior-Este de los Estados Unidos de América. Las preguntas incluyeron distintos alimentos como frutas, verduras, nueces, frutos secos o cereales entre otros. Para cada nutriente se recogió su ingesta preguntando sobre la frecuencia promedio consumida en una semana en términos de una porción estándar de ese alimento en particular. Las cantidades de las porciones estándar para los distintos alimentos fueron obtenidas de bases de datos de Instituciones gubernamentales de Estados Unidos [United States Department of Agriculture (USDA) National Nutrient Database for Standard Reference]] y guías similares (180-185).

La información obtenida se convirtió en capacidad total antioxidante (TAC), la cual fue calculada como capacidad férrica reductora antioxidante (FRAP) habiéndose tomado estos valores de una única base de datos con aproximadamente 3100 nutrientes (186). El método FRAP es idóneo, porque mantiene una correlación lineal con otros métodos, pero por añadido no mide glutatión y otros tioles (187). Ello hace este método adecuado para nuestra hipótesis de estudio porque el glutatión de los alimentos es rápidamente degradado en la digestión y por tanto es pobremente absorbido en humanos (188).

El resumen de las categorías de alimentos está descrito en la **Tabla 4** (ver punto **8.3.1.-**). El cuestionario EIA así como la conversión vienen adjuntos en el **Anexo 1 y 2** respectivamente.

7.2.4.- Registro electroencefalográfico de 64 canales

Los registros de PRE y las muestras biológicas fueron obtenidos durante la misma sesión. Los PRE fueron grabados con el sistema Neuroscan (Charlotte, NC) SynAmp² en un sistema de 64 canales incluyendo electrodos VEOG (Electrooculograma vertical) y HEOG (Electrooculograma horizontal) a una tasa de muestreo de 1 KHz y filtro de banda a 0.1-200 Hz. Los sujetos se sentaron en una silla semi-reclinable en una cámara plomada de atenuación de sonido.

El paradigma del Mismatch Negativity usó como sonido distractor aquel con una duración distinta dentro de una secuencia de sonidos de paradigma “oddball” (189). Los sujetos fueron expuestos a una secuencia de 1000 estímulos auditivos de los cuales:

- a) 800 (80%) eran sonidos estándar con 75 dB, 60 ms y 1000 Hz.
- b) Los restantes 200 (20%) eran estímulos de características distintas en duración con 75 dB, 150 ms y 1000 Hz.

Todos los tonos tienen un período de subida/bajada de unos 5 ms con un intervalo de tiempo entre ellos de 300 ms. Se utilizó como electrodo de referencia el de la nariz y la impedancia de los 64 electrodos se mantuvo siempre debajo de 5 kilohmios (k Ω). El electrodo FZ (localizado en la línea interhemisférica del área frontal) se utilizó para medir MMN porque de forma repetida se ha visto en estudios

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

previos que FZ es el electrodo que muestra el MMN de forma más clara (190, 191). Los artefactos por parpadeo ocular fueron minimizados utilizando la aplicación “VEOG-based eyeblink spatial filter routine” disponible con el software que utilizamos para depurar e interpretar la información registrada: Neuroscan. Entonces los registros fueron filtrados a 0.1-30 Hz (191). También fueron divididos a 24 octavos en épocas, corregidos respecto la línea de base y filtrados a un umbral de ± 75 microvoltios (μV) para rechazo de artefactos seguidos de inspección visual. Los estímulos estándar y los diferentes en duración fueron promediados por separado, seguido de una sustracción de los promedios de las 2 ondas (estándar y diferentes en duración). El MMN fue calculado al detectar el pico negativo en una ventana comprendida en el período de 100 a 225 ms después del estímulo mediante un algoritmo matemático seguido de inspección visual. La marcación de la MMN fue realizada en desconocimiento de si el sujeto a estudio era paciente o control.

Las variaciones en las oscilaciones de la actividad eléctrica fueron obtenidas del registro original de FZ entre unos rangos de frecuencia entre 0.1 y 200 Hz. Los registros se dividieron en épocas usando una ventana de 250 ms de duración (la división en épocas comprende desde 25 a 275 ms después del estímulo estándar y el de distinta duración). Esta ventana es algo más grande que la que utilizamos para el cálculo de la MMN (100-225 ms) con la finalidad de abarcar la energía registrada en la onda a estudio. Para descomponer la onda en distintas frecuencias utilizamos la técnica “8-level biorthogonal discrete wavelet transform” (DWT) a cada uno de los 1000 estímulos del paradigma oddball. Subdividimos las frecuencias en 6 grupos de cara a interpretar los resultados. Las bandas utilizadas son las siguientes:

- a) Banda gamma de alta frecuencia: >85 Hz.
- b) Banda gamma de media frecuencia: 41-85 Hz.
- c) Banda gamma de baja frecuencia / banda beta de alta frecuencia: 21-40 Hz.
- d) Banda beta de baja frecuencia: 13-20 Hz.
- e) Banda theta / alfa: 5-12 Hz.
- f) Banda delta: <5 Hz.

Para más detalles acerca de este método hay varios estudios en los que se especifican más detalles (192, 193) pero básicamente se trata de descomponer la onda en las frecuencias arriba descritas para ver las variaciones que pueda haber entre controles y pacientes. La energía de cada decomposición con DWT fue medida por la densidad dentro del espectro de potencias (PSD) medidas en decibelios por hertzio (dB/Hz) utilizando el método no paramétrico de Welch (194). Los promedios de cada estímulo representan la energía estacionaria y no estacionaria después del estímulo, siendo mejor medida que la actividad determinada a lo largo del tiempo en el MMN. Las medidas registradas con la DWT se puntuaron con algoritmos automáticos con Matlab evitando puntuar manualmente los mismos.

7.2.5.- Muestras de fluidos corporales (biomarcadores de metabolismo oxidativo)

Los participantes siguieron las premisas de no hacer un ejercicio físico moderado-severo durante las 24 horas anteriores. También realizaron ayuno desde la

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

medianoche anterior y se abstuvieron de fumar durante la mañana del día en el que se realizó la extracción venosa y la recogida de orina. Dicha recogida de muestras se realizó por personal entrenado, usando aguja en alas de mariposa para la sangre y entre las 8:30 AM y las 10:30 AM.

Todo el procedimiento de extracción, pre-procesamiento y almacenamiento para posterior análisis fue realizado por personal adiestrado previamente. Siguió el mismo manual de procedimiento estándar para estas medidas y otros biomarcadores pertenecientes a los comparadores a estudio: Glutación, TBARS e Isoprostanos.

Para más detalle en el **Anexo 3** se encuentran las instrucciones que se siguieron durante todo este proceso.

GLUTATIÓN:

Para el cálculo del glutación oxidado o GSSG pre-procesamos parte de las muestras con un derivado de piridina justo después de la extracción de sangre [este rescatador redox evita inconvenientes de otros comparadores tales como una tasa de reacción indeseablemente lenta o una elevada reactividad (195, 196)]. Las pruebas procesadas y no procesadas fueron inmediatamente guardadas en un congelador por debajo -75 grados centígrados en la misma habitación de la extracción. La razón de esto es el evitar unos resultados artefactados por la temperatura ambiente y la consecuente lisis celular. Por esa misma razón fueron enviados a los laboratorios de Oxford

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

Biomedicals [Oxford (MI) 48371. Estados Unidos] en un contenedor con hielo seco aislado de la temperatura exterior.

Los niveles de GSSG y GSH son proporcionales a la tasa de reacción enzimática a lo largo del tiempo, tanto en muestras procesadas como no procesadas. Para ello empleamos Cromatografía líquida Ultravioleta de alta resolución (Oxford Biomedicals, Rochester Hills. MI, USA) utilizando reactante de Ellman (Ácido 5-5'ditiobis-2-nitrobenzoico) mientras que las tasas fueron calculadas mediante análisis de regresión lineal (197). Todas las muestras fueron medidas en una misma tanda de modo que el personal que realizó las mismas marcó los valores de glutatión sin conocer la identidad del participante al que pertenecía.

Teniendo en cuenta que la forma predominante es GSH (28), GSSG tiene un significado biológico mayor cuando es expresado como porcentaje (GSSG%). Este GSSG% fue utilizado como medida primaria para GSSG.

TBARS:

La medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el plasma se hizo mediante métodos colorimétricos. Nuestro objetivo fue obtener los niveles de TBARS en plasma y para ello después de la extracción las muestras de sangre se centrifugaron a 4 ° C, 2.000 rpm, durante 10 minutos en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Así se obtuvo el plasma que fue pipeteado de la muestra para un almacenamiento posterior. Todo este proceso se llevó a cabo en las salas de la extracciones sanguíneas del centro realizando un almacenamiento inmediato

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

a temperaturas inferiores -75°C para evitar una fotoxidación durante el posterior envío al laboratorio donde se hizo el ensayo colorimétrico.

Dicho ensayo realizado en los laboratorios Oxford Biomedicals: se basa en la reacción de un reactivo cromogénico, el ácido 2 - tiobarbitúrico, con el ácido malondialdehído (o MDA, producto final de la peroxidación lipídica) a una temperatura de 25°C . El proceso consiste en que una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de ácido 2 - tiobarbitúrico a través de una condensación de tipo Knoevenagel para producir un cromóforo con la máxima absorbancia a 532 nm. Las concentraciones se calcularon mediante análisis de regresión lineal basado en la densidad óptica.

ISOPROSTANOS (IPs):

Las muestras se almacenaron en un tubo de orina con conservante a -80°C para la medición posterior. El laboratorio de Oxford Biomedicals utilizó el kit de Isoprostanos para el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). En particular se determinaron los niveles de 15 - F2T - isoprostanos (15F2t - IP) en la orina después de estos pasos:

1 - . Las muestras de orina se mezclan con un tampón de dilución mejorada que elimina esencialmente la interferencia debida a uniones no específicas.

2 - . Los 15F2t - IPs de las muestras compiten con un compuesto que es la misma molécula conjugada con la peroxidasa del rábano (15F2t - IP - HRP) para la

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

unión a un anticuerpo policlonal específico para 15F2t - IPs con la que está recubierta la microplaca.

3 – Los resultados de la actividad de la enzima HRP se ven por el color que aparece en la placa cuando se une al sustrato de forma que la intensidad del color es:

- Directamente proporcional a la molécula competidora (15F2t - IPs - HRP).
- Inversamente proporcional a la cantidad de Isoprostanos (en este caso el tipo 15F - 2T - IPs).

CREATININA:

De forma análoga el mismo laboratorio realizó un ensayo colorimétrico para el análisis cuantitativo de creatinina. Se midieron los niveles de creatinina en la orina en conjunción con los IP para normalizar la tasa de excreción de analitos.

Se realizó pues un ensayo colorimétrico para el análisis cuantitativo de los niveles de creatinina en la orina de forma que el método que se utilizó para obtener las concentraciones fue el siguiente: el metabolito de la creatinina urinaria reacciona con ácido pícrico en condiciones alcalinas para producir un color naranja que puede ser cuantificado por espectrometría de absorción a cerca de 500 nm de longitud de onda.

Hay que considerar que la reacción descrita se produce de forma no específica con otros componentes presentes en fluidos biológicos también (198) por lo que en este estudio se analizó la diferencia de la medición antes y después de la adición del ácido

ya que refleja el valor de la creatinina (199). Esto nos permite calcular el valor final de la creatinina que se obtiene por la diferencia entre la absorción de la primera (condiciones alcalinas) a la segunda lectura (condiciones ácidas).

7.3.- Diseño del estudio y análisis de datos

Se trata de dos estudios de casos y controles observacionales y transversales en el que los casos son pacientes diagnosticados de SZ y los controles son sujetos sanos:

- Estudio 1: Se pretende ver como un balance alterado en el estrés oxidativo (midiendo los niveles de glutatión reducido y oxidado) se relaciona por una actividad eléctrica cerebral anormal en la SZ, y cómo la misma contribuye como predictor intermedio (PIT) del glutatión a la sintomatología clínica de la SZ. Además, se trata de ver si las anomalías en la actividad cerebral medidas con MMN se relacionan de forma específica con una alteración oxidativa del glutatión o también si existe una relación con biomarcadores que reflejan trastornos en la peroxidación lipídica.
- Estudio 2: En segundo lugar hemos realizado un estudio en el que se pretenden analizar la influencia que diversos factores exógenos como la dieta, el tabaco o la medicación antipsicótica puedan tener sobre dicho estrés oxidativo en la SZ.

Estudio 1:

“Parámetros electrofisiológicos como marcadores intermedios entre el estrés oxidativo y la clínica en la Esquizofrenia”

Respecto al análisis estadístico de los datos de cara a contestar la hipótesis principal seguimos las siguientes premisas:

El test de ANOVA se utilizó para estudiar las diferencias entre pacientes y controles en variables simples dependientes. El test de U de Mann-Whitney fue utilizado para cuando los datos no siguieran una distribución normal.

Para las múltiples frecuencias oscilatorias registradas en el EEG se utilizó ANOVA de medidas repetidas para comparaciones de grupo donde las 6 bandas de frecuencia y los 2 tipos de estímulos (standard y desviado) eran las medidas repetidas. Se aplicó la corrección Greenhouse-Geisser (para corregir los grados de libertad en los que la muestra puede variar) y se realizaron tests post-hoc si los pacientes o los controles eran significativamente diferentes en cada Banda de frecuencia/tipo de estímulo. La corrección de Bonferroni se aplicó en los casos de comparaciones múltiples. Las correlaciones se realizaron con test Z para 2 muestras y el Test de Spearman. Para controlar comparaciones múltiples, los análisis de correlación sólo se realizaron si las variables se asociaban significativamente a SZ. Todos los tests fueron a dos colas (en las dos direcciones).

Se hicieron tests en referencia a la contribución de las distintas bandas de frecuencia a la MMN usándose regresión logística escalonada o “Stepwise Regression” (es uno de los modelos de regresión en el que se lleva a cabo la elección de variables

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

predictoras por un procedimiento automático). Para saber la contribución de los niveles de GSH y GSSG sobre los síntomas clínicos y la función de los sujetos se realizaron regresiones lineales donde la escala clínica fue la variable dependiente y el GSH y GSSG los predictores. GSSG se utilizó en vez de %GSSG en este análisis para maximizar la independencia entre los 2 predictores.

Para testar si las medidas electrofisiológicas fueron los marcadores intermedios entre estrés oxidativo y los valores clínicos, se realizó análisis de mediación multivariante (200, 201). La medida objetivo son los parámetros clínicos, los niveles de GSH y GSSG son los predictores independientes y la MMN más las 6 bandas de frecuencias son los PIT. La significancia estadística para cada PIT se estableció por intervalos de confianza por el método “bootstrapped” de 95% con 5000 iteraciones. Para reducir los errores tipo I, este análisis fue restringido sólo para aquellas medidas clínicas que fueron directa y significativamente relacionadas con el estrés oxidativo.

Estudio 2:

“No evidencia de un origen exógeno de la alteración en el balance oxidativo en la Esquizofrenia”

El test de ANOVA se utilizó para evaluar las diferencias entre controles y pacientes en IP, TBARS, GSH, GSSG y GSSG%. El test de análisis de varianza factorial se utilizó para examinar la interacción el consumo de tabaco/grupo paciente-control sobre las medidas de IP, TBARS, GSH y GSSG. Se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov “goodness to fit” (o bondad de ajuste). El test de Mann-Whitney U se utilizó cuando los datos no seguían una distribución normal. Las correlaciones se realizaron mediante pruebas de Spearman.

Las contribuciones del GSH y GSSG a los síntomas clínicos y la función social de los pacientes fueron evaluadas por regresión lineal donde la evaluación clínica fue la variable dependiente y GSH/GSSG fueron predictores. Sólo la concentración de GSSG se utilizó en lugar de GSSG% en el análisis de regresión y fue para maximizar la independencia de los dos predictores. Todas las pruebas fueron a dos colas (en las dos direcciones).

7.- MATERIAL Y MÉTODOS



8.- RESULTADOS



8.1.- Niveles de GSH/%GSSG, IPs y TBARS

Los niveles en sangre de GSH fueron significativamente más bajos en los pacientes con SZ comparados con los controles ($p < 0.001$) (**Figura 1A**). Los niveles en ayuno de GSSG fueron también significativamente más altos en los pacientes versus controles: los pacientes tuvieron 5 veces más GSSG% en relación a los controles ($p = 0.023$) (**Figura 1B**). El %GSSG de los pacientes también demostró una alta varianza ya que tres pacientes tuvieron un GSSG% superior al 50% porque tuvieron valores de GSH cercanos a cero. Pese a ello la diferencia permaneció significativa ($p = 0.027$) incluso quitando los casos extremos de forma que los pacientes tuvieron niveles de GSSG% casi 2 veces superiores comparados con los controles (**Figura 1C**).

Las concentraciones de GSH y la de GSSG no se correlacionaron significativamente en controles ($r = 0.03$, $p = 0.90$) o pacientes ($r = -0.09$, $p = 0.66$). Por otro lado, la edad no se asoció con los niveles de GSH ni en pacientes ni controles ($r = -0.21$, $p = 0.27$ y $r = -0.26$, $p = 0.21$, respectivamente).

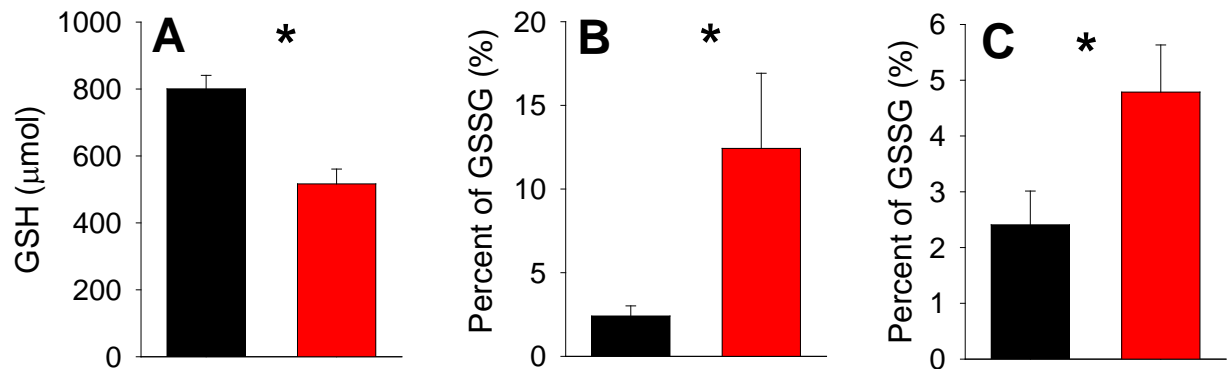


Figura 1.- (A) La forma reducida de glutatión (GSH) en pacientes con SZ (barra roja) fue significativamente baja comparada con los controles (barra negra) (* $p < 0.001$). (B) El porcentaje de la forma oxidada de glutatión [percent of GSSG (%)] estuvo significativamente incrementado en el grupo de SZ con respecto al grupo control (* $p = 0.023$). Encontramos una amplia varianza en los pacientes debido a un porcentaje de GSSG superior a 50% en 3 pacientes. (C) Sin embargo, incluso después de quitar estos 3 pacientes con valores extremadamente altos de %GSSG, los pacientes mantuvieron resultados estadísticamente significativos respecto a controles (* $p = 0.027$).

Los niveles de TBARS medidos en forma de MDA en plasma no fueron significativamente distintos en los pacientes comparado con los controles (p mayor de 0.50) con valores medios más altos en los segundos (2.94 ± 4.36) que en los primeros (1.59 ± 1.65). Tampoco lo fueron los IPs ($p = 0.12$) pero en este caso a modo de tendencia vemos que los valores medios de IPs son mayores en pacientes (3.53 ± 2.04) que en controles (2.78 ± 1.70). Aquí tampoco la edad se asocia con los niveles de IPs y TBARS en pacientes o controles (siempre valores en todos los análisis correspondientes $p > 0.05$). Para comparativa entre los 3 biomarcadores ver **Tabla 3**.

Biomarcador	Controles	Paciente	Valor	Valor
oxidativo	N = 25	N = 29	Z	P
GSH (μmol)	800.50±201.73	516.50±238.40	-4.07	<0.001*
GSSG (μmol)	19.96±24.82	27.94±23.19	-1.50	0.13
%GSSG	2.40±3.02	12.43±24.18	-2.28	0.023*
TBARS (μmol)	2.94±4.36	1.59±1.65	-0.56	>0.50
Isoprostanos ^a	2.78±1.70	3.53±2.04	-1.55	0.12

Tabla 3. Concentraciones de los distintos biomarcadores en fluidos corporales. Marcados con (*) si hay diferencias significativas (en GSH y GSSG%). Obsérvese que otros dos marcadores oxidativos (GSSG e Isoprostanos) tienen una tendencia no significativa con mayores concentraciones en el grupo de pacientes.

^a Concentración de IPs en ng/mL ajustados a valores de creatinina (en mg) en orina.

8.2.- Resultados del estudio 1: "Biomarcadores Electrofisiológicos Intermedios del estrés oxidativo en Esquizofrenia"

8.2.1.- MMN y su correlación con niveles de GSH/%GSSG y sus comparadores (IPs y TBARS)

Después de realizar (con valores a dos colas) los Z tests, podemos rechazar la hipótesis nula que afirma que la amplitud de la MMN, GSH y %GSSG fueran iguales en controles y pacientes ($Z=2.44$, $p=0.01$; $Z=-4.74$, $p<0.01$; $Z=2.21$, $p=0.03$

8.- RESULTADOS

respectivamente). En cambio, no podemos decir esto en la latencia de MMN ($Z=-1.05$, $p=0.29$), para IP ($Z=1.47$, $p=0.14$) y para TBARS ($Z=1.43$, $p=0.15$).

La amplitud de MMN se encontraba significativamente reducida en los pacientes con SZ comparado con los controles ($F=6.33$, $p=0.015$, **Figura 2**). La latencia de MMN no fue estadísticamente significativa entre grupos (183.2 ± 25.8 ms vs. 175.0 ± 31.5 ms, respectivamente, $F=1.07$, $p=0.31$).

La amplitud de MMN (valor absoluto) y los niveles de GSH se correlacionaron significativamente en los controles (Spearman's $\rho=0.45$, $n=25$, $p=0.024$; **Figura 3**). Esta correlación no fue significativa en pacientes ($\rho=0.05$, $n=29$, $p=0.79$). % GSSG no se correlacionó en ningún caso significativamente en ningún grupo con los parámetros de MMN en ambos grupos (todos los resultados $p>0.31$).

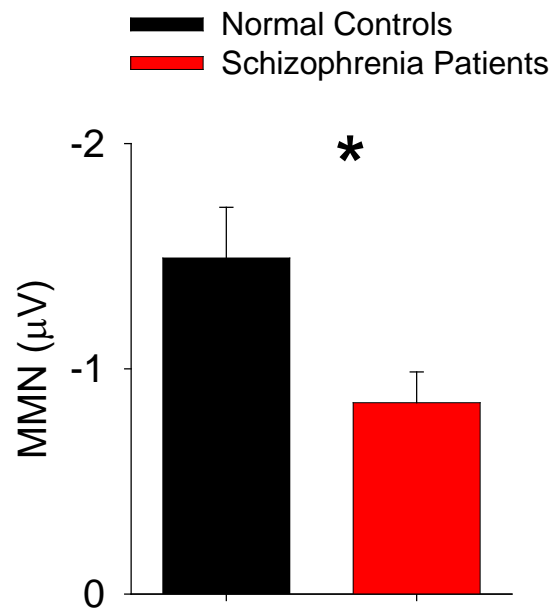


Figura 2.- Amplitud de la Mismatch Negativity (MMN) medido en microvoltios. * (diferencias estadísticamente significativas). Columna en negro grupo de controles sanos (Normal Controls) y en rojo pacientes diagnosticados de SZ (Schizophrenia Patients). La amplitud de la MMN en SZ está reducida comparada con controles sanos (* $p=0.015$).

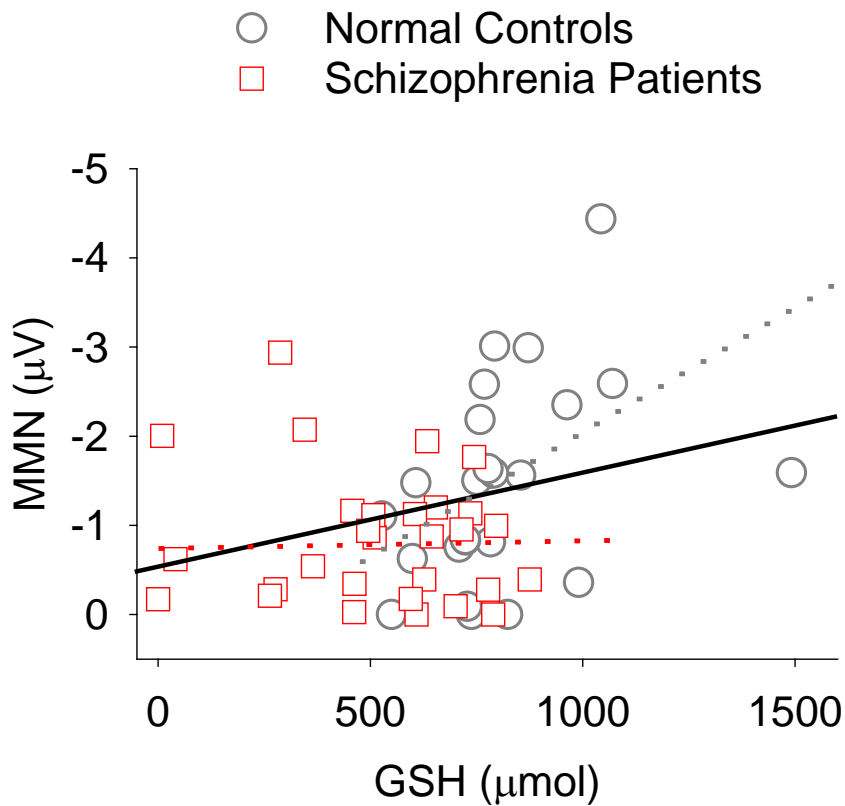


Figura 3.- En el eje de las ordenadas se muestra la amplitud del Mismatch Negativity (MMN) medido en microvoltios. En el eje de abcisas la concentración de GSH medido en micromoles. Círculos y línea de puntos en gris representa el grupo de controles sanos (Normal Controls) arrojando su correlación resultados estadísticamente significativos (Spearman's rho=-0.45, p=0.024). Los cuadrados y línea de puntos en rojo representan pacientes diagnosticados de SZ (Schizophrenia Patients) con una correlación no estadísticamente significativa (Spearman's rho=0.04, p=0.85). Línea continua negra representa el total de la muestra.

En el caso de los TBARS medidos en MDA en plasma en controles se correlacionó con la latencia de la MMN de forma negativa y significativa con una fuerza moderada (Rho de Spearman= -0.446, p=0.03) pero no para la amplitud (Rho de Spearman=-0.11, p=0.63). En el grupo de los pacientes ninguno de estos análisis estadísticos arrojó correlaciones con significación estadística (Rho de Spearman

siempre $p > 0.05$). En el caso de los IPs en orina no hubo correlación significativa con la amplitud de la MMN o su latencia en controles ni tampoco en pacientes (Utilizando Rho de Spearman siempre con valores de $p > 0.05$).

8.2.2.- Correlaciones de bandas de frecuencia de actividad neuronal respecto GSH y %GSSG

El análisis “single-trial response” demostró resultados significativos en las interacciones estímulo x grupo ($F_{(1.0, 5.7)} = 7.50$, $p = 0.008$) y frecuencia x grupo ($F_{(1.9, 22.6)} = 3.14$, $p = 0.050$) pero no fue significativo el efecto grupo ($p = 0.089$) o interacciones a 3 bandas ($p = 0.48$). Post-hoc tests mostraron que los pacientes diagnosticados de SZ tenían fuerza reducida en las siguientes frecuencias comparados con los controles:

1) 41-85 Hz de la banda gamma en el standard ($p < 0.001$) y el estímulo desviado ($p < 0.001$).

2) 21-40 Hz de la banda gamma en estímulos standard ($p < 0.001$) y desviados ($p < 0.001$).

Estos resultados siguieron siendo estadísticamente significativos incluso después de la corrección de Bonferroni (el umbral de significancia estadística fue de $p = 0.004$ por una $n = 12$ en comparaciones siendo así al darse 6 bandas x 2 tipos de estímulo) (**Figura 4**).

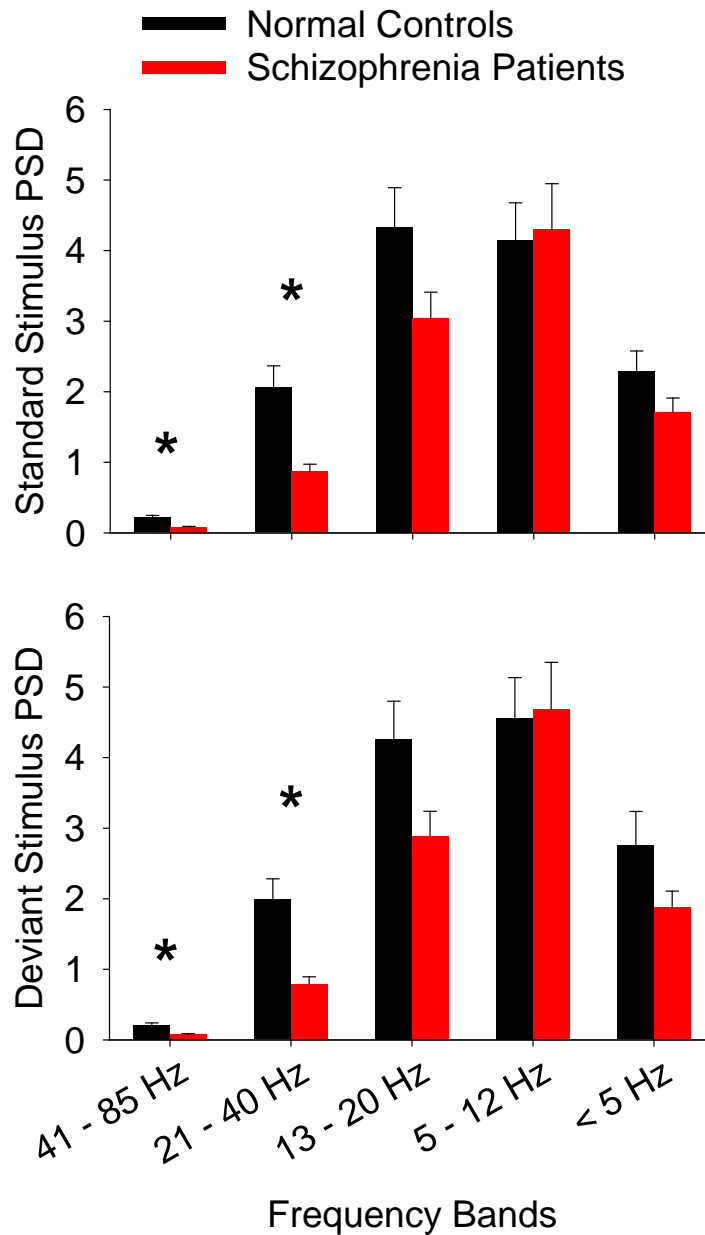


Figura 4.- Figura de bandas de frecuencia (Frequency Bands). Valores en las frecuencias durante los estímulos estándar en la figura superior (Standard Stimulus PSD) y estímulos desviados en la inferior (Deviant Stimulus PSD). (*) refleja significancia estadística tras corrección de Bonferroni. PSD es el acrónimo de “Power Spectrum Density” siendo la medida de fuerza de las bandas de frecuencia en relación a los estímulos. Columnas en negro reflejan los controles sanos (Normal Controls) y en rojo a los pacientes (Schizophrenia Patients). Los pacientes mostraron una significativa banda gamma reducida respecto a los rangos 21-40 Hz y 41-85 Hz en respuesta a ambos tipos de estímulos.

De esas respuestas significativas, los niveles de GSH se correlacionaron con las diferentes bandas de la siguiente forma:

a) En el grupo de pacientes diagnosticados de SZ: La banda 41-85 Hz durante los estímulos estándar ($\rho=0.42$, $n=29$, $p=0.025$) y desviado ($\rho=0.40$, $p=0.032$) correlacionó significativamente con los niveles de GSH. También la banda de 21-40 Hz correlacionó en estímulos estándar ($\rho=0.59$, $p=0.001$) y desviado ($\rho=0.50$, $p=0.005$).

b) En el grupo de controles sanos: GSH correlacionó significativamente solo con la banda de 41-85 Hz en la respuesta del estímulo desviado ($\rho=0.41$, $n=25$, $p=0.042$), aunque todas las correlaciones fueron en la dirección positiva.

Después de la corrección de Bonferroni de las 8 correlaciones (4 respuestas x 2 grupos, $p=0.05/8=0.006$) las correlaciones entre GSH y 21-40 Hz se mantuvieron significativas en pacientes tanto para estímulo standard (0.005) como desviado ($p=0.001$). Las correlaciones entre GSH y 21-40 Hz respecto al tono desviado están ilustradas en la **Figura 5**.

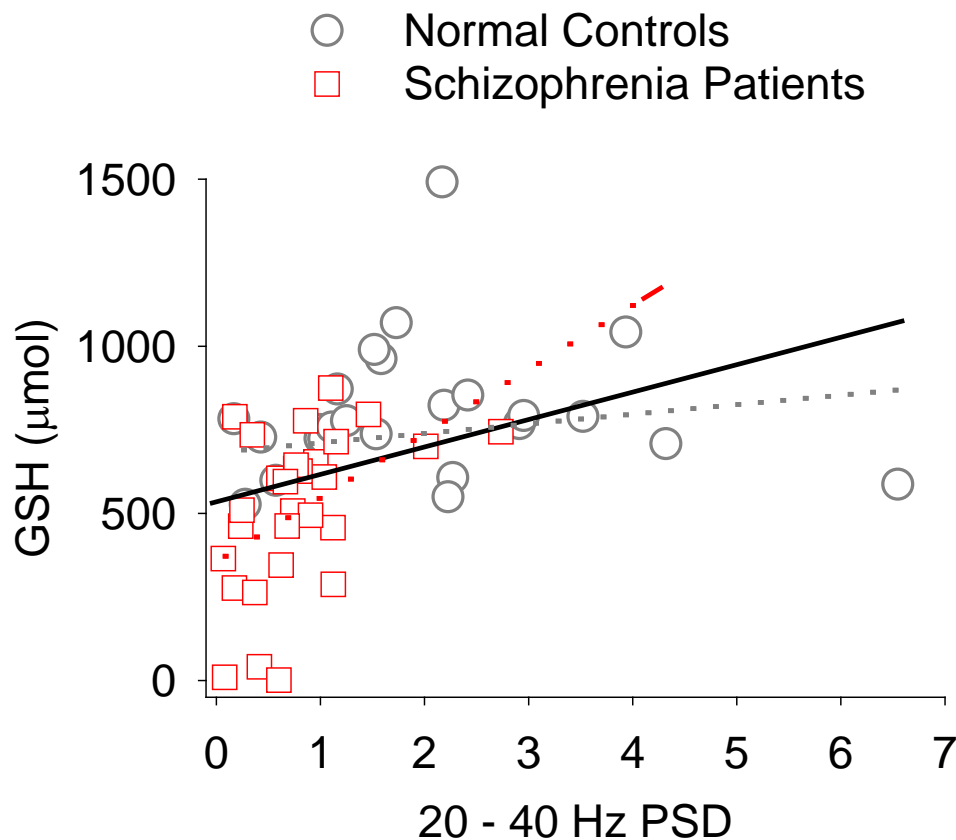


Figura 5.- En eje de ordenadas concentración de GSH medido en micromoles. En eje de abcisas banda de frecuencias 20 – 40 Hz (microvoltios). Líneas de puntos y cuadrados en rojo representa los pacientes diagnosticados de Esquizofrenia (Schizophrenia Patients). Se observó una correlación estadísticamente significativa entre los valores de GSH y las respuestas en la banda de 21-40 Hz en los pacientes ($\rho=0.50$, $p=0.005$). Dicha relación no se observó en el otro grupo representado por círculos y línea de puntos en gris grupo (Controles sanos o “Normal Controls”). Línea negra continua representa el total de la muestra. PSD: “power spectrum density”.

La correlación parcial con la dosis diaria de CPZ equivalente de los antipsicóticos en pacientes mostró que la correlación entre GSH y 20-40 Hz en la banda gamma fue similar ($r=0.56$).

La correlación del %GSSG con la banda gamma no fue estadísticamente significativa aunque todos los valores de las correlaciones fueron en la dirección inversa.

8.2.3.- Relación de la Mismatch Negativity (MMN) y las bandas de frecuencia de actividad cerebral

Se realizó una regresión logística escalonada donde MMN fue la medida dependiente y las 12 respuestas (6 bandas de frecuencia x 2 tipos de estímulos) fueron los predictores.

En controles, la banda gamma en la frecuencia de 41-85 Hz contribuyó de forma significativa a la amplitud de la MMN tanto para los tonos estándar ($F_{(1, 23)}=6.04$, $\Delta R^2=20.8\%$, $p=0.022$) como desviados ($F_{(1, 23)}=6.03$, $\Delta R^2=20.8\%$, $p=0.022$). Ninguna de las otras frecuencias fue estadísticamente significativa. En pacientes, ninguna de las frecuencias fue estadísticamente significativa respecto a la contribución a la MMN.

8.2.4.- Glutación y parámetros clínicos

En el análisis de regresión del GSH y el GSSG, las contribuciones de estas medidas respecto las puntuaciones totales de la BPRS en pacientes arrojaron resultados no estadísticamente significativos ($F_{(2, 26)}=0.30$, $p=0.74$). Por el contrario, el análisis de regresión del GSH y el GSSG respecto a la escala UPSA-2 mostró resultados significativos utilizando a todos los sujetos ($F_{(2, 49)}=4.36$, $\Delta R^2=15.1\%$, $p=0.018$) con aceptables estadísticos de co-linearidad ($VIF=1.02$). Los niveles de GSH contribuyeron significativamente con una función superior ($t=2.08$, $\Delta R^2=8.0\%$, $p=0.045$) mientras que

los niveles de GSSG contribuyeron significativamente con una función más baja ($t=2.22$, $\Delta R^2=7.1\%$, $p=0.031$).

8.2.5.- Marcadores intermedios en relación con el estrés oxidativo y las funciones clínicas

El efecto indirecto de la MMN como un predictor intermedio (PIT) de los efectos significativos del GSH y GSSG sobre los valores de la UPSA-2 fue testado con un modelo de mediación multivariante. Se utilizó el total de los sujetos de la muestra debido al bajo valor de nuestra “n” mostrando que:

- El efecto indirecto de la MMN como PIT de GSH para los valores de la UPSA-2 no fue estadísticamente significativo (95% CI=-0.0031 to 0.0048).
- Tampoco lo fueron para los valores de GSSG (-0.015 to 0.016).

Respecto al estudio de las bandas de frecuencias como PIT se estudiaron para los estímulos estándar y desviados de forma separada siendo altamente correlacionadas en sus respectivas frecuencias:

- Para tonos estándar la frecuencia de 20-40 Hz medió de forma significativa entre GSH y las puntuaciones de la UPSA-2 (95% CI= 0.0015 - 0.040) (línea roja de puntos representada en el modelo de PIT ilustrado en **Figura 6**). Ninguna de las otras frecuencias mostró resultados estadísticamente significativos (líneas negras de puntos).

- Realizando el mismo modelo de estudio estadístico en las respuestas al estímulo desviado se vió un efecto similar (no ilustrado): sólo la frecuencia de 20-40 Hz medió de forma significativa entre GSH y UPSA-2 (95% CI=0.002 - 0.053).

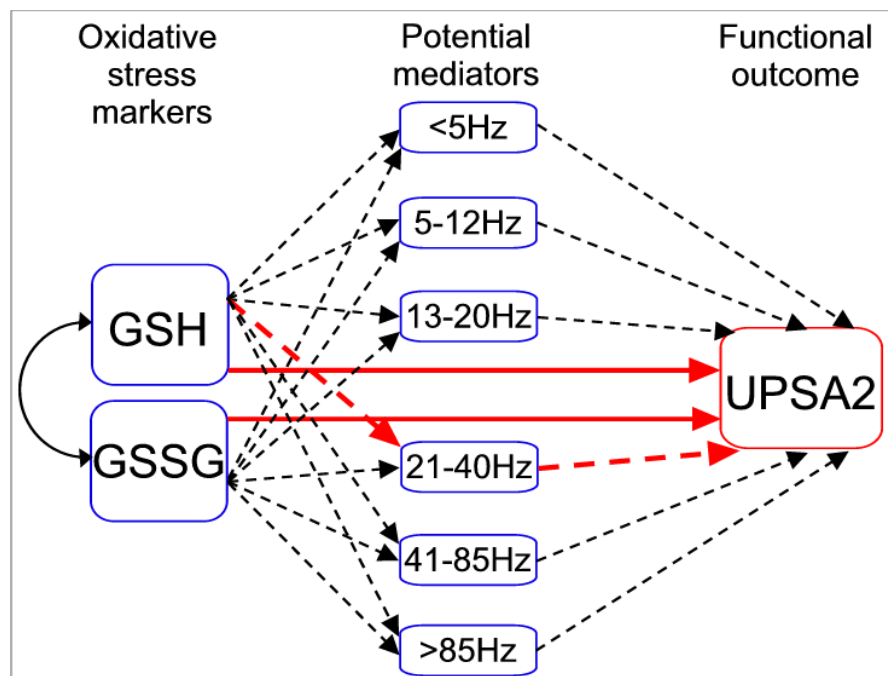


Figura 6.- Modelo de mediación multivariante de las bandas de frecuencias como Predictor Intermedio (Potential Mediators) de los marcadores de estrés oxidativo (Oxidative Stress Markers) sobre el funcionamiento clínico del total de los sujetos medido con la escala UPSA - 2 (Functional Outcome). Líneas continuas en rojo representan resultados directos y estadísticamente significativos (del GSH y GSSG sobre los valores UPSA – 2). Las líneas de puntos representan que el modelo de mediación se realizó para medir efectos indirectos. Las líneas de punteado negro representan resultados no significativos en la mediación del efecto (como PIT). Las líneas de punteado rojo indican un efecto significativo mediado por el PIT entre el estrés oxidativo y el valor de la escala UPSA – 2. Este modelo demuestra que la banda de 21-40 Hz durante una secuencia de estímulos

auditivos fue un marcador intermedio significativo entre el valor de GSH y el funcionamiento clínico medido por la escala UPSA – 2.

8.3.- Resultados del estudio 2: “No hay evidencia de un origen exógeno de la alteración en el balance oxidativo en Esquizofrenia”

8.3.1.- Capacidad Total Antioxidante en la dieta (TAC)

Basándonos en el Cuestionario sobre la ingesta de antioxidantes encontramos que el promedio de TAC presente en la dieta de los pacientes no fue menor que la de los controles. Por el contrario, hemos encontrado en la dieta de los pacientes una cantidad significativamente superior de TAC comparada con controles ($p=0.02$) (**Tabla 4**). Mirando ítem por ítem de alimentos solo la categoría de zumos de fruta mostró diferencias significativas entre grupos de forma que en este caso los pacientes tienen un aporte mayor de TAC de los zumos de fruta que los controles ($p=0.04$). Ninguna de las comparaciones mantuvo resultados estadísticamente significativos después de las correcciones de Bonferroni por comparaciones múltiples.

En controles, la cantidad total de TAC en la dieta mostró una positiva (pero no significativa desde el punto de vista estadístico) correlación con GSH ($r=0.34$, $p=0.10$) y una negativa, pero no significativa correlación con %GSSG ($r=-0.29$, $p=0.16$). En los pacientes, las correlaciones entre TAC, GSH ($r=-0.10$, $p=0.61$) y %GSSG ($r=0.21$, $p=0.28$) fueron no significativas. Estos hallazgos muestran una tendencia en el que el TAC de la dieta con mayores concentraciones de GSH y menores de GSSG en

8.- RESULTADOS

controles, aunque como hemos dicho sólo a nivel de tendencia (no significativa). Esta tendencia que fue menos clara en pacientes.

En lo que respecta los marcadores comparadores, la cantidad total de TAC en la dieta tuvo correlaciones negativas pero con unos valores “p” que distaban bastante de la significancia estadística en controles ($r = -0.16$, $p = 0.45$ para IP y $r = -0.01$, $p = 0.95$ para TBARS). En el caso de los pacientes las correlaciones de IP/TBARS vs TAC ingerido en la dieta fueron positivas y no significativas ($r = 0.04$, $p = 0.83$ y $r = 0.02$, $p = 0.93$ respectivamente).

Items de distintos tipos de alimentos	Capacidad Total Antioxidante/semana (μmol FRAP/semana)		F	P
	Controles Sanos ^a (N=25)	Pacientes diagnosticados de Esquizofrenia ^a (N=29)		
Fruta	2582.73 \pm 469.88	3223.63 \pm 478.62	0.9	0.35
Verduras	2711.62 \pm 352.15	2515.71 \pm 304.14	0.18	0.67
Vino	212.5351 \pm 58.30	215.94 \pm 103.05	0.01	0.98
Zumos	4606.69 \pm 915.68	8362.29 \pm 858.01	8.945	0.04*
Grupo "Nut products"	2120.48 \pm 513.29	2307.85 \pm 597.07	0.06	0.82
Frutos secos	635.58 \pm 170.39	934.67 \pm 333.70	0.58	0.45
Pan	2334.96 \pm 363.07	2265.72 \pm 355.43	0.02	0.89
Cereales	900.57 \pm 186.57	1368.37 \pm 221.83	2.51	0.12
Chocolate soluble	704.49 \pm 272.54	1735.19 \pm 661.96	1.86	0.18
Chocolate con leche	197.31 \pm 46.18	283.50 \pm 68.66	1.02	0.32
Total	22 580.72 \pm 2124.20	24 307.89 \pm 2204.54	5.78	0.02*

Tabla 4. Capacidad Antioxidante Total (TAC) semanal por cada alimento o categoría de alimentos basado en el Cuestionario de ingesta de antioxidantes.^a Valores proporcionados son media \pm desviación estándar (sd).

8.3.2.- Glutación, TBARS, IPs y la medicación antipsicótica

Las correlaciones entre las dosis de los antipsicóticos (medidos en equivalentes de CPZ), GSH y GSSG fueron no significativas (teniendo $n=29$, todos $p > 0.20$) al igual que la correlación entre los equivalentes de CPZ con los otros dos comparadores de estrés oxidativo: TB y TBARS ($r=-0.28$, $p=0.16$ para $n=27$ y $r=0.01$, $p=0.98$ para $n=29$ respectivamente).

Para un análisis más detallado hemos estudiado las diferencias de concentración de glutación separando los pacientes en un primer subgrupo de pacientes tratados con clozapina (denominado subgrupo clozapina) y un segundo subgrupo de pacientes tratados con otros antipsicóticos (subgrupo otros antipsicóticos). Encontramos unos niveles más bajos de GSH en el “subgrupo clozapina” (559.2 ± 238.3) ($p = 0.005$) y también en el “subgrupo otros antipsicóticos” (486.4 ± 241.0) ($p<0.001$) en una comparación con el grupo control (800.5 ± 201.7).

Por tanto la diferencia en las concentraciones de GSH sobrevive al estudiarla a nivel de subgrupos. En el caso del %GSSG vimos que estuvo aumentado en el “subgrupo clozapina” ($10.6\pm 23.6\%$) y el “subgrupo otros antipsicóticos” ($13.7\pm 25.3\%$) comparados con controles ($2.4\pm 3.0\%$) aunque estos resultados no son estadísticamente significativos ($p=0.051$ y 0.20).

En el caso del comparador de los IPs hubo una tendencia de mayor concentración en el “subgrupo otros antipsicóticos” (3.88 ± 2.44) comparados con los controles (2.78 ± 1.70) pero a nivel no estadísticamente significativo ($p=0.10$). A nivel del “subgrupo clozapina” los resultados fueron no significativos (3.03 ± 1.19) y una p

8.- RESULTADOS

mucho más lejos del límite estadístico significativo (superior a 0.5). Respecto a los TBARS no hubo datos significativos al comparar controles vs “subgrupo otros antipsicóticos” ($p=0.67$) y tampoco con la comparación controles vs “subgrupo clozapina” ($p=0.43$).

Estudiando de forma particular la dosis de clozapina vemos que no se correlaciona la misma de forma significativa con los niveles de GSH ($r=0.01$, $p=0.97$), pero sí significativa e inversamente con los valores de %GSSG ($r=-0.65$, $n=12$, $p=0.02$) de forma que a mayor dosis de clozapina, menor niveles de GSSG. Dicha correlación fue específica de este biomarcador pues tanto para IP como TBARS mostraron resultados no significativos ($r=-0.02$, $p=0.95$ y $r=0.01$, $p=0.99$ respectivamente).

8.3.3.- Glutación, TBARS, IPs y el tabaco

GLUTACIÓN Y TABACO:

En nuestro estudio hubo una interacción significativa entre el hábito tabáquico y grupo diagnóstico respecto los niveles GSH ($p=0.026$). En cambio, no hubo diferencias entre las concentraciones de GSH de los fumadores y las de los no fumadores de toda la muestra (651.5 ± 329.8 vs. 646.6 ± 236.6 , respectivamente, $p=0.93$). Tampoco la hubo tomando sólo a los pacientes (417.3 ± 121.5 vs. 554.3 ± 262.6 , respectivamente, $p=0.17$) aunque la diferencia sí se acercó al límite de significancia estadística en controles de forma que en ellos “fumar” se asociaba a una tendencia no significativa de mayores concentraciones de GSH (fumadores: 919.0 ± 282.8 vs. no fumadores: 754.4 ± 145.6 , $p=0.06$). La interacción significativa fue debida a la mencionada tendencia de los altos niveles de GSH en controles fumadores unido a unos bajos niveles de GSH en pacientes

fumadores comparados, en ambos casos, con los respectivos participantes no fumadores.

No hubo una interacción hábito tabáquico x grupo diagnóstico sobre %GSSG ($p=0.38$). %GSSG no fue estadísticamente significativamente diferente entre fumadores y no fumadores en una muestra combinada ($p=0.42$), aquella comprendida sólo por controles ($p=0.62$), o pacientes ($p=0.38$). Los 3 pacientes con altos %GSSG fueron todos no fumadores.

Finalmente, no hubo correlaciones estadísticamente significativas entre el número de cigarrillos fumados al día y los niveles de GSH ($r=0.11$, $p=0.74$) o el %GSSG ($r=0.16$, $p=0.64$).

TBARS Y TABACO:

En lo que respecta a los TBARS en plasma, parece que no hay una interacción hábito tabáquico x grupo diagnóstico sobre este biomarcador ($p=0.24$). Los valores de TBARS no fueron estadísticamente diferentes entre los participantes fumadores y los no fumadores (0.91). Parece que tampoco diferencias fumadores vs no fumadores en controles o pacientes (valores “p” de 0.66 y 0.58 respectivamente).

ISOPROSTANOS Y TABACO:

En cuanto a los IPs recogidos en orina hay una interacción hábito tabáquico x grupo diagnóstico sobre las concentraciones de IPs ($p=0.01$). Los valores de IPs fueron estadísticamente diferentes entre los participantes fumadores y los no fumadores para los 54 participantes de la muestra ($p=0.02$) objetivándose valores medios menores en los

8.- RESULTADOS

no fumadores (2.80 ± 1.55) que en los fumadores (4.16 ± 2.41). Hubo diferencias significativas en los pacientes ($p = 0.01$) mostrando unos valores medios con una tendencia en la misma dirección (“no fumadores” = 2.79 ± 1.25 versus “fumadores” = 5.47 ± 2.52). Por el contrario no se observó esto en el grupo de controles: no hubo diferencias significativas en las concentraciones de IPs por el hecho de fumar o no ($p=0.67$) encontrando concentraciones medias de este comparador de 2.83 ± 1.90 en no fumadores y 2.66 ± 1.14 en fumadores.

9.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



En el presente trabajo doctoral se pretende estudiar el rol del metabolismo oxidativo en la SZ. Las alteraciones de los marcadores estudiados (glutación, TBARS e IPs) podrían explicar alteraciones electrofisiológicas habitualmente alteradas en pacientes con esta enfermedad. Actualmente se desconoce si esta alteración ocurre por factores endógenos durante el neurodesarrollo o por otro lado influyen factores presentes a lo largo de la vida del sujeto. Por ello, en segundo lugar estudiamos como el tabaco, medicación o la dieta pueden contribuir en las concentraciones del glutación o sus comparadores de peroxidación lipídica.

9.1.- Discusión

Con los datos recogidos en este trabajo hemos replicado la evidencia previa de que una alteración en el balance del glutación está presente en pacientes diagnosticados con SZ. Estos resultados son sobradamente consistentes con la creciente evidencia de que hay un claro estrés oxidativo en los pacientes con SZ. Así lo indican los datos de otros estudios donde arrojaron valores anormalmente reducidos de los niveles de GSH y en hallazgos que observan alteraciones en otras enzimas redox (29-32, 102). Nuestro estudio aporta nuevas evidencias de que el %GSSG está también claramente aumentado en pacientes con SZ, este parámetro no ha sido medido en otros estudios previos. Esto puede reflejar que hay una reducción total en el glutación disponible debido a una producción ineficiente o, alternativamente, a una excesiva demanda de las defensas antioxidativas.

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

No parece haber diferencias significativas entre pacientes y controles en lo que a las concentraciones de TBARS e IPs se refiere. No obstante, sí vimos una interesante tendencia específica de las concentraciones de los IPs de modo que eran más altas en pacientes que en controles.

Dicha tendencia sugerente de una excesiva peroxidación lipídica en los pacientes sólo cuantificable con IPs (y no con TBARS) puede ser explicada por lo siguiente: estudios previos plantean que los IPs en orina son marcadores más sensibles que los TBARS en plasma para estudiar la peroxidación lipídica cerebral en la SZ. La razón de ello es que el agente ácido tiobarbitúrico (con el que reaccionan los compuestos TBARS) puede reaccionar con metabolitos inespecíficos de la peroxidación además de aquellos que pretendemos medir (aquellos que aparecen fruto de la degradación de la membrana celular). Por el contrario los IPs sí son específicos de la peroxidación lipídica de la membrana neuronal (27). Por lo tanto parece lógico encontrar esta tendencia sólo en el marcador (IPs) que parece más específico para el objetivo de nuestro estudio.

9.1.1.- Discusión: Objetivos principales respecto al glutatión

(Estudio 1 “Parámetros electrofisiológicos como marcadores intermedios entre el estrés oxidativo y la clínica en la Esquizofrenia”).

En el primer lugar pretendíamos confirmar la hipótesis de que las bandas de frecuencia de la banda gamma y potenciales relacionados con eventos como el MMN (vinculado a procesos atencionales selectivos) median como PIT del glutatión respecto a la sintomatología clínica. Así, encontramos que en la SZ los pacientes hay una severa alteración en el balance en componentes redox tales como el GSH y el %GSSG. Se vió

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

también en nuestro estudio que quedaba significativamente reducida la potencia de la banda gamma para la franja de 28-85 Hz durante una secuencia de sonidos característicos para evocar la MMN (con el estímulo desviado con una mayor duración en el tiempo respecto a los estímulos estándar). A su vez la banda de frecuencias en esta franja correlacionó significativamente con los niveles de GSH en controles y en pacientes diagnosticados de SZ.

La fisiología de la sinápsis y de determinados tipos de neuronas es sensible al estrés oxidativo como en las interneuronas de parvalbúmina (PV) y los receptores NMDA (4, 66, 67, 88). Esto puede guardar cierta concordancia con nuestros resultados ya que los niveles bajos de GSH se correlacionaron particularmente con una reducción en la potencia del rango de frecuencias de 21-40 Hz (comprendida dentro del rango de la banda gamma). Esta banda se vincula con la actividad de las interneuronas de PV que a su vez se caracterizan por tasas de disparo rápidas conformando parte de circuitos que son responsables de esta actividad sincrónica gamma (202). Nuestro análisis así apoya la hipótesis de que el estrés oxidativo represente uno de los mecanismos subyacentes a la disfunción en la SZ de la banda gamma y las estructuras involucradas en su aparición.

A nivel de los PRE, encontramos que la amplitud del MMN y los valores de GSH estuvieron positiva y significativamente correlacionados (aunque sólo en controles sanos). Esto podría interpretarse como datos coherentes con la evidencia previa en la que tras aportar suplementos del precursor del glutatión (NAC) a pacientes con SZ se aumentó en ellos la amplitud del MMN. Además, el MMN es un marcador establecido de la integridad del receptor NMDA (142), el cual puede jugar un rol importante en el

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

modelo oxidativo y en la explicación de la clínica en la SZ. Ahondamos un poco más en esta estructura a continuación:

Habíamos mencionado que este receptor NMDA es una proteína sensible al balance redox preservado por el glutatión (66, 67) pero además recientemente se ha vinculado la integridad de este receptor a la presentación de la banda gamma con interesantes conclusiones en el correlato clínico:

Así, en un estudio de múridos con ratones “knocked out” en el receptor NMDA (presentes en interneuronas PV) se observó el hallazgo en estos últimos de anomalías en la conducta y déficits en la banda gamma (203). El que se encuentre este hallazgo precisamente en ratones con esta alteración en éstas interneuronas parece razonable puesto que, como hemos comentado anteriormente, estas células también se han asociado recientemente al estrés oxidativo (65, 204, 205).

Por tanto podemos teniendo en cuenta nuestros resultados y la evidencia actual podemos decir que:

- Un estrés oxidativo parece estar presente en los pacientes con SZ.
- Hay en él bajos niveles de GSH y elevados de GSSG% correlacionados con la banda gamma y el MMN.
- Esto apoya la propuesta de que una alteración en estos últimos pueden, en parte, ser consecuencia de mecanismos de estrés oxidativo.

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestro estudio también demostró que los niveles de GSH y GSSG se asociaron con el cuadro clínico de los pacientes con SZ de nuestra muestra. Así, valores alterados de GSH y GSSG se asoció a bajas puntuaciones de la escala UPSA de funcionamiento en la vida diaria. Esta es una escala validada en SZ en varios estudios (174-176) en la que se obtuvieron puntuaciones bajas en este tipo de pacientes (175, 176) de forma que sirve como un predictor potente del funcionamiento del paciente en la comunidad (206). Ahora bien, nos esto lleva a preguntarnos qué elementos fisiopatogénicos median entre clínica y estrés oxidativo. Esta pregunta es en parte respuesta por nuestro estudio y por otros recientes resultados:

- Valores altos de GSH predijeron en nuestro estudio altos valores en la escala UPSA mientras que altos valores de GSSG predijeron valores bajos de la escala UPSA sugiriendo que un anormal balance oxidativo pudiera ser perjudicial en este aspecto. Modelos de mediación utilizados apoyaron la hipótesis de que la banda gamma en la franja de 21-40 Hz como respuesta a secuencia de estímulos auditivos del paradigma del MMN actuó como un predictor intermedio modulador de la relación entre los niveles de GSH y el funcionamiento clínico del paciente medido en escala UPSA. Este resultado es acorde con los resultados vistos en modelos animales en los que el estrés oxidativo puede causar alteraciones en distintas medidas neurofisiológicas (4) y consecuentemente alteraciones en el comportamiento social (207).

- En esa línea un estudio con muridos muestra que la administración del precursor del glutatión (NAC) se asocia a una mejoría en el aislamiento social. En ese caso los autores lo atribuyen a una mediación del

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

incremento de actividad de las vías dopaminérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas corticoestriatales (las cuales mostraron concentraciones elevadas de los respectivos neurotransmisores tras administración de NAC) (208). Ello da muestra de la complementariedad de los distintos modelos etiopatogénicos expuestos previamente en este trabajo doctoral.

En lo que respecta a humanos, y en lo que a clínica se refiere, en caso de ser replicado en otros estudios puede que la escala UPSA-2 se confirme como una adecuada medida del impacto funcional del desbalance del glutatión en la vida diaria de los pacientes.

9.1.2.- **Discusión: Los objetivos principales respecto la peroxidación lipídica**

(Estudio 1 “Parámetros electrofisiológicos como marcadores intermedios entre el estrés oxidativo y la clínica en la Esquizofrenia”).

Aunque no estudiamos la peroxidación lipídica sobre el efecto que pudiera tener sobre la banda gamma o la sintomatología clínica sí que estudiamos la relación que pudiera haber sobre los parámetros de la MMN en SZ. Así, no encontramos relación alguna entre los comparadores y la MMN en los pacientes. Este hallazgo puede estar explicado por lo siguiente:

Como hemos mencionado en el punto 2.1.1 los productos de la peroxidación lipídica son fiel reflejo de anomalías en estructuras como la membrana neuronal (27). La preservación de membrana parece estar vinculado a PRE mediados por la vía dopaminérgica como la N400 (55) pero la dopamina no media la MMN sino más bien otros neurotransmisores y estructuras como el glutamato y los receptores NMDA (209).

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Por lo tanto estos resultados preliminares sugieren que la MMN es un PRE que depende específicamente de biomarcadores oxidativos (GSH y GSSG) que reflejan el grado de preservación de los receptores NMDA y la transmisión glutamatérgica que de aquellos (TBARS e IPs) que son indicativos de la preservación oxidativa de la membrana neuronal. En otras palabras, nuestro estudio sugiere que la peroxidación lipídica en la SZ es un proceso que parece no influir en PRE atencionales vinculados al glutamato/receptores NMDA como la MMN.

9.1.3.- **Discusión: los objetivos secundarios respecto al glutati6n y comparadores de peroxidaci6n lipídica**

(Estudio 2 “No hay evidencia de un origen ex6geno de la alteraci6n del balance oxidativo en Esquizofrenia”)

De forma a6nada a los objetivos principales estudiamos la hip6tesis de que la ingesta de antioxidantes presentes en la dieta, el h6bito tab6quico y la medicaci6n antipsic6tica contribuye a unos valores alterados de oxidaci6n (en este caso de GSH, GSSG, TBARS e IPs) en SZ. No encontramos evidencia que apoyase la hip6tesis de que estos factores fueran las fuentes primarias de un estado hiperoxidativo en los pacientes (para resumen ver **Tabla 3**).

El h6bito de fumar es altamente prevalente en pacientes diagnosticados de SZ (210) aunque el rol en el incremento de estr6s oxidativo en SZ no queda a6n muy claro. De una forma interesante, en este estudio los controles fumadores mostraron una tendencia de niveles m6s altos de GSH comparados con controles no fumadores, la tendencia observada en los pacientes fue la opuesta. Con los IPs (pero no con TBARS) tambi6n tuvieron una interacci6n diagn6stico vs tabaco observando una tendencia

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

similar. A priori, esto puede parecer paradójico pero se ha visto que el tabaco ocasiona respuesta adaptativa en el balance redox en la exposición aguda al tabaco elevando niveles de GSH en modelos animales (156). Esta reacción puede ser que falle tras una exposición crónica al tabaco en un cambio similar a otras enfermedades crónicas como la EPOC (211). Dicho de otra forma, podemos interpretar nuestros resultados como que las defensas antioxidativas estén alteradas en nuestro grupo de pacientes diagnosticados con SZ y no responden al estrés oxidativo del tabaco. En estos resultados encontramos cierta evidencia de que el hábito de fumar se correlacione significativamente con altas concentraciones de IPs en pacientes aunque no con bajas concentraciones de GSH en pacientes.

Por tanto el tabaco parece no influenciar los valores de glutatión en nuestra muestra de pacientes aunque en el caso de la peroxidación lipídica (cuando medimos la misma con los IPs) parece que los pacientes sí que son vulnerables a un consumo crónico.

No encontramos tampoco evidencia acerca de que el GSH, el GSSG, TBARS e IPs fueran influenciados por la medicación antipsicótica medida como dosis diaria en equivalentes de CPZ. Esto no descarta el efecto potencial de la administración crónica de antipsicóticos. Los niveles bajos de GSH se han visto en pacientes que nunca han tenido medicación antipsicótica o pacientes no tratados (8, 31, 212) y también se ha visto un aumento de la peroxidación lipídica en primeros episodios no medicados (36). Esto apoya la idea de que el glutatión como la peroxidación lipídica están alterados incluso sin presencia de estos medicamentos. Si bien en nuestra muestra hemos visto un alteración significativa en el glutatión en los pacientes con SZ no la hemos visto en los

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

parámetros de peroxidación lipídica aunque es probable que con una muestra mayor haya diferencias en el marcador de los IPs (en nuestro estudio encontramos una tendencia no significativa de niveles IPs aumentados en pacientes respecto al grupo control).

En este estudio se demostró que un GSH disminuido estuvo presente con independencia de si estaban o no con clozapina, descartando un efecto sustancial de la clozapina en el estrés oxidativo observado en este proyecto. No obstante, encontramos una relación inversa y específica entre la dosis de clozapina con la concentración de GSSG. Esta relación puede estar relacionada con una actividad de la glutatión peroxidasa reducida en pacientes con este medicamento (ver limitaciones del estudio para más detalle) (91).

9.2.- Limitaciones del estudio y cierre de la discusión.

En SZ se han observado niveles bajos de GSH tanto en pacientes que nunca han tenido tratamiento (31, 201, 212). En este estudio nosotros no encontramos correlaciones significativas entre las dosis equivalentes en CPZ de la medicación antipsicótica y los niveles de GSH o %GSSG ($r = -0.26$ y -0.25 , y $p > 0.40$, para GSH y %GSSG, respectivamente) ni tampoco en los otros comparadores. Encontramos una correlación negativa entre la dosis de clozapina y el porcentaje de glutatión oxidado (%GSSG) ($r=-0.65$, $n=12$, $p=0.02$). Esto complementa los hallazgos previos de la actividad de la glutatión peroxidasa en pacientes tratados con clozapina (91). El efecto dosis-dependiente de la clozapina sobre la glutatión peroxidasa debe haber influido en

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

los resultados en GSSG de nuestro estudio (29, 212-216) y, por tanto, no controlar la dosis de clozapina puede ser una limitación para el estudio de este marcador.

Otra limitación de este estudio es el pequeño tamaño de la muestra dado que para el análisis de bandas de frecuencia fue necesario utilizar la muestra completa y el análisis estadístico puede haber no detectado otros importantes componentes en la banda de frecuencias debido a los falsos negativos. Pese a ello, este modelo sugiere que la banda de 21-40 Hz durante una tarea de estímulos auditivos simple del “paradigma oddball” es un marcador intermedio entre estrés oxidativo y funcionamiento clínico. En lo que respecta a la peroxidación lipídica, es probable que la tendencia de unas mayores concentraciones de IPs en los pacientes alcancen resultados estadísticamente significativos en caso de replicarse este estudio con una muestra mayor [Concentraciones de 2.78 ± 1.70 ng/mL ajustados a valores de creatinina (mg) en orina en los controles por los 3.53 ± 2.04 en el caso de los pacientes con una $p=0.12$].

Por tanto, y a modo de cierre de la discusión, cabe destacar que durante los últimos años distintos estudios han asociado el estrés oxidativo como un elemento importante en la patofisiología de la SZ hablando de distintos hallazgos como déficits en la síntesis de glutatión (217), en su regeneración (29) y una actividad enzimática antioxidante alterada contribuyendo a un estrés redox. También se ha visto que una disfunción de la membrana celular causada por la peroxidación lipídica puede ser secundaria a una patología mediada por radicales libres estando todo ello vinculado a aspectos específicos de la sintomatología esquizofrénica y las complicaciones de su tratamiento (27). El estrés oxidativo también aparece como un importante mecanismo en modelos de neurodesarrollo en SZ en el que alteraciones genéticas y el impacto de

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

factores ambientales en etapas tempranas de la vida podrían crear un estado de alteración en el balance redox con efectos aguas abajo en la regulación de los receptores NMDA, mielinización y conectividad funcional entre distintas regiones del cerebro (4). De hecho, modelos de neurodesarrollo en animales muestran que las neuronas corticales inhibitorias son el tipo de células comúnmente sensibles al estrés oxidativo (65). Teniendo todo esto en cuenta, el presente trabajo doctoral pretende aportar evidencia añadida a este modelo del neurodesarrollo basado en el estrés oxidativo. Lo explicamos en el siguiente apartado de conclusiones.

9.3.- Conclusiones

Describimos a continuación el resumen de los hallazgos más importantes:

1.- Nosotros replicamos resultados previos en los que se encontró niveles bajos de glutatión oxidado y altos de reducido en pacientes con Esquizofrenia. Nuestro estudio sugiere que dicha alteración parece más bien intrínseca a la enfermedad que a factores exógenos.

2.- Pudimos observar, a modo de tendencia no significativa, un aumento de la peroxidación lipídica medida en concentración de Isoprostanos en Esquizofrenia (no observado con “sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico”). Esta tendencia tampoco pudo ser justificable por factores como la dieta o el tabaco.

3.- El que la tendencia encontrada en los Isoprostanos sea específica de este biomarcador sustenta la evidencia de estudios previos que han demostrado que los Isoprostanos son un marcador más sensible para medir el estrés oxidativo en

9.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Esquizofrenia comparado con otros como las “sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (también medidos en nuestra muestra).

4.- También parece que la enfermedad pueda hacer a los sujetos más vulnerables a tener bajas defensas frente a agentes prooxidativos como el tabaco (esto apoyado en resultados que obtuvimos respecto a los marcadores del glutatión e isoprostanos).

5.- Por último hemos observado en pacientes diagnosticados de Esquizofrenia una asociación entre el estrés oxidativo en relación con respuestas en la actividad cerebral en la banda gamma y el grado de funcionamiento clínico. Parece que los hallazgos electrofisiológicos actúan como mediadores fisiopatológicos entre los marcadores redox y la clínica.

Sin embargo, nuestro estudio no puede confirmar causalidad acerca esto último. Modelos de experimentación animal serían idóneos para clarificar esto ya que el trabajo realizado únicamente sugiere un camino razonable para establecer dichos modelos que confirmen la idea que vislumbran nuestros resultados preliminares.

En definitiva, podemos concluir que los futuros estudios sobre los déficits de las defensas antioxidantes como el glutatión y el aumento de la peroxidación lipídica contribuirán a una mejor comprensión de la etiología, fisiopatología y clínica de la Esquizofrenia. De consolidarse este modelo, de forma añadida se ayudará a entender mejor el mecanismo de acción de los candidatos terapéuticos actuales basados en el metabolismo oxidativo, sus posibles indicaciones en el tratamiento de la psicosis y, quizá, un cambio paradigmático en la práctica clínica del día de mañana.

ANEXOS



Anexo 1: Cuestionario sobre la Estimación de la Ingesta de Antioxidantes en la dieta (EIA)

EIA
QUESTIONNAIRE

1) How many hours have passed since you ate for the last time? _____

Circle **one response** for each question according to the diet habits along your past 6 months:

2) How many times do you eat fruit in a week?

0 times

Once

2-3 times

4-5 times

1 or 2 pieces daily

3) How many times do you eat vegetables in a week?

0 times

Once

2-3 times

4-5 times

1 or 2 pieces daily

4) How many times do you drink wine (1/2 glass) in a week?

Never

Once

Twice

3-4 times in a week

Daily (once)

5) How many times do you drink juice in a week?

0 times

Once

2 times

3-4 times in a week

Daily (once)

6) How many times do you eat nuts in a week?

Never

Once

Twice

3-4 times in a week

Daily (once)

7) How many times do you eat dried fruit in a week?

Never

Once

Twice

3-4 times in a week

Daily (once)

8) How many times do you eat bread in a week?

0 times

Once each 2 or 3 days

Once daily

Twice daily

3 times per day

9.a) How many times do you eat cereals in a week?

Never

Once

Twice

3 times in a week

Daily (once)

9.b) How do you usually eat the cereals?

Hot (Example: cream of wheat)

Cold

10) How many times do you eat baking chocolate in a week?

0 times

Once

Twice

3 times

Daily

11) How many times do you eat milk chocolate bar in a week?

Never

Once

Twice

3 times in a week

Daily (once)

PLEASE
CONSIDER:

WINE: 3,5 fl. Oz US, a half of a glass

JUICE: 3,5 fl OZ US half of a glass of a juice

NUTS AND DRIED FRUIT : consider a service in a range of 1 Oz. of food without skin, it's the approximately the amount of a bunch.

BREAD: 1 slice.

BAKING CHOCOLATE: liquid, 1 fl Oz or square

CHOCOLATE: 1 bar, aprox. 1 Oz

Anexo 2: Tabla de conversión para el cálculo de ingesta de antioxidantes

Tipo de cálculo:	Grupos de alimentos usados para el cálculo:	Descripción del cálculo:	Valor (Unidad):
Medias ponderadas por servicio estándar de alimentos.	Verdura (VEG) Fruta (FRU) Frutos secos (DF)	Media ponderada del servicio estándar proporcional al % de cada alimento en específico dentro de la ingesta diaria del grupo de alimentos a medir.	VEG: 102,4372875 FRU: 136,2969571 DF: 81,91978 (gramos)
Otros valores de servicio estándar.	Zumo de Fruta (JF) Nueces y derivados (N) Vino (W) Cereales (CE) Pan (BR) Chocolate con leche (MC) Chocolate soluble (BC)	Los servicios estándar fueron tomados directamente de Fuentes referenciadas o calculadas con medias aritméticas.	JF: 177,44118 N: 29 W: 103,50735 CE: 47,57 (frío) 37 (calentado) BR: 35 MC: 28,34952 BC: 28,34952 (gramos)
Medias ponderadas de concentración de TAC (medido en FRAP).	Verduras (VEG) Fruta (FRU) Zumo de Fruta (JF) Frutos secos (DF) Nueces y derivados (N)	Media ponderada de FRAP proporcional al % de cada alimento en específico dentro de la ingesta diaria del grupo de alimentos a medir.	VEG: 6,302629649 FRU: 5,812662248 JF: 10,5535642 DF: 11,127048 N: 45,7 (micromol Fe+/g)
Media de concentración de TAC (en FRAP).	Vino (W) Cereales (CE) Pan (BR) Chocolate con leche (MC) Chocolate soluble (BC)	Media aritmética de las concentraciones de TAC.	W: 3,666666667 CE: 9,725 BR: 8,05714 MC: 9,666666667 BC: 88,75 (micromol Fe+/g)

Tabla de conversión medida con FRAP. Los valores se basaron exclusivamente en productos Norteamericanos excepto aquellos que comúnmente se importan (vino) o en caso de que no quedara recogido en la base de datos ningún producto norteamericano (zumo de limón y pan utilizando productos de fuera de Norteamérica). El valor FRAP se utiliza para cada alimento con la siguiente formula:

FRAP Z = N° de ingestas de Z por semana x servicio estándar de comida x concentración de FRAP Z.

Anexo 3: Manual de procedimiento estándar: Marcadores de oxidación

SOP for body fluid samples

DURING THE PRIOR DAY:

a) Label the following items:

- 2 Polypropylene 0.6 mL centrifuge tubes.
- 2 EDTA tubes (purple top).
- 1 Urine tube (grey top).
- 1 Urine Plastic vial.

b) How to label it:

- Write at the top of the label subject number (example SXXXX).
- Write the date of extraction (mm/dd/yyyy)
- Write at the bottom the sample you're going to store:
 1. BLOOD (goes in the initial EDTA tube used to do the blood draw)
 2. URINE (goes in the initial plastic vial used to take the urine sample)
 3. GSH.B (goes in a polypropylene 0.6 mL centrifuge tube)
 4. GSSG.B (goes in a polypropylene 0.6 mL centrifuge tube)
 5. TBARS.P (goes in the EDTA tube used to store the plasma)
 6. ISOPROSTANES.U (goes in the Urine tube to store Isoprostanes).

Example:

Sxxx

mm/dd/yyyy

BLOOD

Material required:

- Adjustable micropipettes (20-200 μ L) and Micropipette disposable tips.
 - - 70°C freezer, 4 °C fridge and Insulated temperature container.
 - Eppendorf Centrifuge 5702 R.
 - 3 mL EDTA tubes (purple top), 3 mL Urine tubes (grey top), polypropylene 0,65 mL microcentrifuge tubes and urine plastic vials.
 - Dry ice package.
 - Thiol Scavanger.
 - Dividers and labels for storage.
-

**SOP for body
fluid samples**

STARTING WITH THE SUBJECT:

Draw the blood to a 3mL EDTA tube with a butterfly needle and sway the tube after extraction to homogenize the sample in order to prepare the measurement of TBARS, GSH and GSSG and collect the urine sample from a complete urination to a plastic vial. Keep them with the Scavenger in an ice box till the samples are processed.

1st Measurement of GSH/GSSG (whole blood):

1.A Measurement of GSH

- 1.- Carefully pipette 50 μ L of whole blood from the 3 mL EDTA tube and add it to the bottom of a Polypropylene centrifuge tube.
- 2.- Freeze the sample at -70°C in less than 5 minutes form collection (stable for at least 30 days).
- 3.- Ship the samples with dry ice to the processing lab.

1.B Measurement of GSSG:

- 1.- Add 30 μ L of Thiol Scavenger to a Polypropylene microcentrifuge tube.
- 2.- Carefully pipette 100 μ L of whole blood from the 3 mL EDTA tube and add it to the bottom of a Polypropylene centrifuge tube.
- 3.- Freeze the sample at -70°C in less than 5 minutes from collection (stable at least 30 days).
- 4.- Ship the samples with dry ice to the processing lab.

NOTE: Considering the amount of blood available, you may want to make extra aliquots at this time. Remaining draw tube can be used for (2) Measurement of plasma TBARS (approximately 500 μ L of blood is needed for that purpose).

2nd Measurement of Isoprostane/ creatinine (urine):

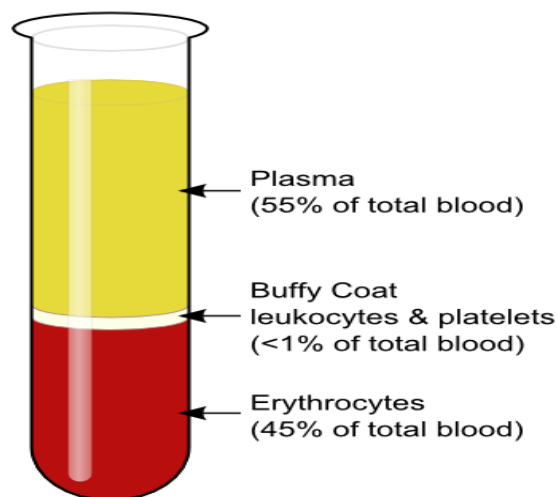
- 1.- Pipette 1mL of urine from the plastic vial to a 3 mL Urine C&S tube (grey top) and sway 10 times to homogenize the sample.
- 2.- Freeze samples at -70°C for storage.
- 3.- Ship the samples with dry ice to the processing lab.

NOTE: It's preferable to leave some plasma in order to avoid the contact between the tip and the cellular components. In case samples need to be moved along the research complex so as to frozen it at -70°C use ~ 2 kg of dry ice in a 12 inch insulate temperature container.

SOP for body fluid samples

2nd Measurement of TBARS (plasma):

- 1.- Centrifuge the remaining sample of blood of the EDTA tube 10 minutes at 2000 rpm at 4°C.
- 2.- Pipette the plasma layer to another 3ml EDTA tube and remove the straw colored plasma layer that remains in the first tube. Sway 10 times the plasma sample to homogenize the sample.
- 3.- Freeze the sample at -70 °C (stable for at least 30 days).
- 4.- Ship the samples with dry ice to the processing lab.

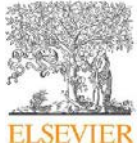


Procedural notes:

- Subjects must be abstained from eating before collecting samples, we would provide food after drawing samples. Hence first thing in the morning samples must be drawn.
- Freezing samples in less than 5 minutes from collection would be required to avoid bacterial contamination and oxidation process.
- The remaining biological material should be unlabeled, eliminating the blood sample in the needle container.
- Once the samples are collected and stored will be shipped to the processing lab in order to get the results.
- The samples will be shipped overnight via Fedex with sufficient dry ice to keep the samples frozen for up to 2 days in a styrofoam cooler. Will be used ~2 kg of dry ice in a 12 inch cooler. Samples can be stored until you have a sufficient quantity to ship.
- Vial of the Thiol Scavenger should be stored at 4°C (for longer storage at -70 °C).

PUBLICACIONES



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Clinical Neurophysiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinph

Electrophysiological intermediate biomarkers for oxidative stress in schizophrenia

Alejandro Ballesteros^{a, b}, Ann Summerfelt^a, Xiaoming Du^a, Pan Jiang^a, Joshua Chiappelli^a, Malle Tagamets^a, Patricio O'Donnell^c, Peter Kochunov^a, L. Elliot Hong^{a,†}

^a Maryland Psychiatric Research Center, Department of Psychiatry, University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, MD, United States

^b Hospital Clínico de Salamanca, Department of Psychiatry, Salamanca, Spain

^c Department of Anatomy & Neurobiology and Psychiatry, University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, United States

article info

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Schizophrenia
Oxidation
Oscillations
MMN
GSH
GSSG

highlights

Our understanding of the causes of the diverse electrophysiological abnormalities found in schizophrenia is limited.

Mismatch negativity and gamma band oscillations are found to be associated with oxidative stress in schizophrenia.

Gamma oscillations may index the glutathione related oxidative stress and its impact on clinical functions.

abstract

Objective: Diverse electrophysiological abnormalities have been associated with schizophrenia, but the underlying causes remain elusive. We tested whether the altered oxidative stress in schizophrenia contributes to the electrophysiological abnormalities.

Methods: We used an auditory oddball task to measure mismatch negativity (MMN) and gamma band response on 29 schizophrenia patients and 25 normal controls. Oxidative stress was assessed by monomeric glutathione (GSH, reduced form) and glutathione disulfide (GSSG, oxidized form).

Results: Patients had reduced MMN ($p = 0.015$) and reduced power of gamma band responses at 21–40 Hz and 41–85 Hz (all $p < 0.001$). GSH was significantly lower ($p < 0.001$) while %GSSG was higher ($p = 0.023$) in patients compared with controls. MMN was correlated with GSH in controls; while 21–40 Hz responses were correlated with GSH in patients. Lower GSH and higher GSSG levels were associated with low community functioning ($p = 0.018$). Multivariate mediation modeling showed that gamma band at 21–40 Hz was a significant mediator for GSH effect on community functions.

Conclusions: High beta/low gamma range (21–40 Hz) responses may be an intermediate biomarker indexing oxidative stress and its effect on clinical functions.

Significance: Electrophysiological abnormalities and associated clinical functional changes may in part be associated with heightened oxidative stress in schizophrenia.

© 2013 International Federation of Clinical Neurophysiology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Electrophysiological abnormalities in specific oscillatory frequencies (Spencer et al., 2004; Light et al., 2006; Cho et al., 2006; Uhlhaas and Singer, 2010) and in event-related potentials (ERPs) such as mismatch negativity (MMN) (Shelley et al., 1991; Umbricht

and Krljes, 2005; Javitt et al., 1995; Umbricht et al., 2000; Bramon et al., 2004; Hall et al., 2006) are consistently reported in schizophrenia. Our understanding on the causes of these diverse electrical anomalies is limited. Schizophrenia animal models suggest that behavioral and cognitive deficits may be driven by altered excitatory/inhibitory (E/I) balance in cortical circuits (O'Donnell, 2011), and such balance can be associated with gamma frequency oscillations (Gandal et al., 2012). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade can yield altered excitation–inhibition balance, primarily by impairing NMDA function in inhibitory interneurons

[†] Corresponding author. Address: Maryland Psychiatric Research Center, P.O. Box 21247, Baltimore, MD 21228, United States. Tel.: +1 410 402 6828; fax: +1 410 402 6023.

E-mail address: ehong@mprc.umaryland.edu (L.E. Hong).

(Homayoun and Moghaddam, 2007). Parvalbumin interneurons stand out as a critical neural population responsible for E/I balance, which is directly involved in the generation of gamma oscillations (Carlen et al., 2012). NMDA receptor function is sensitively indexed by MMN in animals and humans (Javitt et al., 1996, 2011). MMN is consistently found to be impaired in schizophrenia (Javitt et al., 1993, 1996, 1998), and this phenomenon requires synchronized gamma activity (Nicol et al., 2012). Parvalbumin interneurons and NMDA receptors also share the common property that they are sensitive to damage from oxidative stress (Gonzalez-Burgos and Lewis, 2012; Choi and Lipton, 2000; Kohr et al., 1994; Nakazawa et al., 2012; Do et al., 2009). In this study, we tested the hypothesis that abnormal electrophysiological markers thought to be indexing NMDA receptors and interneuron functions, are at least in part driven by heightened oxidative stress in schizophrenia. If so, then some abnormal electrophysiological signals may index the intermediate biological processes connecting oxidative stress to schizophrenia clinical presentations.

Heightened oxidative stress in schizophrenia may be due to genetic factors leading to decreased capacity to synthesize antioxidant compounds (Gysin et al., 2007) and/or early developmental insults that can increase generation of reactive oxygen species in the brain (Do et al., 2009). Genetic mouse models with decreased glutathione, a major antioxidant redox substrate in the brain, showed impaired NMDA receptor function, which can be restored by glutathione (Choi and Lipton, 2000; Kohr et al., 1994). Animals with reduced glutathione (GSH) levels also showed pronounced beta and gamma oscillation deficits, secondary to parvalbumin fast spiking interneurons impairment (Steuillet et al., 2010). Oxidative stress has been implicated in the schizophrenia pathophysiology. It is possible that altered excitation–inhibition balance can be initiated or exacerbated by increased oxidative stress in the patients. As such, gamma oscillations and MMN could be sensitive tools to evaluate the impact of oxidative stress in the brains of schizophrenia patients. Overall, evidence of increased oxidative stress in schizophrenia is extensive (Yao et al., 2006; Gawryluk et al., 2011; Do et al., 2000; Wood et al., 2009); however it remains to be determined whether oxidative stress causes or is secondary to other aspects of schizophrenia pathophysiology.

Defense against oxidative stress in the brain relies on the balance between the reduced form of glutathione (GSH) and its oxidized form (GSSG). Genetic and environmental causes for the schizophrenia pathophysiology could heighten oxidative stress in cortical regions during neural development (Do et al., 2009). Post-mortem studies (Yao et al., 2006; Gawryluk et al., 2011) and in vivo magnetic resonance spectroscopy (MRS) studies revealed reduced GSH levels in schizophrenia patients (Do et al., 2000; Wood et al., 2009). Administration of the glutathione precursor

n-acetylcysteine (NAC) improved clinical symptoms and MMN deficits in schizophrenia patients (Lavoie et al., 2008; Berk et al., 2008), as well as improved EEG synchronization (Carmeli et al., 2012). Here, we tested whether gamma band anomalies and MMN deficits, commonly observed in schizophrenia, are correlated with blood levels of glutathione as peripheral measures of oxidative stress. These peripheral measures of oxidative stress have been shown to reflect the extent of brain oxidative stress (Mahadik et al., 2006). We further tested this hypothesis by modeling how GSH and GSSG abnormalities may be linked to clinical functions through neuronal mechanisms as indexed by MMN and gamma band oscillations.

2. Materials and methods

2.1. Participants

We recruited 29 schizophrenia patients and 25 normal controls, who were not significantly different in age, gender, or smoking status (Table 1). Patients were recruited from the outpatient clinics of the Maryland Psychiatric Research Center and neighboring community clinics. Normal controls were recruited using media advertisements. Major medical and neurological illnesses, history of head injury with cognitive sequelae, mental retardation, substance dependence within the past 6 months, or current substance abuse (except nicotine) were exclusionary. The Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID) was administered to all subjects to obtain DSM-IV diagnoses. Controls had no DSM-IV Axis I diagnosis and no family history of psychosis in 3 generations. Patients were individuals with DSM-IV schizophrenia who were medicated and clinically stable. Patients were on the following medications: 3 patients were on first generation antipsychotic medications (CPZ equivalent of daily dose = 117.1 ± 23.4 mg), the rest were on second generation antipsychotic medications, including 12 on clozapine (368.8 ± 137.5 mg), 3 on aripiprazole (18.3 ± 10.4 mg); 3 on risperidone (6.7 ± 4.6 mg); 2 on olanzapine (10.0 ± 7.1 mg); 2 on quetiapine (800.0 ± 282.8 mg); and the rest on 2 or more second generation antipsychotic medications. All subjects gave written informed consent in accordance with local Institutional Review Board guidelines.

2.2. Measurement of GSH and GSSG

Participants were instructed to avoid strenuous physical exercise 24 h before testing, to fast overnight and not to smoke on the morning of the blood draw. The number of hours of reported fasting before blood draw and ERP was not significantly different between patients and controls (Table 1). A venous whole blood sample was drawn between 8:30AM and 10:30AM. The key step of sample preparation was to prevent GSH, the predominant form of glutathione, to be oxidized into GSSG, so that GSSG can be accurately measured. GSSG samples were mixed with a pyridine derivative thiol-scavenging reagent before freezing. This redox scavenger overcomes shortfalls of other methods associated with undesirable enzyme reactivity or slow rate reaction (Griffith, 1980; Guntherberg and Rost, 1966). Scavenger-processed (for GSSG) and unprocessed (for GSH) whole blood samples were immediately stored at -80 LC to avoid artifactual oxidation by room temperature and cellular lysis (the blood draw occurred in the freezer room). At the end of the study, all samples were shipped using a secured dry ice container to Oxford Biomedicals, Rochester Hills, MI, USA, who performed GSH and GSSG assays in one batch. The individuals who performed the assays were blind to subject information. The reaction of GSH with Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) gave rise to a product that can

Table 1
Demographic, clinical characteristics, and glutathione levels of the participants. BPRS: Brief Psychiatric Rating Scale total score. UPSA-2: the University of California San Diego Performance-based Skills Assessment, 2nd edition total score (the data for controls were from 23 subjects because 2 controls did not complete UPSA-2). Values are mean \pm sd./Based on Mann–Whitney U test.

	Controls (N = 25)	Patients (N = 29)	F or χ^2 values	p Values
Age (years)	38.76 \pm 13.72	41.10 \pm 13.81	0.009	0.55
Sex (male:female)	11:14	20:9	2.48	0.12
Smoker:Nonsmoker	7:18	8:21	0.00	1.00
BPRS score	n/a	43.28 \pm 9.93	n/a	n/a
UPSA-2	102.9 \pm 10.3	90.7 \pm 10.5	17.62	<0.001
Fasting duration (hours)	12.18 \pm 2.81	12.48 \pm 3.64	0.11	0.74
GSH (fmol)	800.50 \pm 201.73	516.50 \pm 238.40	21.06	<0.001
GSSG (fmol)	19.96 \pm 24.82	27.94 \pm 23.19	8.56	0.005
%GSSG	2.40 \pm 3.02	12.43 \pm 24.18	2.28	0.023

Please cite this article in press as: Ballesteros A et al. Electrophysiological intermediate biomarkers for oxidative stress in schizophrenia. Clin Neurophysiol (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2013.05.021>

be quantified spectrophotometrically at 412 nm. This reaction was used to measure the reduction of GSSG to GSH, and its rate is proportional to GSH and GSSG concentrations (Iwasaki et al., 2009). Given that the predominant form is GSH (Umbricht et al., 2006), GSSG is more meaningful when expressed as %GSSG [(GSSG/total glutathione) _ 100], which was the primary measure for GSSG.

2.3. ERP recording and analysis

ERP was recorded after blood sample collection, using Neuro-scan (Charlotte, NC) SynAmp² 64 channel system at 1 kHz sampling rate with bandpass at 0.1–200 Hz. Subjects sat in a semi-reclining chair inside a sound-attenuated chamber. The paradigm was a duration-deviant oddball task (Magno et al., 2008). Subjects were presented with 1000 auditory stimuli, of which 800 (80%) were standard tones presented at 75 dB, 60-ms, 1000 Hz; 200 (20%) were duration-deviant tones at 75 dB, 150-ms, 1000 Hz. All tones had a 5 ms rise/fall time, with a stimulus onset asynchrony of 300 ms. A nose electrode served as reference. Electrode impedance was kept below 5 k Ω . FZ was used for MMN measurement because this location typically shows the largest MMN (Javitt et al., 2000; Umbricht et al., 2006). Eyeblink artifacts were minimized using a VEOG-based eyeblink spatial filter routine implemented in Neuroscan software. An ICA based algorithm for correction of saccade-related transient potentials was used on each subject to identify and remove microsaccade-related electromyogenic activities (Hassler et al., 2011). Records were then filtered at 0.1–30 Hz (Umbricht et al., 2006) in 24db/octave, epoched, baseline-corrected, threshold-filtered at ± 75 μ V for artifact rejection, followed by visual inspection to exclude any overt artifacts from muscle contraction. Over 90% of standard and deviant trials were retained after these procedures in each subject and there were no statistical significant differences in the number of trials retained between schizophrenia patients and normal controls for either standard or deviant trials (all $p < 0.05$). Standard and deviant trials were averaged separately, followed by a subtraction of the two averaged waveforms. MMN was scored by peak detection within a 100–225 ms post-stimulus window by an automatic algorithm followed by visual inspection to verify correct placement of each marker for peak detection. Scoring was blinded to clinical information.

Single-trial neural oscillatory responses were obtained from the original 0.1–200 Hz recording from FZ, epoched using a 250 ms window from 25 to 275 ms following standard and deviant stimuli. This window was wider than the 100–225 ms window used for MMN peak measurement so that we could capture the energy in the waveform. An 8-level Daubechies biorthogonal discrete wave-let transform (DWT) was then applied to each single-trial to decompose the oscillatory activities. Six “details” from this DWT decomposition were used for the following frequency bands: high gamma frequency activities >85 Hz; gamma at 41–85 Hz; low gamma/high beta at 21–40 Hz; beta at 13–20 Hz; theta-alpha at 5–12 Hz; and delta at <5 Hz. Further details of this method have been fully described (Hong et al., 2008, 2010). Energy within each DWT decomposition was measured by power spectrum density (PSD in dB/Hz) using a nonparametric Welch method (Welch, 1967). The single trial averaging represents the combined stationary and nonstationary energy post-stimulus rather than the time-locked activity as in MMN. Oscillatory measures were scored by algorithms written in Matlab environment without manual scoring.

2.4. Clinical and functional assessments

To determine whether GSH and GSSG are clinically related, we used the 20-item Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) to estimate overall symptom severity for schizophrenia patients. To assess

functional capacity in all subjects, we used the total score of the University of California San Diego Performance-based Skills Assessment, 2nd edition (UPSA-2), which is a proxy measure of community functional capacity by assessing simulated life and community skills in household chores, communication, finance, transportation, and recreational activities (Patterson et al., 2001; Twamley et al., 2002; Harvey et al., 2007).

2.5. Statistical analysis

ANOVA was used to assess patient-control differences on single dependent measures. A Mann–Whitney U test was used when data did not follow normal distribution. For multiple oscillatory re-sponse frequencies, repeated measures ANOVA was used for group comparisons where 6 frequency bands and 2 stimulus types (standard and deviant) were repeated measures. Greenhouse-Geisser corrections were applied. Post-hoc tests examined if patients and controls were significantly different on each frequency band/stimulus type. Bonferroni correction was applied to adjust for multiple comparisons. Correlations were performed using Spearman's Rank Order tests. To reduce multiple comparisons, correlation analyses were performed only if measures were found significantly associated with schizophrenia. All tests were two-tailed.

Contributions of oscillatory responses to MMN were tested using stepwise regression. GSH and GSSG contributions to clinical symptoms and functions were assessed by linear regressions where a clinical assessment was the dependent variable and GSH and GSSG were the predictors. GSSG instead of %GSSG was used in this analysis for maximizing the independence of the two predictors.

To formally test whether electrophysiological measures could be considered “intermediate” markers between oxidative stress and clinical outcome, we performed multivariate mediation analysis (Preacher and Hayes, 2004; Preacher and Kelley, 2011; Hayes, 2012), where a clinical measure was the outcome variable, GSH and GSSG concentration were two independent predictors, and MMN was the mediator. For neural oscillations, all 6 frequency bands were entered and tested as potential mediators. This model estimates the total, direct, and indirect relation of multiple causal variables (GSH and GSSG) on outcome clinical variable through a proposed mediator (MMN or oscillatory responses at different frequency bands). The mediation analysis estimated whether the direct effect of oxidative stress markers on the clinical outcome was significantly mediated through the indirect effects of the electrophysiological biomarkers. Statistical significance for the mediators was established by bootstrapped 95% confidence intervals (95% CI) with 5000 iterations. To reduce type I error, this analysis is restricted to only those clinical measures that were already directly and significantly related to oxidative stress.

3. Results

3.1. Blood oxidative stress markers GSH and %GSSG

Fasting GSH levels were significantly lower in schizophrenia patients compared with controls ($p < 0.001$, Table 1). Patients showed over 5-fold higher %GSSG compared with controls ($p = 0.023$, Table 1). GSH and %GSSG were not significantly correlated to each other in either the controls ($r = 0.03$, $p = 0.90$) or patients ($r = -0.09$, $p = 0.66$). Separating patients into those on clozapine and those on other antipsychotics and comparing them with normal controls, a significant group main effect was found for GSH ($F(2, 53) = 11.29$, $p < 0.001$) but not for %GSSG ($p = 0.12$). Post-hoc tests on GSH showed that lower GSH was present independently in clozapine (559.2 ± 238.3) ($p = 0.005$) and other

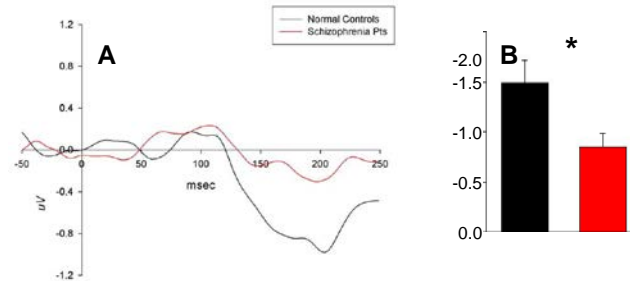


Fig. 1. A: Grand averages of MMN waveforms in schizophrenia patients and normal controls. B: Reduced MMN amplitude in schizophrenia patients compared with healthy controls ($p = 0.015$).

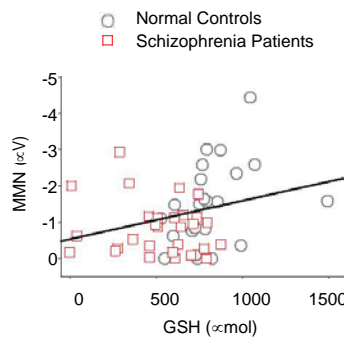


Fig. 2. A significant correlation between MMN and the reduced form of glutathione (GSH) was observed in normal controls (circle and grey dotted line) (Spearman's $\rho = 0.45$, $p = 0.024$). No such relationship was observed in schizophrenia patients (square and red dotted line) ($r = 0.04$, $p = 0.85$). Black solid line is the regression line for the combined sample. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

antipsychotics subgroup (486.4 ± 241.0) ($p < 0.001$) compared with normal controls (800.5 ± 201.7). Increased %GSSG was also present in both clozapine ($10.6 \pm 23.6\%$) and other antipsychotics sub-groups ($13.7 \pm 25.3\%$) compared with controls ($2.4 \pm 3.0\%$) although they were not statistically significant ($p = 0.051-0.20$). Correlations between antipsychotic CPZ and GSH and %GSSG were not significant ($r = 0.26$ and 0.25 , respectively, $n = 29$, all $p > 0.40$). Clozapine dose was not significantly correlated with GSH level ($r = 0.01$, $p = 0.97$), but significantly and inversely correlated with %GSSG level ($r = -0.65$, $n = 12$, $p = 0.02$) such that higher clozapine doses were associated with lower GSSG. Age was not significantly associated with blood GSH level in schizophrenia patients or controls ($r = -0.21/-0.26$, all $p > 0.2$).

3.2. MMN and correlations with GSH and %GSSG

MMN amplitude was significantly reduced in schizophrenia patients compared to controls ($F = 6.33$, $p = 0.015$, Fig. 1). MMN latency was not significantly different between groups (183.2 ± 25.8 ms vs. 175.0 ± 31.5 ms, respectively, $F = 1.07$, $p = 0.31$). MMN amplitude (absolute value) and GSH were significantly correlated in controls (Spearman's $\rho = 0.45$, $n = 25$, $p = 0.024$; Fig. 2). This correlation was not significant in patients ($\rho = 0.05$, $n = 29$, $p = 0.79$). %GSSG was not significantly correlated with MMN in either group (all $p > 0.31$).

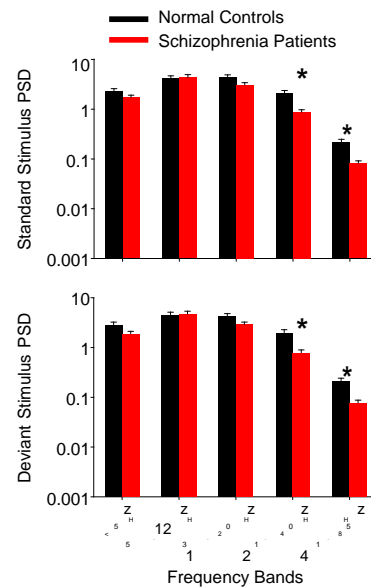


Fig. 3. Single trial neural oscillatory response to standard (A) and deviant (B) auditory tones. Schizophrenia patients showed reduced gamma band power spectrum density in 21–40 Hz and 41–85 Hz in response to both stimulus types. Y-axis is in log scale. / Significant after Bonferroni correction. PSD: power spectrum density, a measure of the power of oscillatory responses.

3.3. Neural oscillations and correlations with GSH and %GSSG

Single-trial response analysis demonstrated significant stimulus \times group ($F(1.0, 5.7) = 7.50$, $p = 0.008$) and frequency \times group ($F(1.9, 22.6) = 3.14$, $p = 0.050$) interactions but no significant main effect of group ($p = 0.089$) or 3-way interaction ($p = 0.48$). Post-hoc tests showed that patients had (1) reduced power in 41–85 Hz gamma band during standard ($p < 0.001$) and deviant ($p < 0.001$) stimuli compared with controls; (2) reduced power in 21–40 Hz gamma band during standard ($p < 0.001$) and deviant ($p < 0.001$) stimuli compared with controls (Fig. 3). These were significant after Bonferroni correction using $p = 0.004$ for $n = 12$ comparisons (6 bands \times 2 stimulus types). No other frequencies showed between-group differences at this threshold.

Of these significant responses, GSH level was correlated with 41–85 Hz during standard ($\rho = 0.42$, $n = 29$, $p = 0.025$) and deviant

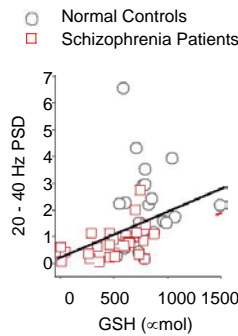


Fig. 4. A significant correlation between GSH and 21–40 Hz response to the deviant tone was observed in schizophrenia patients (square and red dotted line) ($\rho = 0.50$, $p = 0.005$). No such relationship was observed in normal control (circle and grey dotted line) ($\rho = 0.18$, $p = 0.38$). Black solid line is the regression line for the combined sample. PSD: power spectrum density. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

($\rho = 0.40$, $p = 0.032$) stimuli and also 21–40 Hz during standard ($\rho = 0.59$, $p = 0.001$) and deviant ($\rho = 0.50$, $p = 0.005$) stimuli in schizophrenia patients. In normal controls, GSH was significantly correlated only with 41–85 Hz in response to deviant stimulus ($\rho = 0.41$, $n = 25$, $p = 0.042$). The correlations between GSH and 21–40 Hz responses to the standard ($p = 0.001$) and deviant ($p = 0.005$) stimuli in the patients remained statistically significant after Bonferroni corrections (4 responses $_2$ groups, $p = 0.05/8 = 0.006$). The correlation between GSH and the 21–40 Hz responses during deviant stimuli is plotted in Fig. 4. Partial correlation with antipsychotics in CPZ equivalent showed that the correlation between GSH and 21–40 Hz remained about the same ($r = 0.56$ for standard and $r = 0.47$ for deviant stimuli). %GSSG was not significantly correlated with gamma band measures.

3.4. Relationship of MMN and neural oscillations

Stepwise regressions were performed where MMN amplitude was the dependent measure and the 12 responses (6 frequency bands $_2$ stimulus types) were the predictors. In controls, gamma band power at 41–85 Hz during standard tone was significantly correlated with MMN amplitude ($F(1, 23) = 6.04$, $DR^2 = 20.8\%$, $p = 0.022$). Removing this 41–85 Hz response to standard tones, we found that 41–85 Hz responses to deviant tones were similarly and significantly correlated with MMN ($F(1, 23) = 6.03$, $DR^2 = 20.8\%$, $p = 0.022$). None of the other frequencies was statistically significant. In patients, none of the frequency bands showed significant correlation to MMN.

3.5. Clinical and functional outcome

GSH and GSSG contributions to BPRS total score in the patients was not significant ($F(2, 26) = 0.30$, $p = 0.74$). In the regression analysis of GSH and GSSG contributions to UPSA-2 using all subjects, the model was significant ($F(2, 49) = 4.36$, $DR^2 = 15.1\%$, $p = 0.018$) with tolerable co-linearity statistics ($VIF = 1.02$). GSH level significantly contributed to higher function ($t = 2.08$, $DR^2 = 8.0\%$, $p = 0.045$) while GSSG level significantly contributed to lower function ($t = 2.22$, $DR^2 = 7.1\%$, $p = 0.031$). Adding group as a dummy variable, GSH no longer significantly contributed to higher function ($p = 0.065$) but GSSG still significantly contributed to lower function ($p = 0.048$). The results suggest that part of the variance was due to group differences on UPSA-2 and/or oxidative stress mea-

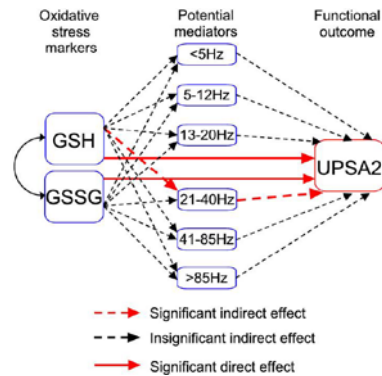


Fig. 5. Multivariate mediation model where neural oscillatory responses to the standard tone were tested as multiple potential mediators between oxidative stress markers GSH and GSSG and everyday function measure UPSA-2. Red solid lines indicate direct and significant effects of GSH and GSSG on UPSA-2. Red dotted lines represent the mediation model where the indirect effects were tested. Dark dotted lines indicate no significant indirect (mediating) effect. Red dotted lines indicate significant indirect effects that a biomarker directionally mediated the effect between an oxidative stress marker and the UPSA-2 score. This model showed that the 21–40 Hz oscillatory response during auditory oddball task was a significant intermediate biomarker linking GSH to community function outcome as measured by UPSA-2. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ures, although the general relationship between GSH/GSSG and UPSA-2 remained even after considering the group effect. However, this model was not statistically significant when analyzed in controls and patients separately, likely due to smaller sample sizes.

3.6. Intermediate biomarkers linking oxidative stress to clinical functions

The indirect effect of oscillatory responses as mediators for the significant association between GSH/GSSG and UPSA-2 was tested by a multivariate mediation model. Oscillatory responses to standard and deviant tones were modeled separately to reduce collinearity because they were highly correlated in the respective frequencies. This analysis was only done in the combined sample due to small sample size. For the standard tone (full model depicted in Fig. 5), the 21–40 Hz response significantly mediated the effect between GSH and UPSA-2 score (95% CI = 0.0015–0.040) (red dotted lines). None of the other response frequencies was statistically significant (dark dotted lines). Testing the same model in responses to deviant tone showed a similar effect (not graphed): only the 21–40 Hz response significantly mediated GSH and UPSA-2 (95% CI = 0.002–0.053).

The indirect effect of MMN as a mediator was also tested: neither GSH (95% CI = -0.0031 to 0.0048) or GSSG (-0.015 to 0.016) was significantly mediated via MMN for their effects on UPSA-2.

4. Discussion

In this study, we aimed to examine the hypothesis that electrophysiological abnormalities that are frequently observed in schizophrenia patients may be associated with oxidative stress. We found that schizophrenia patients indeed had a severe imbalance in the redox substrates GSH and %GSSG, and significantly reduced 20–85 Hz gamma band responses during the passive auditory odd-ball task. The oscillatory response in this range was significantly correlated with GSH levels in both controls and schizophrenia pa-

tients, suggesting that decreased antioxidative capacity was associated with reduced gamma response.

These findings are largely consistent with the growing evidence of a prominent oxidative stress state in schizophrenia patients, as indicated by reduced GSH and changes in other redox enzymes (Yao et al., 2006; Gawryluk et al., 2011; Do et al., 2000; Wood et al., 2009). Our study provided new evidence that %GSSG was also substantially increased in schizophrenia patients, which was not typically measured in most previous studies. This may indicate an overall reduction in total available glutathione due to impaired synthesis, or over-stretched demand for antioxidative defense. Low GSH has been seen in treatment-naïve or unmedicated schizophrenia patients (Do et al., 2000; Hayes, 2012; Raffa et al., 2011). We also found no significant correlations between antipsychotic in CPZ equivalent and GSH or %GSSG, except a negative correlation between clozapine dose and %GSSG. The significant correlation with %GSSG may be related to a previous finding of a reduced glutathione peroxidase activity in clozapine-treated patients (Miljevic et al., 2010). Dose-dependent inhibition of glutathione peroxidase activity by clozapine might have influenced %GSSG (Yao et al., 2006; Raffa et al., 2011; Dakhale et al., 2004; Kuloglu et al., 2002; Ben Othmen et al., 2008; Ranjekar et al., 2003).

Several cellular and synaptic mechanisms are sensitive to oxidative stress, particularly parvalbumin (PV) interneurons and NMDA receptors (Choi and Lipton, 2000; Kohr et al., 2004; Nakazawa et al., 2012; Do et al., 2009). According to our observations, low GSH level was correlated with reduced power in 21–40 Hz activities. PV interneurons are characterized by fast-spiking rates that maintain cortical microcircuits through synchronized gamma band oscillations (Sohal et al., 2009). Our analysis supports that oxidative stress may represent one of the mechanisms behind the gamma band dysfunction frequently noted in schizophrenia.

NMDA receptor is also a redox sensitive protein preserved by GSH (Choi and Lipton, 2000; Köhr et al., 1994). We found that MMN and GSH level was significantly and positively correlated, although only in normal controls. This could be viewed as consistent with previous findings that supplement of glutathione by NAC increased MMN (Lavoie et al., 2008). MMN is an established marker for NMDA integrity (Javitt et al., 1996). Mice with NMDA receptor knocked out in parvalbumin interneurons showed altered behaviors and deficits in gamma oscillations (Belforte et al., 2010) and these abnormal interneurons are recently hypothesized to be secondary to oxidative stress (Cabungcal et al., 2013; O'Donnell, 2012; Sullivan and O'Donnell, 2012). Therefore, the severe oxidative stress as indexed by reduced GSH and increased %GSSG, their correlation with gamma oscillations and MMN, support the proposal that these commonly observed ERP abnormalities in schizophrenia may be in part indexing an oxidative stress mechanism.

Our study also demonstrated that GSH and GSSG were associated with the composite functional measure UPSA. Higher GSH predicted higher scores while higher GSSG predicted lower scores, suggesting that an imbalance may be particularly detrimental. UPSA score is lower in schizophrenia patients (Twamley et al., 2002; Harvey et al., 2007) and serves as a strong predictor of community functioning outcome (Green et al., 2011). Mediation modeling effort supported that the 21–40 Hz response acted as an intermediate modulator for the relationship between GSH level and functioning. This finding is in line with results in animal models showing that oxidative stress could cause abnormalities in neurophysiological measures (Do et al., 2009) and subsequent altered social behaviors (Kulak et al., 2012). One important limitation of this analysis is that the mediation analysis was exploratory and under-powered given the small sample size, as the analysis was only possible in the combined sample and may have missed other important oscillatory components due to false negatives. Regardless, this path modeling contributes to transla-

tional research development by suggesting that 21–40 Hz gamma frequency response during the simple auditory oddball task is an intermediate biomarker that links oxidative stress to clinical functions.

In summary, we observed an association between oxidative stress in schizophrenia and changes in gamma band responses in the auditory oddball paradigm and clinical functioning. However, our study cannot confirm causality from oxidative stress to electro-physiological abnormalities and functional impairments. Experimental animal models are likely required for that purpose. Our effort only provides a clinically guided, suggestive path to establish such an animal model(s). Finally, the findings support that increased oxidative stress in schizophrenia patients should be considered as one of the important causal factors in studies of clinical electrophysiological anomalies and their treatments in schizophrenia.

Acknowledgments

Support was received from National Institutes of Health grants R01MH085646, R01DA027680, and R21DA033817. All authors report no conflict of interests.

References

- Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, et al. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 2010;13:76–83.
- Ben Othmen L, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, et al. Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:155–9.
- Berk M, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaiz I, et al. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia—a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry* 2008;64:361–8.
- Bramon E, Croft RJ, McDonald C, Virdi GK, Gruzeller JG, Baldeweg T, et al. Mismatch negativity in schizophrenia: a family study. *Schizophr Res* 2004;67:1–10.
- Cabungcal JH, Steullet P, Krafsik R, Cuenod M, Do KQ. Early-life insults impair parvalbumin interneurons via oxidative stress: reversal by N-acetylcysteine. *Biol Psychiatry* 2013;73:574–82.
- Carlen M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, et al. A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Mol Psychiatry* 2012;17:537–48.
- Carmeli C, Knyazeva MG, Cuenod M, Do KQ. Glutathione precursor N-acetylcysteine modulates EEG synchronization in schizophrenia patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS ONE* 2012;7:e29341.
- Cho RY, Konecky RO, Carter CS. Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:19878–83.
- Choi YB, Lipton SA. Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1535–41.
- Dakhale G, Khanzode S, Khanzode S, Saoji A, Khobragade L, Turankar A. Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology* 2004;49:205–9.
- Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, et al. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci* 2000;12:3721–8.
- Do KQ, Cabungcal JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19:220–30.
- Gandal MJ, Sisti J, Klook K, Ortinski PI, Leitman V, Liang Y, et al. GABA-mediated rescue of altered excitatory–inhibitory balance, gamma synchrony and behavioral deficits following constitutive NMDAR-hypofunction. *Transl Psychiatry* 2012;2:e142.
- Gawryluk JW, Wang JF, Andrezza AC, Shao L, Yatham LN, Young LT. Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14:1069–74.
- Green MF, Schooler NR, Kern RS, Frese FJ, Granberry W, Harvey PD, et al. Evaluation of functionally meaningful measures for clinical trials of cognition enhancement in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2011;168:400–7.
- Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 1980;106:207–12.
- Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2012;38:950–7.
- Guntherberg H, Rost J. The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Anal Biochem* 1966;15:205–10.

- Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, et al. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16621–6.
- Hall MH, Schulze K, Rijdsdijk F, Picchioni M, Ettinger U, Bramon E, et al. Heritability and reliability of P300, P50 and duration mismatch negativity. *Behav Genet* 2006;36:845–57.
- Harvey PD, Velligan DI, Bellack AS. Performance-based measures of functional skills: usefulness in clinical treatment studies. *Schizophr Bull* 2007;33:1138–48.
- Hassler U, Barreto NT, Gruber T. Induced gamma band responses in human EEG after the control of miniature saccadic artifacts. *NeuroImage* 2011;57:1411–21.
- Hayes AF. PROCESS: A versatile computational tool for observed variable mediation, moderation, and conditional process modeling. White Paper. 2012. Retrieved from <http://www.afhayes.com/public/process2012.pdf>.
- Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* 2007;27:11496–500.
- Hong LE, Summerfelt A, Mitchell BD, McMahon RP, Wonodi I, Buchanan RW, et al. Sensory gating endophenotype based on its neural oscillatory pattern and heritability estimate. *Arch Gen Psychiatry* 2008;65:1008–16.
- Hong LE, Summerfelt A, Buchanan RW, O'Donnell P, Thaker GK, Weiler MA, et al. Gamma and delta neural oscillations and association with clinical symptoms under subanesthetic ketamine. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:632–40.
- Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, et al. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3309–17.
- Kohr G, Eckardt S, Luddens H, Monyer H, Seeburg PH. NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron* 1994;12:1031–40.
- Javitt DC, Doneshka P, Zylberman I, Ritter W, Vaughan Jr HG. Impairment of early cortical processing in schizophrenia: an event-related potential confirmation study. *Biol Psychiatry* 1993;33:513–9.
- Javitt DC, Doneshka P, Grochowski S, Ritter W. Impaired mismatch negativity generation reflects widespread dysfunction of working memory in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995;52:550–8.
- Javitt DC, Steinschneider M, Schroeder CE, Arezzo JC. Role of cortical N-methyl-D-aspartate receptors in auditory sensory memory and mismatch negativity generation: implications for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11962–7.
- Javitt DC, Grochowski S, Shelley AM, Ritter W. Impaired mismatch negativity (MMN) generation in schizophrenia as a function of stimulus deviance, probability, and interstimulus/interdeviant interval. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1998;108:143–53.
- Javitt DC, Shelley A, Ritter W. Associated deficits in mismatch negativity generation and tone matching in schizophrenia. *Clin Neurophysiol* 2000;111:1733–7.
- Javitt DC, Schoepp D, Kalivas PW, Volkow ND, Zarate C, Merchant K. Translating glutamate: from pathophysiology to treatment. *Sci Transl Med* 2011;3:102m2.
- Kulak A, Cuenod M, Do KQ. Behavioral phenotyping of glutathione-deficient mice: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Behav Brain Res* 2012;226:563–70.
- Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 2002;20:171–5.
- Lavoie S, Murray MM, Deppen P, Knyazeva MG, Berk M, Boulat O, et al. Glutathione precursor, N-acetyl-cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:2187–99.
- Light GA, Hsu JL, Hsieh MH, Meyer-Gomes K, Sprock J, Swerdlow NR, et al. Gamma band oscillations reveal neural network cortical coherence dysfunction in schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 2006;60:1231–40.
- Magno E, Yeap S, Thakore JH, Garavan H, De Sanctis P, Foxe JJ. Are auditory-evoked frequency and duration mismatch negativity deficits endophenotypic for schizophrenia? High-density electrical mapping in clinically unaffected first-degree relatives and first-episode and chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2008;64:385–91.
- Miljevic C, Nikolic M, Nikolic-Kokic A, Jones DR, Niketic V, Lecic-Tosevski D, et al. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:303–7.
- Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, et al. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* 2012;62:1574–83.
- Nicol RM, Chapman SC, Vertes PE, Nathan PJ, Smith ML, Shtyrov Y, et al. Fast reconfiguration of high-frequency brain networks in response to surprising changes in auditory input. *J Neurophysiol* 2012;107:1421–30.
- O'Donnell P. Adolescent onset of cortical disinhibition in schizophrenia: insights from animal models. *Schizophr Bull* 2011;37:484–92.
- O'Donnell P. Cortical interneurons, immune factors and oxidative stress as early targets for schizophrenia. *Eur J Neurosci* 2012;35:1866–70.
- Patterson TL, Goldman S, McKibbin CL, Hughs T, Jeste DV. UCSD Performance-Based Skills Assessment: development of a new measure of everyday functioning for severely mentally ill adults. *Schizophr Bull* 2001;27:235–45.
- Preacher KJ, Hayes AF. SPSS and SAS procedures for estimating indirect effects in simple mediation models. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2004;36:717–31.
- Preacher KJ, Kelley K. Effect size measures for mediation models: quantitative strategies for communicating indirect effects. *Psychol Methods* 2011;16:93–115.
- Raffa M, Atig F, Mhalla A, Kerkeni A, Mechri A. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naïve first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry* 2011;11:124.
- Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res* 2003;121:109–22.
- Shelley AM, Ward PB, Catts SV, Michie PT, Andrews S, McConaghy N. Mismatch negativity: an index of a preattentive processing deficit in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1991;30:1059–62.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 2009;459:698–702.
- Spencer KM, Nestor PG, Perlmutter R, Niznikiewicz MA, Klump MC, Frumin M, et al. Neural synchrony indexes disordered perception and cognition in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17288–93.
- Steullet P, Cabungcal JH, Kulak A, Kraftsik R, Chen Y, Dalton TP, et al. Redox dysregulation affects the ventral but not dorsal hippocampus: impairment of parvalbumin neurons, gamma oscillations, and related behaviors. *J Neurosci* 2010;30:2547–58.
- Sullivan EM, O'Donnell P. Inhibitory interneurons, oxidative stress, and schizophrenia. *Schizophr Bull* 2012;38:373–6.
- Twamley EW, Doshi RR, Nayak GV, Palmer BW, Golshan S, Heaton RK, et al. Generalized cognitive impairments, ability to perform everyday tasks, and level of independence in community living situations of older patients with psychosis. *Am J Psychiatry* 2002;159:2013–20.
- Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:100–13.
- Umbricht D, Krljes S. Mismatch negativity in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 2005;76:1–23.
- Umbricht D, Schmid L, Koller R, Vollenweider FX, Hell D, Javitt DC. Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:1139–47.
- Umbricht DS, Bates JA, Lieberman JA, Kane JM, Javitt DC. Electrophysiological indices of automatic and controlled auditory information processing in first-episode, recent-onset and chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006;59:762–72.
- Welch PD. The use of fast fourier transform for estimation of power spectra: a method based on time averaging over short, modified periodograms. *IEEE Trans Audio Electroacoust* 1967;AU-15:70–3.
- Wood SJ, Berger GE, Wellard RM, Proffitt TM, McConchie M, Berk M, et al. Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: a 1H-MRS investigation. *Neurobiol Dis* 2009;33:354–7.
- Yao JK, Leonard S, Reddy R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis Markers* 2006;22:83–93

ARTICLE IN PRESS

SCHRES-05305; No of Pages 6

Schizophrenia Research xxx (2013) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

No evidence of exogenous origin for the abnormal glutathione redox state in schizophrenia

Alejandro Ballesteros^{a,b}, Pan Jiang^a, Ann Summerfelt^a, Xiaoming Du^a, Joshua Chiappelli^a, Patricio O'Donnell^{a,c}, Peter Kochunov^a, L. Elliot Hong^a

Maryland Psychiatric Research Center, Department of Psychiatry, University of Maryland School of Medicine, 55 Wade Avenue, 21228 Catonsville, MD, USA
Hospital Clínico de Salamanca, Department of Psychiatry, Calle de San Vicente 182, 37007 Salamanca, Spain
Department of Anatomy & Neurobiology, University of Maryland School of Medicine, 685 West Baltimore Street, 21201 Baltimore, MD, USA

article info

Article history:
Received 20 January 2013
Accepted 4 February 2013
Available online xxxx

Keywords:
Antioxidant
Food
Smoking
Antipsychotic
Glutathione
GSH
GSSG

abstract

Schizophrenia has been associated with low glutathione (GSH), one of the most important substrates for natural defense against oxidative stress. This abnormality is often attributed to genetic or other pathological causes. However, low GSH in schizophrenia could also be due to insufficient antioxidant consumption or other exogenous factors. We evaluated GSH in relation to diet, smoking, and medication status in schizophrenia patients. We recruited 54 participants (29 schizophrenia patients and 25 normal controls). The Antioxidant Dietary Source Questions was used to estimate the total antioxidant capacity (TAC) from participants' diet. GSH and the oxidized form of glutathione (GSSG) were assayed. We found that GSH was significantly lower ($p < 0.001$) while %GSSG was 2 to 5 fold higher ($p = 0.023$) in patients compared with controls. No evidence for lower TAC dietary intake was found in schizophrenia patients compared with controls; rather nominally higher TAC level was found in the patients diet ($p = 0.02$). Analysis of consumption of individual food categories also failed to find evidence of reduced dietary antioxidant intake in schizophrenia patients. Smoking and medications did not significantly predict the GSH deficit either. However, there was a significant smoking by diagnosis interaction on GSH ($p = 0.026$) such that smoking was associated with higher GSH level in controls while smoking in patients was not associated with this effect. Schizophrenia patients may have an impaired upregulation of GSH synthesis that normally occurs due to smoking-induced antioxidative response. Lower GSH was independently present in patients on clozapine ($p = 0.005$) and patients on other antipsychotics ($p < 0.001$) compared with controls. In conclusion, none of the exogenous sources played a major role in explaining abnormalities in the glutathione pathway in patients. The state of abnormal glutathione redox may therefore be a part of schizophrenia pathophysiology.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia has been associated with increased oxidative stress (Do et al., 2009; Kano et al., 2012). In aerobic cells, reactive oxygen species (ROS) and free radicals are byproducts of oxidative metabolism. The defense against oxidative stress is complex, involving multiple enzymes and antioxidant compounds. One of the major mechanisms for sequestration of ROS and free radicals is through the glutathione pathway where the reduced form of glutathione (monomeric glutathione or GSH) is converted to its oxidized form (glutathione disulfide or GSSG). Glutathione is present mainly (~99%) in GSH form in the body (Lenton et al., 1999). Although there are multiple defense systems and several of them have shown to be abnormal in schizophrenia, low GSH concentration is perhaps among the most consistently reported

in schizophrenia. Low GSH has been found in post-mortem brain samples (Yao et al., 2006; Gawryluk et al., 2011) and in-vivo magnetic resonance spectroscopy studies (Do et al., 2000; Wood et al., 2009). GSH levels were decreased in the blood of antipsychotics-free and antipsychotics-treated patients (Raffa et al., 2009) and in cerebrospinal fluid of drug-naïve patients (Do et al., 2000) suggesting that it is not secondary to antipsychotics. Taken together, low GSH level in schizophrenia provides a good index of an abnormal redox state associated with this illness, which is relatively consistently observed and not attributed solely to treatment with antipsychotics. Administration of the glutathione precursor *n*-acetylcysteine (NAC) improved clinical symptoms in patients (Berk et al., 2008), further supporting the association of oxidative stress with schizophrenia. However, it is unclear whether the mechanism that produces such effects is a direct result of pathophysiology associated with schizophrenia, an indirect result of other related pathology, or arising from sources outside the primary disease process that may differ between patients and controls. Hence, we examined the potential role of three exogenous factors in mediating

Corresponding author at: Maryland Psychiatric Research Center, P.O. Box 21247, Baltimore, MD 21228, USA. Tel.: +1 410 402 6828; fax: +1 410 402 6023.
E-mail address: ehong@mprc.umaryland.edu (L.E. Hong).

0920-9964/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2013.02.001>

Please cite this article as: Ballesteros, A., et al., No evidence of exogenous origin for the abnormal glutathione redox state in schizophrenia, *Schizophrenia Research*, (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2013.02.001>

ARTICLE IN PRESS

2

A. Ballesteros et al. / Schizophrenia Research xxx (2013) xxx–xxx

oxidative stress, as indexed by abnormal GSH and GSSG levels, in schizophrenia: diet, smoking and antipsychotics.

First, diet is an important source of variance in oxidative stress in the general population (Jenkinson et al., 1999; Watson et al., 2005). We assessed whether there is a deficit in intake of antioxidants in food in schizophrenia, as dietary antioxidant contents provide the substrate and also regulate enzymes in the redox pathways (Bagchi et al., 1997; Huber et al., 2002). One prior study found no evidence of reduced antioxidant intake in schizophrenia (Strassnig et al., 2005). Another study showed that lower plasma antioxidant levels were not correlated with body mass (Reddy et al., 2003). However, to date no study has assessed whether dietary antioxidant intake affects the reported glutathione deficit in schizophrenia.

Second, smoking can contribute to oxidative stress by increasing lipid peroxidation (Solak et al., 2005). However, smoking also induces a potent antioxidant response and increases systemic production of glutathione (Gould et al., 2011). One study found increases in antioxidant enzymes in schizophrenic patients who smoke (Zhang et al., 2007). More data are needed to clarify if smoking contributes to the decreased glutathione in schizophrenia.

Third, the oxidative profile of antipsychotics remains unclear; some studies show antioxidant properties (Parikh et al., 2003; Miljevic et al., 2010; Stojković et al., 2012; Zhang et al., 2012) or improvement of peripheral glutathione and antioxidant enzymes by antipsychotics (Raffa et al., 2009; Zhang et al., 2012). On the other hand, patients on clozapine have shown higher superoxide dismutase and lower glutathione peroxidase, which was interpreted as secondary to increased oxidative stress by clozapine (Miljevic et al., 2010). Hence, we tested if clozapine versus non-clozapine antipsychotics were correlated with glutathione abnormalities in schizophrenia.

2. Methods

2.1. Participants

We recruited 54 participants (age range 18–62 years): 29 medicated patients and 25 normal controls, frequency-matched on age, gender and smoking status (Table 1). Patients were recruited from outpatient clinics of Maryland Psychiatric Research Center and neighboring community clinics. Controls were recruited using local media advertisements. Exclusion criteria included major medical and neuro-logical illnesses, history of head injury with cognitive sequelae, mental retardation, substance dependence within the past 6 months or current alcohol or illicit drug abuse. Participants taking dietary supplements with antioxidant contents or drugs that inhibit beta-oxidation including acetaminophen and ibuprofen (Pessayre et al., 1999) on regular basis were excluded. The Structured Clinical Interview

for DSM-IV (SCID) was administered to all subjects to obtain DSM-IV diagnoses. Controls were interviewed with SCID and had no DSM IV Axis I diagnosis and no family history of psychosis in 3 generations. Patients were clinically stable individuals with DSM-IV schizophrenia on antipsychotics. The dose of the antipsychotics was converted to chlorpromazine equivalent (CPZ). Among these patients, 3 were on first generation antipsychotic medications (CPZ of daily dose=117.1±23.4 mg) and the rest was on second generation antipsychotics: including 12 on clozapine (368.8±137.5 mg), 3 on aripiprazole (18.3±10.4 mg), 3 on risperidone (6.7±4.6 mg), 2 on olanzapine (10.0±7.1 mg), 2 on quetiapine (800.0±282.8 mg) and the remaining on 2 or more antipsychotic medications. All subjects gave written informed consent in accordance with local Institutional Review Board guidelines.

2.2. Measurement of GSH and GSSG

Participants were instructed to avoid strenuous physical exercise 24 h before, to fast overnight and not to smoke in the morning on the day of the blood draw. Venous whole blood sample was drawn between 8:30 AM to 10:30 AM. The key step of sample preparation was to prevent GSH, the predominant form of glutathione, to be oxidized into GSSG (so that GSSG can be accurately measured). GSSG samples were mixed with a pyridine derivative thiol-scavenging reagent before freezing. This redox scavenger overcomes shortfalls of other methods associated with undesirable enzyme reactivity or slow rate reaction (Güntherberg and Rost, 1966; Griffith, 1980). The scavenging reagent is a proprietary product by Oxford Biomedical Research Inc., Rochester Hills, MI, USA. It is related to the M2VP (1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethane-sulfonate) described in the literature (Tietze, 1969), an approach with the advantage of complete scavenging of GSH in less than 1 min, compared to other methods that could take 60 min to remove GSH in the sample during which time oxidation of GSH may occur, resulting in overestimation of the GSSG concentration. Scavenger-processed (for GSSG) and unprocessed (for GSH) whole blood samples were immediately stored at -80 °C to avoid in vitro oxidation by room temperature and cellular lysis (blood draw occurred in the freezer room). At the end of the study, all samples were shipped using a secured dry ice container to Oxford Biomedicals, who performed GSH and GSSG assays in one batch blind to subject information. The reaction of GSH with Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)) gave rise to a product quantified spectrophotometrically at 412 nm. This reaction was used to measure the reduction of GSSG to GSH and its rate is proportional to GSH and GSSG concentrations (Iwasaki et al., 2009). The assay uses an eight-point standard curve for both total GSH and GSSG determinations. Given the predominant form is GSH (Lenton et al., 1999), GSSG is more meaningful when expressed as %GSSG

Table 1
Demographic, clinical characteristics, and dietary total antioxidant capacity (TAC) intake.

	Normal controls (N=25)	Schizophrenia patients (N=29)	Statistics	P values
Age (years)	38.76±13.72 ¹	41.10±13.81	0.009	0.55
Sex (male:female)	11:14	20:9	2.48	0.12
Smoker:Nonsmoker	7:18	8:21	0.00	1.00
Education (year)	13.4±1.6	12.1±2.0	5.77	0.020
Age of illness onset (year)	n/a	21.4±8.4	n/a	n/a
Duration of illness (year)	n/a	20.0±13.4	n/a	n/a
BPRS score	n/a	43.28±9.93	n/a	n/a
UPSA-2	102.9±10.3	90.7±10.5	17.62	b0.001
Fasting duration (hours)	12.18±2.81	12.48±3.64	0.11	0.74
GSH (µmol/L)	800.50±201.73	516.50±238.40	21.06	b0.001
GSSG (µmol/L)	19.96±24.82	27.94±23.19	8.56	0.005
%GSSG	2.40±3.02	12.43±24.18	2.28	0.023
TAC intake/week (µmol FRAP/week)	12,620.6±1046.2	15,257.7±1800.0	1.48	0.23

BPRS: Brief Psychiatric Rating Scale total score. UPSA-2: the University of California San Diego Performance-based Skills Assessment, 2nd edition total score (the data for controls was from 23 subjects because 2 controls did not complete UPSA-2).

¹ Values are mean±sd.

[(GSSG/total glutathione)×100], which was the primary measure for GSSG. Note that whole blood, not serum or plasma, GSH and GSSG were measured here.

2.3. Antioxidant Dietary Source Questions (ADS)

We developed the ADS Questions based on similar studies (Rietveld and Wiseman, 2003; Santarelli et al., 2010; Ellinger et al., 2011) by including types of food with antioxidant contents common in the dietary habits of people in the Northeast and Mid-Atlantic regions of the U.S., such as fruits, vegetables, nuts, and cereals, among others. Each nutrient was recorded as weekly average of portion sizes over the previous 6 months using a self-reporting format. Items and portion sizes were derived from USDA National Nutrient Database for Standard Reference and similar guides (e.g., <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/>; <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/>; <http://www.nutfruit.org/>; Wu et al., 2004). Intake information was converted to total antioxidant capacity (TAC), calculated on the ferric reducing antioxidant power (FRAP) based on reference values from the standard food composition table (Carlsen et al., 2010). A summary for included food categories is in Table 2. The actual ADS Questionnaire and the ADS Conversion table are freely available to readers upon request.

2.4. Clinical and functional assessments

To determine whether GSH and GSSG are related to clinical symptoms, we used the 20-item Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) total score to estimate overall symptom severity. To assess psychosocial functioning in all subjects, we used the University of California San Diego Performance-based Skills Assessment, 2nd edition (UPSA-2). UPSA-2 is a proxy measure of function that assesses simulated life and community skills in 5 areas (Patterson et al., 2001; Twamley et al., 2002; Harvey et al., 2007). The total score was used to estimate overall everyday functioning.

2.5. Statistical analysis

ANOVA was used to assess patient–control differences on GSH, GSSG, and %GSSG. Univariate ANOVA was used to examine smoking status by group interaction on GSH and GSSG. Data normality was verified using the Kolmogorov–Smirnov goodness-of-fit test. Mann–Whitney U tests were used when data did not follow normal distribution. Correlations were performed using Spearman's rank order tests. GSH and GSSG contributions to clinical symptom and function were assessed by linear regressions where a clinical assessment was the dependent variable and GSH and GSSG were predictors. GSSG instead

of %GSSG was used in regression analysis for maximizing the independence of the two predictors. All tests were two-tailed.

3. Results

3.1. GSH and %GSSG levels

Fasting whole blood GSH levels were significantly lower in patients compared with controls (pb 0.001) (Fig. 1A). Fasting GSSG levels were significantly higher in patients vs. controls: patients showed over 5-fold higher in %GSSG compared with controls (p=0.023) (Fig. 1B). %GSSG in patients also showed large variance: three patients had %GSSG>50%, largely because they had GSH levels close to zero. The difference remained significant (p=0.027) even upon removal of these extreme cases: patients still had over 2-fold higher %GSSG compared with controls (Fig. 1C). GSH and GSSG were not significantly correlated in either controls (r=0.03, p=0.90) or patients (r=-0.09, p=0.66). Age was not significantly associated with blood GSH level in patients or controls (r=-0.21, p=0.27 and r=-0.26, p=0.21, respectively). Using age as covariate in comparisons of GSH between patients and controls, we found that age had a trend effect (F=3.17, p=0.08) but little effect on the difference in GSH between the two groups (F=10.68, pb 0.001). We further divided the subjects into two groups: younger adults aged 45 or below and older adults aged above 45. We found that GSH remained significantly different between controls and patients in the younger age range (832.3±239.5 vs. 567.4±174.5, respectively, F=12.20, p=0.002) and in the older age range (760.0±140.9 vs. 453.9±294.5, respectively, F=9.91, p=0.005).

3.2. Dietary total antioxidant capacity (TAC)

Based on ADS, average recent dietary TAC was not reduced in patients compared with controls. Rather, a nominally significantly higher TAC was observed in patients compared with controls (p=0.02) (Table 2). Of individual dietary items or categories, only fruit juice showed a nominally significant group difference such that patients obtained more TAC from fruit juice than controls (p=0.04). None of the comparisons was statistically significant after Bonferroni corrections for multiple comparisons. In controls, total dietary TAC demonstrated a positive but non-significant correlation with GSH (r=0.34, p=0.10) and a negative, but non-significant correlation with %GSSG (r=-0.29, p=0.16). In patients, correlations between TAC and GSH (r=-0.10, p=0.61) and %GSSG (r=0.21, p=0.28) were also non-significant. These findings suggested that dietary TAC may contribute to more GSH and less GSSG in normal controls, albeit only at trend levels, and this relationship appeared more obscure in patients.

3.3. Smoking

There was a significant smoking by diagnosis interaction on GSH (p=0.026). There was no difference in GSH concentrations between smokers and non-smokers in the whole sample (651.5±329.8 vs. 646.6±236.6, respectively, p=0.93) or in patients (417.3±121.5 vs. 554.3±262.6, respectively, p=0.17). The difference approached significance in controls (smokers: 919.0±282.8 vs. nonsmokers: 754.4±145.6, p=0.06). The significant interaction was due to an opposite trend of high GSH in control smokers but lower GSH in patient smokers compared with the respective nonsmokers. There was no significant smoking×diagnosis interaction on %GSSG (p=0.38). %GSSG was not significantly different between smokers and nonsmokers in the combined sample (p=0.42), normal controls (p=0.62), or patients (p=0.38). The three patients with high %GSSG were all nonsmokers. Finally, there were no significant correlations between number of cigarettes smoked per day and GSH (r=0.11, p=0.74) or %GSSG (r=0.16, p=0.64).

Table 2
Weekly total antioxidant capacity (TAC) of each dietary item or category, based on the Antioxidant Dietary Source Questions.

Dietary food items	Total antioxidant capacity/week ($\mu\text{mol FRAP}/\text{week}$)		F	P
	Normal controls (N=25)	Schizophrenia patients (N=29)		
Fruit	2582.73±469.88 ¹	3223.63±478.62	0.9	0.35
Vegetable	2711.62±352.15	2515.71±304.14	0.18	0.67
Wine	212.5351±58.30	215.94±103.05	0.01	0.98
Juice	4606.69±915.68	8362.29±858.01	8.945	0.04
Nut products	2120.48±513.29	2307.85±597.07	0.06	0.82
Dry fruit	635.58±170.39	934.67±333.70	0.58	0.45
Bread	2334.96±363.07	2265.72±355.43	0.02	0.89
Cereal	900.57±186.57	1368.37±221.83	2.51	0.12
Baking chocolate	704.49±272.54	1735.19±661.96	1.86	0.18
Milk chocolate	197.31±46.18	283.50±68.66	1.02	0.32
Total	22,580.72±2124.20	24,307.89±2204.54	5.78	0.02

¹ Values are mean±mean error (sd).
Nominally significant.

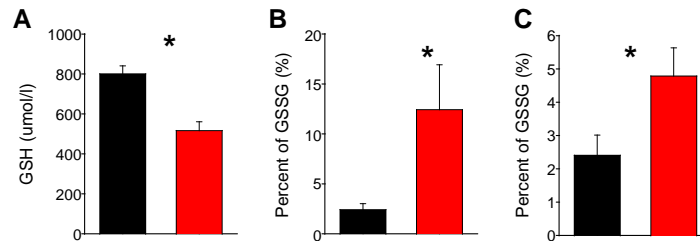


Fig. 1. (A) The reduced form of glutathione (GSH) in schizophrenia patients (red bar) was significantly lower compared with controls (black bar) (* $p < 0.001$). (B) Percent of the oxidized form of glutathione (GSSG) was significantly increased in schizophrenia patients compared with controls (* $p = 0.023$). Note the large variance in the patient group, due to %GSSG over 50% in 3 patients. (C) However, even after removing the 3 patients with extremely high %GSSG, patients were still significantly different from controls in %GSSG (* $p = 0.027$).

3.4. Antipsychotic medications

Correlations between antipsychotic CPZ and GSH and GSSG were not significant ($r = -0.26$ and -0.25 , respectively, $n = 29$, all $p > 0.40$). Separating patients into clozapine vs. other antipsychotics subgroup, lower GSH was present independently in clozapine (559.2 ± 238.3) ($p = 0.005$) and other antipsychotics subgroup (486.4 ± 241.0) ($p = 0.001$) compared with normal controls (800.5 ± 201.7). Increased %GSSG was also present in both clozapine ($10.6 \pm 23.6\%$) and other anti-psychoics subgroups ($13.7 \pm 25.3\%$) compared with controls ($2.4 \pm 3.0\%$) although they were not statistically significant ($p = 0.051$ – 0.20). Clozapine dose was not significantly correlated with GSH level ($r = -0.01$, $p = 0.97$), but significantly and inversely correlated with %GSSG level ($r = -0.65$, $n = 12$, $p = 0.02$) such that higher clozapine doses were associated with lower GSSG.

3.5. Clinical and functional implications

GSH and GSSG were not significantly correlated with age of psychosis illness onset ($r = 0.04$, $p = 0.83$ and $r = -0.20$, $p = 0.32$, respectively) or duration of illness ($r = -0.18$, $p = 0.36$ and $r = -0.10$, $p = 0.62$, respectively) in schizophrenia patients. In the regression analysis of GSH and GSSG contributions to BPRS total score in patients, the model was not significant ($F_{(2, 26)} = 0.30$, $p = 0.74$). In the regression analysis of GSH and GSSG contributions to UPSA-2, the model was significant ($F_{(2, 49)} = 4.36$, $R^2 = 15.1\%$, $p = 0.018$) with tolerable colinearity statistics ($VIF = 1.02$). GSH level significantly contributed to higher function ($t = 2.08$, $R^2 = 8.0\%$, $p = 0.045$) while GSSG level significantly contributed to lower function ($t = -2.22$, $R^2 = 7.1\%$, $p = 0.031$).

4. Discussion

This study tested the hypothesis that dietary antioxidant intake, smoking, and antipsychotic medication contribute to abnormal GSH and GSSG levels in schizophrenia. We found no evidence to support the hypothesis that these factors are the primary sources for the abnormal glutathione redox state in patients (Table 2).

Smoking is highly prevalent in schizophrenia (Cooper et al., 2012) although its potential role in the oxidative stress abnormalities in schizophrenia remains unclear. Interestingly, control smokers showed a trend of higher GSH compared with control nonsmokers, whereas the opposite trend was observed in patients. This may seem paradoxical. However, increased redox response to smoking has been observed in chronic obstructive pulmonary disorder patients (Gould et al., 2011). It is possible that in control subjects smoking activated the available redox response, leading to increase in GSH levels; while in patients smoking did not change or even led to a decrease in GSH levels, which would be consistent with their impaired upregulation of GSH synthesis under oxidative stress conditions as reported by Gysin et al. (2007).

Beyond that, we found no evidence that smoking accounted for the low GSH concentration in patients. Low GSH/high GSSG state in patients remained significantly different from controls even when smoking status was matched between patients and controls. Smoking severity was also not significantly correlated with GSH or GSSG levels.

We also found no evidence that GSH or GSSG were influenced by medication levels as measured by daily dose, but this does not rule out potential effect from chronic medication exposure. Lower GSH has been seen in treatment-naïve or unmedicated patients (Do et al., 2000; Raffa et al., 2009, 2011), supporting that decreased GSH is present even without antipsychotics. We also showed that GSH was significantly decreased in patients regardless of clozapine use, ruling out a substantial impact of clozapine on the observed deficit. We found an inverse relationship between clozapine dose and concentration of oxidized glutathione (GSSG), which may complement previous findings of reduced glutathione peroxidase activity in clozapine-treated patients (Miljevic et al., 2010). Dose-dependent inhibition of glutathione peroxidase activity by clozapine may contribute to conflicting results regarding activity of this enzyme in schizophrenia vs. healthy controls (Kuloglu et al., 2002; Ranjekar et al., 2003; Dakhale et al., 2004; Yao et al., 2006; Ben Othmen et al., 2008; Raffa et al., 2011).

GSH and GSSG levels were significantly associated with everyday functioning as measured by UPSA-2, suggesting that 1) GSH is related to better functioning; 2) GSSG may have the opposite effect, and 3) UPSA-2 appears sensitive to glutathione redox state. UPSA-2 is a well-validated measure of psychosocial functioning (Patterson et al., 2001; Twamley et al., 2002; Harvey et al., 2007). If replicated by other studies, this would underscore the clinical relevance of oxidative stress abnormalities in schizophrenia by connecting a pathophysiological mechanism to real-world functioning. However, we did not find a significant correlation with BPRS. We speculate that perhaps BPRS is a measure that is more biased by various medications while UPSA is a trait-like measure of functional capacity and thus more likely to demonstrate significant correlations with GSH/GSSG. Further studies are necessary to more fully understand how oxidative stress can contribute to poor psychosocial functioning.

A growing body of evidence implicates oxidative stress as an important component of schizophrenia pathophysiology, with deficits in glutathione synthesis (Gysin et al., 2007), regeneration (Yao et al., 2006) and impaired antioxidant enzyme activity contributing to abnormal redox balance. Oxidative stress appears to be an important mechanism in schizophrenia neurodevelopmental models. Genetic factors and early environmental insults may create a state of redox dysregulation, with downstream effects on NMDA regulation, myelination, and functional connectivity between brain regions (Do et al., 2009). Indeed, developmental animal models converge in identifying cortical inhibitory interneurons as a cell type vulnerable to the effects of oxidative stress (Sullivan and O'Donnell, 2012).

The study is limited by its retrospective, recall-based design of the ADS; the precision of data on dietary antioxidant intake is likely biased by recall related errors, which could mask small but still significant relationships between diet and GSH/GSSG levels. The sample size here was small, which may in part also explain an insignificant correlation between GSH and dietary TAC ($r=0.34$, $p=0.10$). It is also possible that dietary TAC may have a more direct relationship with other antioxidant defense mechanisms that were not captured by the GSH/GSSG indices. Another limitation is that GSH was peripheral-ly measured; the relationship between levels of GSH in the periphery and in brain tissue remains unclear. However, oral administration of glutathione precursor has shown to robustly enhance GSH level in brain tissue (Nehru and Kanwar, 2007), which indirectly supports a central-peripheral correlation because by definition, dietary supplements are peripheral. Lower total glutathione blood level also significantly predicts greater brain volume decrease in a two-year longitudinal study of first episode psychosis patients (Fraguas et al., 2012). Such evidence provides reasonable support that some associations are likely present between peripheral GSH and brain functions.

We replicated the finding of decreased GSH and elevated GSSG in schizophrenia. Our study supports that this state of redox dysregulation is likely to be intrinsic to the disorder. Evidence found in this study demonstrates the importance of this physiological index in terms of psycho-social functioning. Further study of impairments in antioxidant defenses should contribute to our understanding of the etiology of schizophrenia and identify targets for intervention.

Role of funding source

Support was received from National Institutes of Health grants R01MH085646, R01DA027680, and R21DA033817.

Contributors

Elliot Hong and Alejandro Ballesteros designed the study. Ann Summerfelt, Pan Jiang and Alejandro Ballesteros collected the data. Elliot Hong and Alejandro Ballesteros managed literature searches and data analyses, and wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to interpretation of results, participated in critical revision of manuscript drafts and approved the final version.

Conflict of interest

All authors report no conflict of interests.

Acknowledgment

There are no further acknowledgements.

References

- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Tran, M.X., Stohs, S.J., 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 95 (2), 179–189.
- Ben Othmen, L., Mechri, A., Fendri, C., Bost, M., Chazot, G., Gaha, L., Kerkeni, A., 2008. Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 155–159.
- Berk, M., Copolov, D., Dean, O., Lu, K., Jeavons, S., Schapkaiz, I., Anderson-Hunt, M., Judd, F., Katz, F., Katz, P., Ording-Jespersen, S., Little, J., Conus, P., Cuenod, M., Do, K.Q., Bush, A.I., 2008. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia — a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol. Psychiatry* 64 (5), 361–368.
- Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Holte, K., Bohn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W.C., Phillips, K.M., Jacobs Jr., D.R., Blomhoff, R., 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr. J.* 9, 3.
- Cooper, J., Mancuso, S.G., Borland, R., Slade, T., Galletly, C., Castle, D., 2012. Tobacco smoking among people living with a psychotic illness: THE second Australian survey of psychosis. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 46 (9), 851–863.
- Dakhale, G., Khanzode, S., Khanzode, S., Saoji, A., Khobragade, L., Turankar, A., 2004. Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology* 49, 205–209.
- Do, K.Q., Trabesinger, A.H., Kirsten-Krüger, M., Lauer, C.J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., Cuenod, M., 2000. Schizophrenia glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 12 (10), 3721–3728.
- Do, K.Q., Cabungcal, J.H., Frank, A., Steullet, P., Cuenod, M., 2009. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19 (2), 220–230.

- Ellinger, S., Müller, N., Stehle, P., Ulrich-Merzenich, G., 2011. Consumption of green tea or green tea products: is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies? *Phytotherapy* 18 (11), 903–915.
- Fraguas, D., Gonzalez-Pinto, A., Micó, J.A., Reig, S., Parellada, M., Martínez-Cengotitabengoa, M., Castro-Fornieles, J., Rapado-Castro, M., Baeza, I., Janssen, J., Desco, M., Leza, J.C., Arango, C., 2012. Decreased glutathione levels predict loss of brain volume in children and adolescents with first-episode psychosis in a two-year longitudinal study. *Schizophr. Res.* 137, 58–65.
- Gawryluk, J.W., Wang, J.F., Andrezza, A.C., Shao, L., Yatham, L.N., Young, L.T., 2011. Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14 (8), 1069–1074.
- Gould, N.S., Min, E., Gauthier, S., Martin, R.J., Day, B.J., 2011. Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure. *Respir. Res.* 12, 133.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106 (1), 207–212.
- Güntherberg, H., Rost, J., 1966. The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Anal. Biochem.* 15 (2), 205–210.
- Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tosic, M., Werge, T., Cuénod, M., Do, K.Q., 2007. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (42), 16621–16626.
- Harvey, P.D., Velligan, D.I., Bellack, A.S., 2007. Performance-based measures of functional skills: usefulness in clinical treatment studies. *Schizophr. Bull.* 33, 1138–1148.
- Huber, W.W., Prustomersky, S., Delbanco, E., Uhl, M., Scharf, G., Turesky, R.J., Thier, R., Schulte-Hermann, R., 2002. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyltransferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol. *Arch. Toxicol.* 76 (4), 209–217.
- Iwasaki, Y., Saito, Y., Nakano, Y., Mochizuki, K., Sakata, O., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H., 2009. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (28), 3309–3317.
- Jenkinson, A., Franklin, M.F., Wahle, K., Duthie, G.G., 1999. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 (7), 523–528.
- Kano, S., Colantuoni, C., Han, F., Zhou, Z., Yuan, Q., Wilson, A., Takayanagi, Y., Lee, Y., Rapoport, J., Eaton, W., Cascella, N., Ji, H., Goldman, D., Sawa, A., 2012. Genome-wide profiling of multiple histone methylations in olfactory cells: further implications for cellular susceptibility to oxidative stress in schizophrenia. *Mol. Psychiatry*. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.120> [Electronic publication ahead of print].
- Kuloglu, M., Ustundag, B., Atmaca, M., Canatan, H., Tezcan, A.E., Cinkilinc, N., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bi-polar disorder. *Cell Biochem. Funct.* 20, 171–175.
- Lenton, K.J., Theriault, H., Wagner, J.R., 1999. Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 274 (1), 125–130.
- Miljevic, C., Nikolic, M., Nikolic-Kokic, A., Jones, D.R., Niketic, V., Lecic-Tosevski, D., Spasic, M.B., 2010. Lipid status, antioxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 303–307.
- Nehru, B., Kanwar, S.S., 2007. Modulation by N-acetylcysteine of lead-induced alterations in rat brain: reduced glutathione levels and morphology. *Toxicol. Mech. Methods* 17, 289–293.
- Parikh, V., Khan, M.M., Mahadik, S.P., 2003. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 37 (1), 43–51.
- Patterson, T.L., Goldman, S., McKibbin, C.L., Hughs, T., Jeste, D.V., 2001. UCSD Performance-Based Skills Assessment: development of a new measure of everyday functioning for severely mentally ill adults. *Schizophr. Bull.* 27 (2), 235–245.
- Pessayre, D., Mansouri, A., Haouzi, D., Fromenty, B., 1999. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol. Toxicol.* 15 (6), 367–373.
- Raffa, M., Mechri, A., Othman, L.B., Fendri, C., Gaha, L., Kerkeni, A., 2009. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33 (7), 1178–1183.
- Raffa, M., Atig, F., Mhalla, A., Kerkeni, A., Mechri, A., 2011. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naïve first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry* 11, 124.
- Ranjekar, P.K., Hinge, A., Hegde, M.V., Ghate, M., Kale, A., Sitasawad, S., Wagh, U.V., Debsikdar, V.B., Mahadik, S.P., 2003. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res.* 121 (2), 109–122.
- Reddy, R., Keshavan, M., Yao, J.K., 2003. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 62 (3), 205–212.
- Rietveld, A., Wiseman, S., 2003. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J. Nutr.* 133 (10), 3285S–3292S.
- Santarelli, R.L., Vendevure, J.L., Naud, N., Taché, S., Guéraud, F., Viau, M., Genot, C., Corpet, D.E., Pierre, F.H., 2010. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 3 (7), 852–864.
- Solak, Z.A., Kubaroglu, C., Cok, G., Parildar, Z., Bayindir, U., Ozmen, D., Bayindir, O., 2005. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxanase activity in healthy people. *Clin. Exp. Med.* 5 (3), 99–105.
- Stojković, T., Radonjić, N.V., Velimirović, M., Jevtic, G., Popović, V., Doknić, M., Petronijević, N.D., 2012. Risperidone reverses phenylcyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39 (1), 192–199.

ARTICLE IN PRESS

6

A. Ballesteros et al. / Schizophrenia Research xxx (2013) xxx–xxx

- Strassnig, M., Singh Brar, J., Ganguli, R., 2005. Dietary fatty acid and antioxidant intake in community-dwelling patients suffering from schizophrenia. *Schizophr. Res.* 76 (2–3), 343–351.
- Sullivan, E.M., O'Donnell, P., 2012. Inhibitory interneurons, oxidative stress, and schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 38 (3), 373–376.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.
- Twamley, E.W., Doshi, R.R., Nayak, G.V., Palmer, B.W., Golshan, S., Heaton, R.K., Patterson, T.L., Jeste, D.V., 2002. Generalized cognitive impairments, ability to perform everyday tasks, and level of independence in community living situations of older patients with psychosis. *Am. J. Psychiatry* 159 (12), 2013–2020.
- Watson, T.A., Callister, R., Taylor, R.D., Sibbritt, D.W., MacDonald-Wicks, L.K., Garg, M.L., 2005. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37 (1), 63–71.
- Wood, S.J., Berger, G.E., Wellard, R.M., Proffitt, T.M., McConchie, M., Berk, M., McGorry, P.D., Pantelis, C., 2009. Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: a ¹H-MRS investigation. *Neurobiol. Dis.* 33 (3), 354–357.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 52 (12), 4026–4037.
- Yao, J.K., Leonard, S., Reddy, R., 2006. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis. Markers* 22 (1–2), 83–93.
- Zhang, X.Y., Tan, Y.L., Zhou, D.F., Haile, C.N., Wu, G.Y., Cao, L.Y., Kosten, T.A., Kosten, T.R., 2007. Nicotine dependence, symptoms and oxidative stress in male patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 32 (9), 2020–2024.
- Zhang, X.Y., Zhou, D.F., Shen, Y.C., Zhang, P.Y., Liang, J., Chen da, C., Xiu, M.H., Kosten, T.A., Kosten, T.R., 2012. Effects of risperidone and haloperidol on superoxide dismutase and nitric oxide in schizophrenia. *Neuropharmacology* 62 (5–6), 1928–1934.

Please cite this article as: Ballesteros, A., et al., No evidence of exogenous origin for the abnormal glutathione redox state in schizophrenia, *Schizophr. Res.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2013.02.001>

ABREVIATURAS



**Abreviaturas
por orden
alfabético:**

15 - F2T - IP: isoprostanos tipo 15F2t - IP.

15F2t - IP - HRP: Molécula conjugada de 15 - F2T - IP
Isoprostano peroxidasa presente en el rábano.

BPRS: Brief Psychiatric Rating Scale.

CIE: Clasificación Internacional de Enfermedades.

COX-2: Ciclooxigenasa 2.

dB: decibelios.

DSM IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental
Disorders 4th Edition (Text Revision).

DWT: 8-level biorthogonal discrete wavelet transform.

E1: primer estímulo.

E/I (Transmisión): Transmisión Excitatoria/Inhibitoria.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EEG: Electroencefalografía.

EIA: Cuestionario de estimación de ingesta de Antioxidantes

ELISA: Inmunoensayo ligado a enzimas.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

**Abreviaturas
por orden
alfabético:
(cont.)**

FAD: Flavina Adenina dinucleótido.

FL2: Fosfolipasa 2.

FRAP: Poder Antioxidante Reductor del Hierro.

GSH: Glutación (versión monomérica reducida).

GSSG: Glutación disulfuro (versión oxidada).

GSH-Px: Glutación peroxidasa.

GR: Glutación Reductasa.

GWAS: Genome wide association study.

HEOG: Electrooculograma Horizontal.

Hz: Hertzios.

IL-6: Interleukina 6.

IPs: Isoprostanos.

kΩ: kiloohmios

MDA: Malondialdehido.

MEG: Magnetoencefalografía.

MMN: Mismatch Negativity

**Abreviaturas
por orden
alfabético:
(cont.)**

Ms: milisegundos.

μ V: microvoltios.

NAC: N-acetilcisteína.

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida.

NADPH:: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma oxidada.

NMDA: N-metil D-aspartato.

PEP: Primeros Episodios de Psicosis.

PIT: Predictor Intermedio.

PSD: Densidad dentro del espectro de potencias.

PSP: test de rendimiento personal y social.

PRE: Potenciales Relacionados con Eventos.

PV: Paralbúmina

RAD: Red de Atención Dorsal.

RAV: Red de Atención Ventral.

RER: Red en Estado de Reposo.

RF: Redes Funcionales.

**Abreviaturas
por orden
alfabético:
(cont.)**

RMP: Red en Modo Predeterminado.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SCID: Entrevista clínica estructurada para la DSM-IV

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNPs: Polimorfismos de nucleótido único.

SOD: Superóxido dismutasa.

SZ: Esquizofrenia.

TAC: Capacidad Total Antioxidante.

TB: Trastorno Bipolar.

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

UPSA: Escala de Evaluación de Desempeño UCSD basada en Competencias (UPSA).

USDA: United States Department of Agriculture.

VEOG: Electrooculograma vertical.

VNC: Variación negativa contingente.

REFERENCIAS



1. van Dongen J, Boomsma DI. The evolutionary paradox and the missing heritability of schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013;162B(2):122-36.
2. Nelson B, Fusar-Poli P, Yung AR. Can we detect psychotic-like experiences in the general population? *Curr Pharm Des.* 2012;18(4):376-85.
3. McGue M, Gottesman II, Rao DC. Resolving genetic models for the transmission of schizophrenia. *Genet Epidemiol.* 1985;2(1):99-110.
4. Do KQ, Cabungcal JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol.* 2009;19(2):220-30.
5. Nagai T, Ibi D, Yamada K. Animal model for schizophrenia that reflects gene-environment interactions. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(9):1364-8.
6. Arnold SE, Trojanowski JQ. Recent advances in defining the neuropathology of schizophrenia. *Acta Neuropathol.* 1996;92(3):217-31.
7. Steullet P, Cabungcal JH, Kulak A, Kraftsik R, Chen Y, Dalton TP, et al. Redox dysregulation affects the ventral but not dorsal hippocampus: impairment of parvalbumin neurons, gamma oscillations, and related behaviors. *J Neurosci.* 2010;30(7):2547-58.
8. Raffa M, Mechri A, Othman LB, Fendri C, Gaha L, Kerkeni A. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33(7):1178-83.
9. Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem.* 2008;49:241-68.
10. Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2005;2(5):e141.
11. Hoff P. Eugen Bleuler's concept of schizophrenia and its relevance to present-day psychiatry. *Neuropsychobiology.* 2012;66(1):6-13.
12. Jäger M, Frasch K, Lang FU, Becker T. [Deconstructing schizophrenia. Dimensional models or division into subtypes?]. *Nervenarzt.* 2012;83(3):345-54.
13. Dusi N, Perlini C, Bellani M, Brambilla P. [Searching for psychosocial endophenotypes in schizophrenia: the innovative role of brain imaging]. *Riv Psichiatr.* 2012;47(2):76-88.
14. Risling AJ, Light GA. Neurophysiological measures of sensory registration, stimulus discrimination, and selection in schizophrenia patients. *Curr Top Behav Neurosci.* 2010;4:283-309.
15. Oertel-Knochel V, Knochel C, Stablein M, Linden DE. Abnormal functional and structural asymmetry as biomarker for schizophrenia. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(21):2434-51.
16. Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry.* 2003;160(4):636-45.
17. Réthelyi J. [Diagnosing schizophrenia: from Bleuler to DSM-V]. *Neuropsychopharmacol Hung.* 2011;13(4):193-203.
18. Popov NT, Stoyanova VK, Madzhirova NP, Vachev TI. Epigenetic aspects in schizophrenia etiology and pathogenesis. *Folia Med (Plovdiv).* 2012;54(2):12-6.
19. Bergen SE, Petryshen TL. Genome-wide association studies of schizophrenia: does bigger lead to better results? *Curr Opin Psychiatry.* 2012;25(2):76-82.
20. Cardno AG, Gottesman II. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet.* 2000;97(1):12-7.
21. Vereczkei A, Mirnics K. Genetic predisposition to schizophrenia: what did we learn and what does the future hold? *Neuropsychopharmacol Hung.* 2011;13(4):205-10.
22. Tiwari AK, Zai CC, Müller DJ, Kennedy JL. Genetics in schizophrenia: where are we and what next? *Dialogues Clin Neurosci.* 2010;12(3):289-303.

23. Labrie V, Pai S, Petronis A. Epigenetics of major psychosis: progress, problems and perspectives. *Trends Genet.* 2012;28(9):427-35.
24. Chowdari KV, Bamne MN, Nimgaonkar VL. Genetic association studies of antioxidant pathway genes and schizophrenia. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(7):2037-45.
25. Andrezza AC. Combining redox-proteomics and epigenomics to explain the involvement of oxidative stress in psychiatric disorders. *Mol Biosyst.* 2012;8(10):2503-12.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 4th ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2007. xxxvi, 851 p. p.
27. Dietrich-Muszalska A, Olas B. Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2009;10(1):27-33.
28. Lenton KJ, Therriault H, Wagner JR. Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Anal Biochem.* 1999;274(1):125-30.
29. Yao JK, Leonard S, Reddy R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis Markers.* 2006;22(1-2):83-93.
30. Gawryluk JW, Wang JF, Andrezza AC, Shao L, Yatham LN, Young LT. Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14(8):1069-74.
31. Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Krüger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, et al. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci.* 2000;12(10):3721-8.
32. Wood SJ, Berger GE, Wellard RM, Proffitt TM, McConchie M, Berk M, et al. Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: a 1H-MRS investigation. *Neurobiol Dis.* 2009;33(3):354-7.
33. Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2000;47(1):8-21.
34. Glen AI, Glen EM, Horrobin DF, Vaddadi KS, Spellman M, Morse-Fisher N, et al. A red cell membrane abnormality in a subgroup of schizophrenic patients: evidence for two diseases. *Schizophr Res.* 1994;12(1):53-61.
35. Yao JK, van Kammen DP, Gurklis J. Red blood cell membrane dynamics in schizophrenia. III. Correlation of fatty acid abnormalities with clinical measures. *Schizophr Res.* 1994;13(3):227-32.
36. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry.* 1998;43(9):674-9.
37. Stanley J, Williamson P, Drost D, Carr T, Rylett R, Morrison-Stewart S, et al. Membrane phospholipid metabolism and schizophrenia: an in vivo 31P-MR spectroscopy study. *Schizophr Res.* 1994. p. 6.
38. Ross BM. Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003;69(6):407-12.
39. Weber-Fahr W, Englisch S, Esser A, Tunc-Skarka N, Meyer-Lindenberg A, Ende G, et al. Altered phospholipid metabolism in schizophrenia: A phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res.* 2013.
40. Fusar-Poli P, Berger G. Eicosapentaenoic acid interventions in schizophrenia: meta-analysis of randomized, placebo-controlled studies. *J Clin Psychopharmacol.* 2012;32(2):179-85.
41. Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, de Oliveira MB, et al. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2013.

42. Monte AS, de Souza GC, McIntyre RS, Soczynska JK, Dos Santos JV, Cordeiro RC, et al. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. *J Psychopharmacol.* 2013;27(11):1032-43.
43. Berk M, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, et al. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia--a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry.* 2008;64(5):361-8.
44. Mittal VA, Ellman LM, Cannon TD. Gene-environment interaction and covariation in schizophrenia: the role of obstetric complications. *Schizophr Bull.* 2008;34(6):1083-94.
45. Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci.* 2006;26(18):4752-62.
46. Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun.* 2008;22(4):469-86.
47. Chakraborti A, Gulati K, Banerjee BD, Ray A. Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. *Behav Brain Res.* 2007;179(2):321-5.
48. Steullet P, Neijt HC, Cuénod M, Do KQ. Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. *Neuroscience.* 2006;137(3):807-19.
49. Behrens MM, Ali SS, Dao DN, Lucero J, Shekhtman G, Quick KL, et al. Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science.* 2007;318(5856):1645-7.
50. Behrens MM, Ali SS, Dugan LL. Interleukin-6 mediates the increase in NADPH-oxidase in the ketamine model of schizophrenia. *J Neurosci.* 2008;28(51):13957-66.
51. Paintlia MK, Paintlia AS, Khan M, Singh I, Singh AK. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activity by N-acetyl cysteine attenuates inhibition of oligodendrocyte development in lipopolysaccharide stimulated mixed glial cultures. *J Neurochem.* 2008;105(3):956-70.
52. Flatow J, Buckley P, Miller BJ. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2013;74(6):400-9.
53. D'Souza B, D'Souza V. Oxidative injury and antioxidant vitamins E and C in Schizophrenia. *Indian J Clin Biochem.* 2003;18(1):87-90.
54. Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(7):2011-35.
55. Condray R, Yao JK, Steinhauer SR, van Kammen DP, Reddy RD, Morrow LA. Semantic memory in schizophrenia: association with cell membrane essential fatty acids. *Schizophr Res.* 2008;106(1):13-28.
56. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, et al. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(17):9235-40.
57. Pickar D, Litman RE, Konicki PE, Wolkowitz OM, Breier A. Neurochemical and neural mechanisms of positive and negative symptoms in schizophrenia. *Mod Probl Pharmacopsychiatry.* 1990;24:124-51.
58. Orrison WW. *Neurorradiología.* Primera ed. Madrid: Ed. Harcourt; 2001.

59. Uchida H, Takeuchi H, Graff-Guerrero A, Suzuki T, Watanabe K, Mamo DC. Dopamine D2 receptor occupancy and clinical effects: a systematic review and pooled analysis. *J Clin Psychopharmacol.* 2011;31(4):497-502.
60. Stahl SM. *Stahl's Essential Psychopharmacology*. Tercera ed. New York: Cambridge University Press; 2008.
61. Barlow DH, Durand VM. *Abnormal Psychology - An Integrative Approach*. Quinta ed. Belmont: Wadsworth Cengage Learning; 2009.
62. Kuroki T, Nagao N, Nakahara T. Neuropharmacology of second-generation antipsychotic drugs: a validity of the serotonin-dopamine hypothesis. *Prog Brain Res.* 2008;172:199-212.
63. Bauer M, Praschak-Rieder N, Kasper S, Willeit M. Is dopamine neurotransmission altered in prodromal schizophrenia? A review of the evidence. *Curr Pharm Des.* 2012;18(12):1568-79.
64. Müller N, Myint AM, Krause D, Weidinger E, Schwarz MJ. Anti-inflammatory treatment in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;42:146-53.
65. Sullivan EM, O'Donnell P. Inhibitory interneurons, oxidative stress, and schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2012;38(3):373-6.
66. Choi YB, Lipton SA. Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(11):1535-41.
67. Köhr G, Eckardt S, Lüddens H, Monyer H, Seeburg PH. NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron.* 1994;12(5):1031-40.
68. Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, et al. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22):9130-5.
69. Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull.* 2009;35(3):549-62.
70. Matsumoto J, Sugiura Y, Yuki D, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N, et al. Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(7):1933-43.
71. Buretić-Tomljanović A, Giacometti J, Nadalin S, Rubesa G, Vulin M, Tomljanović D. Phospholipid membrane abnormalities and reduced niacin skin flush response in schizophrenia. *Psychiatr Danub.* 2008;20(3):372-83.
72. van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet.* 2009;374(9690):635-45.
73. Broyd SJ, Demanuele C, Debener S, Helps SK, James CJ, Sonuga-Barke EJ. Default-mode brain dysfunction in mental disorders: a systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33(3):279-96.
74. Whitfield-Gabrieli S, Ford JM. Default mode network activity and connectivity in psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol.* 2012;8:49-76.
75. Lavoie S, Murray MM, Deppen P, Knyazeva MG, Berk M, Boulat O, et al. Glutathione precursor, N-acetyl-cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(9):2187-99.
76. Association AP. *Diagnostic and statistical manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR*. Cuarta revisada ed. Washington, DC2000.
77. Spencer R, Nevid J. *Abnormal Psychology*. Englewood Cliffs, NJ1991.
78. Victor M, Ropper AH. *Adams and Victor's principles of neurology*. Séptima ed. United States of America2001.

79. Kaymaz N, van Os J, Murray et al. (2004) revisited: is bipolar disorder identical to schizophrenia without developmental impairment? *Acta Psychiatr Scand.* 2009;120(4):249-52.
80. Priebe S. Social outcomes in schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl.* 2007;50:s15-20.
81. Figueira ML, Brissos S. Measuring psychosocial outcomes in schizophrenia patients. *Curr Opin Psychiatry.* 2011;24(2):91-9.
82. Kopelowicz A, Liberman RP, Zarate R. Recent advances in social skills training for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2006;32 Suppl 1:S12-23.
83. Gandal MJ, Edgar JC, Klook K, Siegel SJ. Gamma synchrony: towards a translational biomarker for the treatment-resistant symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1504-18.
84. Carpenter WT, Buchanan RW. Lessons to take home from CATIE. *Psychiatr Serv.* 2008;59(5):523-5.
85. Parikh V, Khan MM, Mahadik SP. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res.* 2003;37(1):43-51.
86. Zhang XY, Tan YL, Zhou DF, Haile CN, Wu GY, Cao LY, et al. Nicotine dependence, symptoms and oxidative stress in male patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32(9):2020-4.
87. Zhang XY, Zhou DF, Shen YC, Zhang PY, Zhang WF, Liang J, et al. Effects of risperidone and haloperidol on superoxide dismutase and nitric oxide in schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2012;62(5-6):1928-34.
88. Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, et al. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1574-83.
89. Samuelsson M, Skogh E, Lundberg K, Vrethem M, Ollinger K. Taurine and glutathione in plasma and cerebrospinal fluid in olanzapine treated patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2013.
90. Ciobica A, Padurariu M, Dobrin I, Stefanescu C, Dobrin R. Oxidative stress in schizophrenia - focusing on the main markers. *Psychiatr Danub.* 2011;23(3):237-45.
91. Miljevic C, Nikolic M, Nikolic-Kokic A, Jones DR, Niketic V, Lecic-Tosevski D, et al. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010;34(2):303-7.
92. Smith MA. Oxidative stress and iron imbalance in Alzheimer disease: how rust became the fuss! *J Alzheimers Dis.* 2006;9(3 Suppl):305-8.
93. Sultana R, Piroddi M, Galli F, Butterfield DA. Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res.* 2008;33(12):2540-6.
94. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3217-66.
95. Pazvantoglu O, Selek S, Okay IT, Sengul C, Karabekiroglu K, Dilbaz N, et al. Oxidative mechanisms in schizophrenia and their relationship with illness subtype and symptom profile. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009;63(5):693-700.
96. Pryor WA. The antioxidant nutrients and disease prevention--what do we know and what do we need to find out? *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1 Suppl):391S-3S.
97. Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol.* 2001;154(4):348-56.
98. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515-40.

99. Kunz M, Gama CS, Andrezza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(7):1677-81.
100. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001;25(3):463-93.
101. Gama CS, Salvador M, Andrezza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006;30(3):512-5.
102. Wood SJ, Yücel M, Pantelis C, Berk M. Neurobiology of schizophrenia spectrum disorders: the role of oxidative stress. *Ann Acad Med Singapore*. 2009;38(5):396-6.
103. Niedermeyer E, da Silva FL. *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*. Sexta ed. Filadelfia 2011.
104. Vecchiato G, Astolfi L, De Vico Fallani F, Toppi J, Aloise F, Bez F, et al. On the use of EEG or MEG brain imaging tools in neuromarketing research. *Comput Intell Neurosci*. 2011;2011:643489.
105. Tsipsios DI, Howard RS, Koutroumanidis MA. Electroencephalographic assessment of patients with epileptic seizures. *Expert Rev Neurother*. 2010;10(12):1869-86.
106. Kennett R. Modern electroencephalography. *J Neurol*. 2012;259(4):783-9.
107. Abend NS, Mani R, Tschuda TN, Chang T, Topjian AA, Donnelly M, et al. EEG monitoring during therapeutic hypothermia in neonates, children, and adults. *Am J Electroneurodiagnostic Technol*. 2011;51(3):141-64.
108. Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW. Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1087-187.
109. Vespa PM, Nenov V, Nuwer MR. Continuous EEG monitoring in the intensive care unit: early findings and clinical efficacy. *J Clin Neurophysiol*. 1999;16(1):1-13.
110. Hämäläinen M, Hari R, Ilmoniemi RJ, Knuutila J, Lounasmaa OV. Magnetoencephalography—theory, instrumentation, and applications to noninvasive studies of the working human brain. *Reviews of Modern Physics*. 1993;65(2):413-97.
111. Ferreira-Santos F, Silveira C, Almeida PR, Palha A, Barbosa F, Marques-Teixeira J. The auditory P200 is both increased and reduced in schizophrenia? A meta-analytic dissociation of the effect for standard and target stimuli in the oddball task. *Clin Neurophysiol*. 2012;123(7):1300-8.
112. Fingelkurts AA, Bagnato S, Boccagni C, Galardi G. Prognostic value of resting-state electroencephalography structure in disentangling vegetative and minimally conscious States: a preliminary study. *Neurorehabil Neural Repair*. 2013;27(4):345-54.
113. Schenck JF. The role of magnetic susceptibility in magnetic resonance imaging: MRI magnetic compatibility of the first and second kinds. *Med Phys*. 1996;23(6):815-50.
114. Sereno SC, Rayner K, Posner MI. Establishing a time-line of word recognition: evidence from eye movements and event-related potentials. *Neuroreport*. 1998;9(10):2195-200.
115. Toyama S, Takano K, Kansaku K. A non-adhesive solid-gel electrode for a non-invasive brain-machine interface. *Front Neurol*. 2012;3:114.
116. Lenkov DN, Volnova AB, Pope AR, Tsytsarev V. Advantages and limitations of brain imaging methods in the research of absence epilepsy in humans and animal models. *J Neurosci Methods*. 2013;212(2):195-202.

117. Rombaux P, Huart C, Mouraux A. Assessment of chemosensory function using electroencephalographic techniques. *Rhinology*. 2012;50(1):13-21.
118. Jiruska P, Bragin A. High-frequency activity in experimental and clinical epileptic foci. *Epilepsy Res*. 2011;97(3):300-7.
119. Knyazev GG. EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(1):677-95.
120. Hughes SW, Crunelli V. Just a phase they're going through: the complex interaction of intrinsic high-threshold bursting and gap junctions in the generation of thalamic alpha and theta rhythms. *Int J Psychophysiol*. 2007;64(1):3-17.
121. Niedermeyer E. Alpha rhythms as physiological and abnormal phenomena. *Int J Psychophysiol*. 1997;26(1-3):31-49.
122. Feshchenko VA, Reinsel RA, Veselis RA. Multiplicity of the alpha rhythm in normal humans. *J Clin Neurophysiol*. 2001;18(4):331-44.
123. Brenner RP. The interpretation of the EEG in stupor and coma. *Neurologist*. 2005;11(5):271-84.
124. Michail E, Chouvarda I, Maglaveras N. Benzodiazepine administration effect on EEG fractal dimension: results and causalities. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010;2010:2350-3.
125. Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH. Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clin Neurophysiol*. 1999;110(11):1842-57.
126. Herrmann CS, Fründ I, Lenz D. Human gamma-band activity: a review on cognitive and behavioral correlates and network models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(7):981-92.
127. Oberman LM, Hubbard EM, McCleery JP, Altschuler EL, Ramachandran VS, Pineda JA. EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Brain Res Cogn Brain Res*. 2005;24(2):190-8.
128. Sale P, Franceschini M. Action observation and mirror neuron network: a tool for motor stroke rehabilitation. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2012;48(2):313-8.
129. Pogarell O, Mulert C, Hegerl U. Event-related potentials in psychiatry. *Clin EEG Neurosci*. 2007;38(1):25-34.
130. Picton TW, Bentin S, Berg P, Donchin E, Hillyard SA, Johnson R, et al. Guidelines for using human event-related potentials to study cognition: recording standards and publication criteria. *Psychophysiology*. 2000;37(2):127-52.
131. WALTER WG, COOPER R, ALDRIDGE VJ, MCCALLUM WC, WINTER AL. CONTINGENT NEGATIVE VARIATION: AN ELECTRIC SIGN OF SENSORIMOTOR ASSOCIATION AND EXPECTANCY IN THE HUMAN BRAIN. *Nature*. 1964;203:380-4.
132. Tiitinen H, Sinkkonen J, Reinikainen K, Alho K, Lavikainen J, Näätänen R. Selective attention enhances the auditory 40-Hz transient response in humans. *Nature*. 1993;364(6432):59-60.
133. Spencer KM, Nestor PG, Perlmutter R, Niznikiewicz MA, Klump MC, Frumin M, et al. Neural synchrony indexes disordered perception and cognition in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17288-93.
134. Cho RY, Konecky RO, Carter CS. Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(52):19878-83.
135. Jensen O, Kaiser J, Lachaux JP. Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory. *Trends Neurosci*. 2007;30(7):317-24.
136. Uhlhaas PJ, Roux F, Singer W, Haenschel C, Sireteanu R, Rodriguez E. The development of neural synchrony reflects late maturation and restructuring of functional networks in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9866-71.

137. Kalkman HO. Altered growth factor signaling pathways as the basis of aberrant stem cell maturation in schizophrenia. *Pharmacol Ther.* 2009;121(1):115-22.
138. Näätänen R, Paavilainen P, Rinne T, Alho K. The mismatch negativity (MMN) in basic research of central auditory processing: a review. *Clin Neurophysiol.* 2007;118(12):2544-90.
139. Tiitinen H, May P, Reinikainen K, Näätänen R. Attentive novelty detection in humans is governed by pre-attentive sensory memory. *Nature.* 1994;372(6501):90-2.
140. Javitt DC, Doneshka P, Zylberman I, Ritter W, Vaughan HG. Impairment of early cortical processing in schizophrenia: an event-related potential confirmation study. *Biol Psychiatry.* 1993;33(7):513-9.
141. Javitt DC, Doneshka P, Grochowski S, Ritter W. Impaired mismatch negativity generation reflects widespread dysfunction of working memory in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1995;52(7):550-8.
142. Javitt DC, Steinschneider M, Schroeder CE, Arezzo JC. Role of cortical N-methyl-D-aspartate receptors in auditory sensory memory and mismatch negativity generation: implications for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(21):11962-7.
143. Javitt DC, Grochowski S, Shelley AM, Ritter W. Impaired mismatch negativity (MMN) generation in schizophrenia as a function of stimulus deviance, probability, and interstimulus/interdeviant interval. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1998;108(2):143-53.
144. Nicol RM, Chapman SC, Vértes PE, Nathan PJ, Smith ML, Shtyrov Y, et al. Fast reconfiguration of high-frequency brain networks in response to surprising changes in auditory input. *J Neurophysiol.* 2012;107(5):1421-30.
145. Watson TA, Callister R, Taylor RD, Sibbritt DW, MacDonald-Wicks LK, Garg ML. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(1):63-71.
146. Jenkinson A, Franklin MF, Wahle K, Duthie GG. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53(7):523-8.
147. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997;95(2):179-89.
148. Huber WW, Scharf G, Rossmannith W, Prustomersky S, Grasl-Kraupp B, Peter B, et al. The coffee components kahweol and cafestol induce gamma-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. *Arch Toxicol.* 2002;75(11-12):685-94.
149. Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr.* 1996;47(3):233-61.
150. Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation.* 1996;94(1):19-25.
151. Strassnig M, Singh Brar J, Ganguli R. Dietary fatty acid and antioxidant intake in community-dwelling patients suffering from schizophrenia. *Schizophr Res.* 2005;76(2-3):343-51.
152. Reddy R, Keshavan M, Yao JK. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2003;62(3):205-12.
153. Zortea K, Fernandes BS, Guimarães LR, Francesconi LP, Lersch C, Gama CS, et al. Reduced serum non-enzymatic antioxidant defense and increased lipid peroxidation in schizophrenic patients on a hypocaloric diet. *Neurosci Lett.* 2012;512(1):43-7.
154. Sarsilmaz M, Songur A, Ozyurt H, Kuş I, Ozen OA, Ozyurt B, et al. Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003;69(4):253-9.

155. Solak ZA, Kabaroglu C, Cok G, Parildar Z, Bayindir U, Ozmen D, et al. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. *Clin Exp Med.* 2005;5(3):99-105.
156. Gould NS, Min E, Gauthier S, Martin RJ, Day BJ. Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure. *Respir Res.* 2011;12:133.
157. Stojković T, Radonjić NV, Velimirović M, Jevtić G, Popović V, Doknić M, et al. Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;39(1):192-9.
158. Sagara Y. Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J Neurochem.* 1998;71(3):1002-12.
159. Jeding I, Evans PJ, Akanmu D, Dexter D, Spencer JD, Aruoma OI, et al. Characterization of the potential antioxidant and pro-oxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(3):359-65.
160. Kropp S, Kern V, Lange K, Degner D, Hajak G, Kornhuber J, et al. Oxidative stress during treatment with first- and second-generation antipsychotics. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2005;17(2):227-31.
161. Light GA, Hsu JL, Hsieh MH, Meyer-Gomes K, Sprock J, Swerdlow NR, et al. Gamma band oscillations reveal neural network cortical coherence dysfunction in schizophrenia patients. *Biol Psychiatry.* 2006;60(11):1231-40.
162. Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(2):100-13.
163. Umbricht D, Schmid L, Koller R, Vollenweider FX, Hell D, Javitt DC. Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(12):1139-47.
164. Bramon E, Croft RJ, McDonald C, Virdi GK, Gruzellier JG, Baldeweg T, et al. Mismatch negativity in schizophrenia: a family study. *Schizophr Res.* 2004;67(1):1-10.
165. Hall MH, Schulze K, Rijdsdijk F, Picchioni M, Ettinger U, Bramon E, et al. Heritability and reliability of P300, P50 and duration mismatch negativity. *Behav Genet.* 2006;36(6):845-57.
166. O'Donnell P. Adolescent onset of cortical disinhibition in schizophrenia: insights from animal models. *Schizophr Bull.* 2011;37(3):484-92.
167. Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2007;27(43):11496-500.
168. Carlén M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, et al. A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Mol Psychiatry.* 2012;17(5):537-48.
169. Javitt DC, Schoepp D, Kalivas PW, Volkow ND, Zarate C, Merchant K, et al. Translating glutamate: from pathophysiology to treatment. *Sci Transl Med.* 2011;3(102):102mr2.
170. Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2012;38(5):950-7.
171. Cazanave S, Vadrot N, Tinel M, Berson A, Lettéron P, Larosche I, et al. Ibuprofen administration attenuates serum TNF-alpha levels, hepatic glutathione depletion, hepatic apoptosis and mouse mortality after Fas stimulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;231(3):336-43.
172. First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. Entrevista clínica estructurada para los trastornos del eje I en el DSM IV. Primera ed. Barcelona 1999.

173. Overall JE, Gorham DR. The brief psychiatric rating scale. *Psychological Reports*. 1962;10:799-812.
174. Patterson TL, Goldman S, McKibbin CL, Hughs T, Jeste DV. UCSD Performance-Based Skills Assessment: development of a new measure of everyday functioning for severely mentally ill adults. *Schizophr Bull*. 2001;27(2):235-45.
175. Twamley EW, Doshi RR, Nayak GV, Palmer BW, Golshan S, Heaton RK, et al. Generalized cognitive impairments, ability to perform everyday tasks, and level of independence in community living situations of older patients with psychosis. *Am J Psychiatry*. 2002;159(12):2013-20.
176. Harvey PD, Velligan DI, Bellack AS. Performance-based measures of functional skills: usefulness in clinical treatment studies. *Schizophr Bull*. 2007;33(5):1138-48.
177. Ellinger S, Müller N, Stehle P, Ulrich-Merzenich G. Consumption of green tea or green tea products: is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies? *Phytomedicine*. 2011;18(11):903-15.
178. Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr*. 2003;133(10):3285S-92S.
179. Santarelli RL, Vendevre JL, Naud N, Taché S, Guéraud F, Viau M, et al. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(7):852-64.
180. Agriculture USDo. Fruit and Tree Nut Yearbook Spreadsheet Files (89022) of United States Department of Agriculture. <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewStaticPage.do?url=http://usda01.library.cornell.edu/usda/ers/.89022/2010/index.html>.: Albert R. Mann Library, Cornell University; 2010 [cited 2012 14 de Octubre]. Base de datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de Norteamérica.].
181. Reference UNNDFs. List of serving size of fish, shellfish, coffee, nuts, dried fruit, tea and wine <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR23/nutrlist/sr23a255.pdf>: USDA National Nutrient Database for Standard Reference; 2011 [cited 2011 15 de Junio]. Lista de porciones estándar de pescado, marisco, café, nueces, frutos secos y vino.].
182. Promotion UCfNPa. List of serving sizes of fruits and vegetables. <http://www.cnpp.usda.gov/Publications/NutritionInsights/Insight22.pdf>: U.S. Department of Agriculture Agency; 2011 [cited 2011 15 de Junio]. Lista de porciones estándar de frutas y vegetales.].
183. Canada H. Canada's Food Guide. http://web.me.com/rtaneja/Mr_Ravi/What_is_Happening_in_Our_Class!_files/serving_grain-cereal_portion-eng.pdf.: Health Canada; 2011 [cited 2011 15 de Junio]. Tabla de medidas de las porciones standard de alimentos del Ministerio de Salud de Canadá.].
184. Foundation. INaDF. INC database <http://www.nutfruit.org/es/consumidores.htm>.: International nut and dried fruit council.; 2011 [cited 2011 15 Junio]. Lista de medidas de porciones estándar de frutos secos.].
185. Technology Mlo. Serving Sizes: Approximations to Common Items <http://web.mit.edu/athletics/sportsmedicine/wcrservings.html>: Massachusetts Institute of Technology; 2006 [cited 2011 15 Junio]. Porciones estándar de alimentos: ítems más frecuentes.].
186. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J*. 2010;9:3.

187. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*. 1998;44(6 Pt 1):1309-15.
188. Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, et al. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med*. 2002;23(1-3):39-100.
189. Magno E, Yeap S, Thakore JH, Garavan H, De Sanctis P, Foxe JJ. Are auditory-evoked frequency and duration mismatch negativity deficits endophenotypic for schizophrenia? High-density electrical mapping in clinically unaffected first-degree relatives and first-episode and chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2008;64(5):385-91.
190. Javitt DC, Shelley A, Ritter W. Associated deficits in mismatch negativity generation and tone matching in schizophrenia. *Clin Neurophysiol*. 2000;111(10):1733-7.
191. Umbricht DS, Bates JA, Lieberman JA, Kane JM, Javitt DC. Electrophysiological indices of automatic and controlled auditory information processing in first-episode, recent-onset and chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2006;59(8):762-72.
192. Hong LE, Summerfelt A, Mitchell BD, O'Donnell P, Thaker GK. A shared low-frequency oscillatory rhythm abnormality in resting and sensory gating in schizophrenia. *Clin Neurophysiol*. 2012;123(2):285-92.
193. Hong LE, Summerfelt A, Mitchell BD, McMahon RP, Wonodi I, Buchanan RW, et al. Sensory gating endophenotype based on its neural oscillatory pattern and heritability estimate. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(9):1008-16.
194. Hong LE, Summerfelt A, Buchanan RW, O'Donnell P, Thaker GK, Weiler MA, et al. Gamma and delta neural oscillations and association with clinical symptoms under subanesthetic ketamine. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(3):632-40.
195. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*. 1980;106(1):207-12.
196. Güntherberg H, Rost J. The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Anal Biochem*. 1966;15(2):205-10.
197. Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, et al. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(28):3309-17.
198. Slot C. Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffe reaction method. *Scand J Clin Lab Invest*. 1965;17(4):381-7.
199. Heinegård D, Tiderström G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 1973;43(3):305-10.
200. Preacher KJ, Kelley K. Effect size measures for mediation models: quantitative strategies for communicating indirect effects. *Psychol Methods*. 2011;16(2):93-115.
201. Hayes AF. An introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach. <http://www.afhayes.com/public/process2012.pdf>. Guilford press; 2012.
202. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. 2009;459(7247):698-702.
203. Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, et al. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci*. 2010;13(1):76-83.
204. Cabungcal JH, Steullet P, Kraftsik R, Cuenod M, Do KQ. Early-life insults impair parvalbumin interneurons via oxidative stress: reversal by N-acetylcysteine. *Biol Psychiatry*. 2013;73(6):574-82.

205. O'Donnell P. Cortical interneurons, immune factors and oxidative stress as early targets for schizophrenia. *Eur J Neurosci.* 2012;35(12):1866-70.
206. Green MF, Schooler NR, Kern RS, Frese FJ, Granberry W, Harvey PD, et al. Evaluation of functionally meaningful measures for clinical trials of cognition enhancement in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2011;168(4):400-7.
207. Kulak A, Cuenod M, Do KQ. Behavioral phenotyping of glutathione-deficient mice: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Behav Brain Res.* 2012;226(2):563-70.
208. Möller M, Du Preez JL, Viljoen FP, Berk M, Harvey BH. N-acetyl cysteine reverses social isolation rearing induced changes in cortico-striatal monoamines in rats. *Metab Brain Dis.* 2013;28(4):687-96.
209. Korostenskaja M, Kähkönen S. What do ERPs and ERFs reveal about the effect of antipsychotic treatment on cognition in schizophrenia? *Curr Pharm Des.* 2009;15(22):2573-93.
210. Cooper J, Mancuso SG, Borland R, Slade T, Galletly C, Castle D. Tobacco smoking among people living with a psychotic illness: the second Australian Survey of Psychosis. *Aust N Z J Psychiatry.* 2012;46(9):851-63.
211. Gould NS, Min E, Gauthier S, Chu HW, Martin R, Day BJ. Aging adversely affects the cigarette smoke-induced glutathione adaptive response in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(9):1114-22.
212. Raffa M, Barhoumi S, Atig F, Fendri C, Kerkeni A, Mechri A. Reduced antioxidant defense systems in schizophrenia and bipolar I disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;39(2):371-5.
213. Dakhale G, Khanzode S, Saoji A, Khobragade L, Turankar A. Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology.* 2004;49(4):205-9.
214. Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct.* 2002;20(2):171-5.
215. Ben Othmen L, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, et al. Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32(1):155-9.
216. Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghatge M, Kale A, Sitasawad S, et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res.* 2003;121(2):109-22.
217. Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, et al. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(42):16621-6.





VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

A.
Ballesteros



Estrés Oxidativo y Esquizofrenia