



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



**“CUANTIFICACIÓN DE ARGININA Y CITRULINA EN
EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES
CON ESQUIZOFRENIA”**

Departamento de
Exámenes Profesionales

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
PEDRO IVÁN PÉREZ NERI

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

DRA. ADRIANA MORALES PÉREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Cuantificación de Arginina y Citrulina en el Líquido
Cefalorraquídeo de Pacientes con Esquizofrenia

que presenta el pasante: Pedro Iván Pérez Neri
con número de cuenta: 09756109-7 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 8 de enero de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. Ricardo V. Santiago Díaz</u>	
VOCAL	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Adriana Morales Pérez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Gabriela Escalante Reynoso</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	

Presentación

Este trabajo se realizó en el **Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”** bajo la dirección del **Dr. Camilo Ríos Castañeda**, con asesoría de la **Dra. Adriana Morales Pérez (F. E. S. Cuautitlán, U. N. A. M.)** y con la colaboración de investigadores de diferentes especialidades del mismo Instituto:

Dr. Sergio Montes López

Departamento de Neuroquímica

Dr. Jesús Ramírez Bermúdez

Unidad de Neuropsiquiatría, Departamento de Investigación Clínica

Dra. Marie Catherine Boll

Departamentos de Neuroquímica y Neurología

Dr. Juan Vélez-Escalante

Unidad de Neuropsiquiatría

Agradecimientos

A mis tutores por su confianza y apoyo

A la Dra. Esther Talavera (Instituto de Neurobiología, Juriquilla, Gro.) por la donación del estándar de L-citrulina

A la Fundación Armstrong por la asignación y renovación de una beca para este proyecto

Al L.Q.I. Roberto Govea Rueda por su colaboración para la escritura de esta tesis

Dedicatoria

A todos los que de forma directa o indirecta (especialmente mi familia, amigos y compañeros de trabajo) me han apoyado y han contribuido a mi formación, y cuyos nombres no es necesario mencionar

Especialmente a Omar E. Pérez Neri

“Never had a problem til I stood face to face with me
and I wish there was a way for me to go inside so I could see
all the faces of the people who have torn a piece from me
as I grew from a seed to a tree”

Seed to a tree
Blind Melon, 1992.

“Aunque ahora se nos dice a cada paso que el genio tiene algo de locura, los hombres de antaño estaban mucho más inclinados a la idea de que en la locura hay un principio de genio y de sabiduría, algo divino, como se decía al oído. A veces se expresó esta idea bien claramente. ‘La locura ha derramado los mayores beneficios sobre la Grecia’, decía Platón con toda la humanidad antigua. Avancemos un poco más, y veremos que todos los hombres superiores, impulsados a romper el yugo de una moral cualquiera y a proclamar nuevas leyes, *cuando no estaban verdaderamente locos*, no tuvieron más remedio que tornarse tales o fingir la locura”

Aurora. Friedrich Nietzsche.

“Aquí está el secreto. Si la inteligencia lleva a la duda o a la falsedad, es de presumir que la insensatez, por idéntica ley, conduzca a la certidumbre y a la luz. Si el demasiado razonar lleva no a la conquista de la verdad, sino a la locura, está claro que es preciso partir de la locura para llegar a una racionalidad superior que resolverá los enigmas del mundo”

Gog. Giovanni Papini.

“ -Hay un muro entre tú y yo. Te veo, te hablo, pero estás del otro lado. ¿Qué es lo que nos impide amarnos? Me parece que era más fácil antes. En Hamburgo.

“ -Sí- dijo Eva tristemente. Siempre Hamburgo, nunca hablaba de su verdadero pasado. Ni Eva ni él habían estado en Hamburgo.

“ -Nos paseábamos a lo largo de los canales. Había una chalana, ¿te acuerdas? La chalana era negra; había un perro sobre el puente.

“Inventaba a medida que hablaba, tenía aspecto falso.

“ -Te tenía de la mano. Tenías otra piel. Yo creía todo lo que me decías. Cállense- gritó.

“Escuchó un momento:

“ -Van a venir...”

La Cámara. Jean Paul Sartre.

“Sí, pero por mucho que razone, por más que me lo explique, no puedo quedarme solo en casa, porque está allí. Sé que no lo veré más, no se volverá a aparecer, eso se acabó. Pero sufro como si lo viera. Es invisible para mis ojos, pero está en mi pensamiento. Está detrás de las puertas, dentro del armario, debajo de la cama, en cualquier rincón oscuro, en cada sombra... Si abro la puerta, si registro el armario, si miro debajo de la cama, si ilumino los rincones, él no está, él no se aparece; pero entonces lo siento a mis espaldas. Me vuelvo, convencido de que no lo veré más, seguro de que no existe. Y sin embargo, no deja de estar a mis espaldas.

“Es estúpido, lo sé, pero es aterrador. ¿Qué puedo hacer? ¡Nada!

“Pero si alguien estuviera conmigo, ya no me turbaría. ¡Él está aquí porque estoy solo, únicamente porque estoy solo!”

¿Él? Guy de Maupassant.

“¡Es verdad! Nervioso, he sido y soy terriblemente nervioso; pero, ¿por qué dirás que estoy loco? La enfermedad ha agudizado mis sentidos, no los ha destruido ni embotado. El más agudo de todos es el del oído. Oigo todas las cosas en el cielo y en la Tierra. Oigo muchas cosas en el infierno. ¿Cómo, entonces, puedo estar loco? ¡Escucha! y observa con qué cordura, con qué calma puedo contarte toda esta historia...”

El Corazón Delator. Edgar Allan Poe.

Índice General

	Página
Resumen	13
1. Contexto Teórico	14
1.1. Esquizofrenia.....	14
1.1.1. Características Generales	14
1.1.2. El Origen de la Esquizofrenia	15
1.1.2.1. Factores Ambientales Relacionados con la Esquizofrenia.....	16
1.1.2.2. Factores Genéticos Relacionados con la Esquizofrenia.....	18
1.1.3. Neurotransmisores Involucrados en la Esquizofrenia	20
1.2. El Líquido Cefalorraquídeo.....	23
1.2.1. Producción y Circulación del Líquido Cefalorraquídeo	23
1.2.2. Utilidad Diagnóstica del Líquido Cefalorraquídeo	26
1.2.3. Barreras en el Sistema Nervioso Central	26
1.2.4. Composición Normal del Líquido Cefalorraquídeo.....	28
1.2.4.1. Aminoácidos en el Líquido Cefalorraquídeo	29
1.3. El Óxido Nítrico	33
1.3.1. Características Generales	33
1.3.2. Efectos Intracelulares e Intercelulares.....	36
1.3.3. Características de la Sintasa del Óxido Nítrico	37
1.3.4. Metabolismo y Transporte de Arginina	40
1.3.5. Regulación de la Biosíntesis y los Efectos del Óxido Nítrico	44
1.3.6. Efectos Tóxicos y Protectores del Óxido Nítrico.....	48
1.3.6.1. El Óxido Nítrico y Algunas Patologías del Sistema Nervioso Central.....	52
1.4. Análisis Cuantitativo Aplicado al Estudio de la Esquizofrenia.....	53
1.4.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	53
1.4.2. Fluorimetría	58
2. Desarrollo Experimental	62
2.1. Objetivos	63

2.1.1. Objetivo General	63
2.1.2. Objetivos Particulares	63
2.2. Hipótesis	63
2.3. Criterios para la Elección de Pacientes	63
2.3.1. Consideraciones Éticas	63
2.3.2. Criterios de Inclusión.....	64
2.3.3. Criterios de Exclusión.....	64
2.4. Métodos.....	65
2.4.1. Pacientes	65
2.4.2. Reactivos	65
2.4.3. Disolventes y Soluciones.....	66
2.4.4. Muestras	66
2.4.5. Equipo.....	67
2.4.6. Condiciones Cromatográficas.....	67
2.4.7. Análisis Estadístico	67
3. Resultados y Discusión.....	68
3.1. Método	68
3.2. Concentración de Aminoácidos	69
3.3 Otras Enzimas Metabolizadoras de Citrulina.....	74
3.4. Posible Participación del Estrés Oxidante.....	75
3.5. Participación del NO en la Patofisiología de la Esquizofrenia.....	78
3.6. Estudios Clínicos.....	78
3.7. Modelos Experimentales	79
3.8. Consideraciones Finales	79
4. Conclusiones	82
Referencias.....	83

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Riesgos relativos de presentación de un nuevo caso de esquizofrenia	19
Tabla 2. Algunas regiones cromosómicas relacionadas con la esquizofrenia	20
Tabla 3. Principales solutos en el LCR humano	28
Tabla 4. Principales proteínas identificadas en el LCR humano	29
Tabla 5. Concentraciones promedio de algunos aminoácidos en LCR y plasma humanos .	31
Tabla 6. Algunas funciones en las que participa el NO	35
Tabla 7. Algunas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	36
Tabla 8. Algunos parámetros de la separación cromatográfica de arginina y citrulina	69
Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de arginina y citrulina en el LCR y la puntuación de la PANSS en los pacientes con esquizofrenia	74
Tabla 10. Resultados de la cuantificación de arginina y citrulina en el LCR de pacientes esquizofrénicos	76
Tabla 11. Concentraciones de aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo por paciente	77

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Estructuras de algunos glucocorticoides	18
Figura 2. Algunos neurotransmisores involucrados en la esquizofrenia	21
Figura 3. Circulación del LCR humano	25
Figura 4. Metabolismo de arginina	43
Figura 5. Mecanismos de descomposición del peroxinitrito	51
Figura 6. Transiciones electrónicas durante los procesos de absorción y emisión de luz	60
Figura 7. Cromatograma de una solución estándar de aminoácidos	70
Figura 8. Cromatograma de una muestra de LCR	71
Figura 9. Principales mecanismos que podrían estar causando alteraciones en la biosíntesis del óxido nítrico en la esquizofrenia	80

Abreviaturas Utilizadas

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BHCR	Barrera hematocefalorraquídea
BHE	Barrera hematoencefálica
CLAR (o HPLC)	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DSO	Dismutasa de superóxido
ERON	Especie reactiva de oxígeno y nitrógeno
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IL	Interleucina
INF	Interferón
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
ME	Mercaptoetanol
NF	Factor nuclear
NHA	N ^o -hidroxi-L-arginina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa del óxido nítrico
OPA	o-Ftalaldehido
PANSS	Escala de síntomas positivos y negativos
SNC	Sistema nervioso central
TGF	Factor de crecimiento transformante
THF	Tetrahidrofurano
TNF	Factor de necrosis tumoral

Resumen

El óxido nítrico es un mensajero intracelular e intercelular, que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos. Algunos grupos de investigación han sugerido que existen alteraciones en la biosíntesis de este gas en los pacientes esquizofrénicos, pero los resultados publicados son poco consistentes: aunque varios de ellos indican una menor actividad de la sintasa del óxido nítrico en los esquizofrénicos, algunos pocos estudios indican lo contrario. Sin embargo, la mayoría de las evidencias clínicas y experimentales reportadas sugieren que es menor la biosíntesis del óxido nítrico en la esquizofrenia.

Por lo anterior, en este trabajo evaluamos indirectamente la actividad de la sintasa del óxido nítrico en el sistema nervioso central. Un total de 11 pacientes (5 esquizofrénicos y 6 controles) fueron incluidos en este estudio. Se utilizaron muestras de líquido cefalorraquídeo que fueron analizadas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a un detector de fluorescencia para cuantificar arginina y citrulina. Contrario a lo que esperábamos, la concentración de ambos aminoácidos fue mayor en el grupo de estudio, lo que sugiere un aumento en la biosíntesis del óxido nítrico en los esquizofrénicos, que posiblemente involucra efectos neurotóxicos mediados por el anión peroxinitrito.

1. Contexto Teórico

1.1. Esquizofrenia

1.1.1. Características Generales

La esquizofrenia es la alteración más grave reconocida actualmente en Psiquiatría [1]. La padece el 1% de la población mundial [1-5], lo que involucra a alrededor de 1 millón de personas en este país, y 60 millones en todo el planeta.

Es un trastorno mental crónico no degenerativo cuyo cuadro clínico se encuentra descrito desde 1911, cuando el psiquiatra suizo Eugen Bleuler, quien acuñó el término que da nombre a esta enfermedad, publicó un libro en el que considera cuatro grupos de síntomas que caracterizan a quienes la padecen [4], y que conciernen:

- × El pensamiento (procesos de asociación desordenada)
- × El estado de ánimo (efectos maníacos o depresivos)
- × La voluntad (ambivalente, indecisión)
- × El comportamiento social (apartamiento)

Los efectos maníacos que se presentan en esta enfermedad son un conjunto de manifestaciones que incluyen euforia, irritabilidad, insomnio, y alteraciones del juicio, entre otras [6]. También pueden presentarse delirios, que son errores de percepción que persisten a pesar de los hechos, como la paranoia o delirio de persecución. Pueden presentarse otros delirios, como creer que se poseen atribuciones mágicas, talentos especiales, o creer ser algún personaje político o religioso importante [6]. Además, quienes padecen esta enfermedad pueden experimentar alucinaciones (especialmente auditivas), y habla desorganizada caracterizada por asociaciones poco comunes entre conceptos y cambios rápidos de sujeto durante una conversación [1].

Los síntomas de la esquizofrenia pueden clasificarse de acuerdo a su respuesta farmacológica, de la forma siguiente [1, 7]:

- ☺ Síntomas positivos: incluyen todas las manifestaciones de manía y responden bien al tratamiento con neurolepticos.
- ☹ Síntomas negativos: incluyen las manifestaciones depresivas (apatía, apartamiento social, etc.) y pueden complicarse con la administración de neurolepticos.

Los síntomas de esta enfermedad comienzan generalmente en la adolescencia o la juventud [1]; la edad de inicio es variable pero siempre se presenta después de la pubertad.

1.1.2. El Origen de la Esquizofrenia

Existen varias teorías que intentan explicar el origen de esta enfermedad. Algunos autores proponen que esta patología resulta de alteraciones en las funciones de sistemas de neurotransmisión (sección 1.1.3), mientras que otros sugieren diferencias en el desarrollo cerebral como consecuencia de interacciones prematuras con agentes infecciosos [3].

Aún se desconoce realmente la causa de esta enfermedad, pero algunas evidencias experimentales sugieren que se trata de una alteración en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) [3, 4, 8], que resulta de la combinación de diferentes factores genéticos y ambientales. Las principales evidencias que apoyan esta hipótesis provienen de estudios *post mortem* que revelan diferencias a nivel de la corteza cerebral con origen probable en el segundo trimestre de la gestación [4]. También se han encontrado otras alteraciones como agrandamiento de los ventrículos, menor peso cerebral, y menor volumen del lóbulo temporal [3]. Algunos grupos de investigación

proponen que las lesiones en zonas específicas del cerebro ocurridas en el periodo perinatal pueden contribuir a la presentación de comportamientos hiperdopaminérgicos (sección 1.1.3).

Otra razón importante que apoya la teoría de las alteraciones en el desarrollo del SNC es que los diversos factores ambientales relacionados con el origen de la esquizofrenia (sección 1.1.2.1) se consideran de riesgo cuando suceden en el primer o segundo trimestre de la gestación, el periodo crítico para el desarrollo de órganos y sistemas [8].

Hay que considerar también, que las teorías sobre el origen de esta enfermedad (la de las alteraciones en el desarrollo del SNC, y la de las alteraciones en los procesos de neurotransmisión) no se contradicen, por lo que también podría ser una combinación de ambos eventos lo que da lugar a la esquizofrenia.

1.1.2.1. Factores Ambientales Relacionados con la Esquizofrenia

Muchos factores ambientales se han relacionado con la patogénesis de la esquizofrenia sin que a la fecha se pueda asegurar que alguno de ellos es realmente la causa. Podríamos pensar que el factor ambiental más involucrado en la transmisión vertical de esta enfermedad es el hecho de que los hijos de padres esquizofrénicos realizan todo su desarrollo de la mano de individuos afectados. Sin embargo, a partir de estudios sobre adopciones se ha determinado que los hijos biológicos de padres esquizofrénicos presentan con casi la misma frecuencia esta enfermedad independientemente de haber crecido con sus padres naturales o con otros adoptivos [1]. Además, cuando los gemelos idénticos nacidos de padres esquizofrénicos son criados por separado, presentan ambos la enfermedad con la misma frecuencia con que lo harían si hubieran crecido juntos (65%, Tabla 1) [9].

Entre los factores ambientales que se han propuesto en relación con esta patología, se encuentran las infecciones virales (en general) sucedidas en una

madre gestante [1, 5, 8]. De hecho, hay autores que consideran que algunas formas de la esquizofrenia podrían ser causadas únicamente por factores ambientales como las complicaciones en el parto o las infecciones virales durante la gestación [9]. Algunos otros consideran que las complicaciones ocurridas durante el parto y los déficits de atención durante la infancia predicen la presentación de esquizofrenia [1]. Otros factores ambientales posiblemente involucrados son las alteraciones en la nutrición de la madre durante el embarazo y del bebé después del parto, los nacimientos durante el periodo entre invierno y primavera, el hecho de nacer en las ciudades, la muerte del padre antes del nacimiento, las invasiones y las guerras, los embarazos no deseados, la exposición a tornados, la obesidad de la madre, el bajo peso materno y fetal [5, 8], entre otros.

Las causas ambientales propuestas para esta patología coinciden en que se trata de situaciones que involucran en mayor o menor medida condiciones de estrés. Se producen glucocorticoides (Figura 1) en estas circunstancias [10, 11], y su participación en la patogénesis de la esquizofrenia es una hipótesis publicada recientemente que convierte a la diversidad de condiciones ambientales posiblemente involucradas en un solo factor de riesgo: el estrés [8]. Esto se apoya también en algunas evidencias experimentales, como el aumento en el metabolismo y la liberación de dopamina inducido con glucocorticoides en diferentes regiones cerebrales, la presentación de cambios significativos en la conducta de animales expuestos a glucocorticoides durante la última semana de la gestación, y el aumento en la síntesis de serotonina causado por estrés prenatal [8], entre otras evidencias.

Algunos autores han encontrado que causar lesiones en el hipocampo de ratas recién nacidas da lugar a la hipersecreción de glucocorticoides [8], por lo que no resulta fácil asegurar si las posibles alteraciones en la producción de estos esteroides son la causa o la consecuencia de la enfermedad.

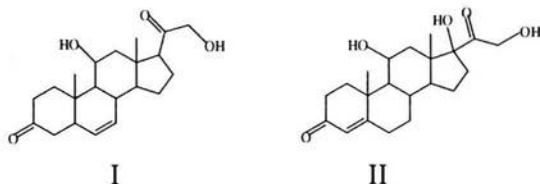


Figura 1. Estructuras de algunos glucocorticoides. I, corticosterona; II, cortisol.

De cualquier modo aún no puede asegurarse cuál es el origen de la esquizofrenia, y menos aún es posible descartar la participación de caracteres determinados genéticamente en la presentación de la misma.

1.1.2.2. Factores Genéticos Relacionados con la Esquizofrenia

La participación de algunos factores genéticos en la patogénesis de la esquizofrenia se ha puesto en evidencia mediante estudios familiares, entre los que destacan especialmente aquellos sobre gemelos. El modo en que se transmite esta patología es complejo, e incluye posiblemente muchos genes (y quizás interacciones entre ellos) con contribuciones menores, penetrancia incompleta y variaciones de expresividad [2, 5, 9].

Los riesgos relativos de padecer esquizofrenia se presentan en la Tabla 1. La aplicación de estos porcentajes para predecir la presentación de nuevos casos de la enfermedad en un familia es muy limitada, sobre todo cuando se trata de casos más complejos (como cuando se tienen al mismo tiempo un padre y un hermano afectados). Además, los porcentajes también varían en función de la gravedad de cada caso: las formas más graves de la enfermedad se transmiten con mayor frecuencia [1].

De estos porcentajes (Tabla 1) se puede deducir que hay factores “familiares” que favorecen la presentación de la enfermedad. Las dos posibilidades que surgen de este análisis son: que hay factores genéticos involucrados, o factores en el entorno en que crece un individuo. La

participación de estos últimos quedó discutida previamente (sección 1.1.2.1).

Tabla 1. Riesgos relativos de presentación de un nuevo caso de esquizofrenia en familias que ya presentan un individuo afectado [1, 9].

Individuo Afectado	Porcentaje de Riesgo
Pariente de segundo grado	4%
Uno de los padres	6%
Un hermano (no gemelo)	9%
Un hijo	13%
Un gemelo dicigótico	28%
Ambos padres	46%
Un gemelo monocigótico	41-65%

Sobre la participación de factores genéticos puede comentarse de inicio que no debe considerarse más allá del 65% que corresponde a la frecuencia en que ambos gemelos idénticos presentan la enfermedad de acuerdo con algunos autores (Tabla 1). Se han propuesto muchas regiones del genoma y algunos genes posiblemente causantes, si no de la enfermedad, al menos de una cierta predisposición a padecerla, sin que esto signifique que alguno de ellos es por sí mismo suficiente y mucho menos indispensable para el desarrollo de la misma.

Más allá de todos los estudios que apoyan el posible papel de algún gen o región cromosómica en este trastorno hay una cantidad igual, o a veces mayor, de otros estudios que no encuentran relación entre ellos y la enfermedad. Estas diferencias pueden atribuirse a la poca reproducibilidad de los resultados al no contar con poblaciones y entornos similares alrededor del mundo. Pero, aunque no puede asegurarse aún la participación de ningún gen o región cromosómica particular en la patogénesis y/o el desarrollo de esta enfermedad, en un estudio sobre 196 pares de hermanos se ha determinado que no se puede excluir a ninguno de los genes que posiblemente predisponen para esquizofrenia en alrededor del 80% del genoma humano [1].

Tabla 2. Algunas regiones cromosómicas relacionadas con la esquizofrenia.

Región	Referencia
1q21-q22	[5]
1q31-q32	[3]
3p21	[2]
3q27	[2]
5p15	[2]
5q33.2	[2]
6p22-p24	[1]
6q11	[2]
6q21-q22	[2]
8p21-p22	[2]
10q25-q26	[2]
12q	[2]
13q14.1-q32	[1]
13q31-q34	[2]
15q15	[5]
16q	[2]
18p11.2	[2]
21q22	[2]
22q11	[2]
22q12-q13	[1]
X-Y	[9]

Algunas regiones cromosómicas posiblemente involucradas en esta enfermedad se muestran en la Tabla 2. Esta lista es cada vez más grande pero aún parece que estamos lejos de encontrar un solo gen o grupo de genes causantes de la esquizofrenia.

1.1.3. Neurotransmisores Involucrados en la Esquizofrenia

Diferentes sistemas de neurotransmisión se consideran relacionados

directa o indirectamente con esta enfermedad (Figura 2).

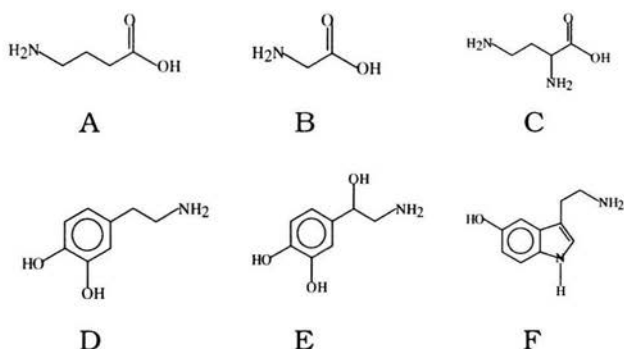


Figura 2. Algunos neurotransmisores involucrados en la esquizofrenia. A, GABA; B, glicina; C, glutamato; D, dopamina; E, noradrenalina; F, serotonina.

Uno de los neurotransmisores más relacionado con la esquizofrenia es la dopamina. Algunos estudios sugieren que las lesiones ocurridas en regiones como la corteza frontal o el hipocampo durante el periodo perinatal en animales de laboratorio, les provocan alteraciones cognitivas y comportamientos hiperdopaminérgicos que no son muy evidentes sino hasta después de la maduración sexual [4]. Por otro lado, se cree que un aumento en la función dopaminérgica mesolímbica produce la euforia y demás manifestaciones hipermotivacionales características del estado de manía [6, 7]. Estas teorías se apoyan en evidencias farmacológicas que revelan que los antagonistas dopaminérgicos disminuyen los síntomas de psicosis. Algunos autores proponen que los síntomas negativos de esta enfermedad son causados por una baja actividad dopaminérgica en la región frontal del cerebro, lo que a su vez resulta en un exceso de dicha actividad en neuronas mesolímbicas generando los síntomas positivos [7]. Estas diferencias de actividad cerebral coinciden con el resultado de imágenes de Tomografía de Emisión de Positrones y Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Únicos, que revelan un menor flujo

sanguíneo en la corteza frontal, relacionado posiblemente con alteraciones en la biosíntesis del óxido nítrico (NO) [12, 13].

También el glutamato ha sido relacionado con esta enfermedad. Los antagonistas glutamatérgicos como la fenciclidina, pueden producir síntomas psicóticos, comportamientos sociales y alteraciones cognitivas observables en la esquizofrenia, cuando son administrados a humanos postpúberes no esquizofrénicos [4, 14], debido a que la disminución en la activación de receptores glutamatérgicos para N-metil-D-aspartato (NMDA) resulta en un aumento en la liberación de dopamina [14]. Algunos estudios *post mortem* reportan una disminución de la concentración de aminoácidos excitadores como glutamato y aspartato en la corteza frontal y el hipocampo de personas que padecieron esquizofrenia [15].

Otros neurotransmisores relacionados con esta enfermedad, aunque quizá menos estudiados que los anteriores son: noradrenalina, serotonina, el ácido γ -amino butírico (GABA), y glicina [8, 14-16].

Todo lo anterior destaca la importancia de los estudios bioquímicos sobre la esquizofrenia para los que son adecuadas las muestras de tejido cerebral *post mortem*, aunque para estudios *in vivo* es muy conveniente el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR), ya que la composición de este fluido refleja la actividad metabólica del SNC.

1.2. El Líquido Cefalorraquídeo

El LCR es similar a un ultrafiltrado del plasma, pero es más bien una secreción [14]. Su concentración de sodio es 7 veces mayor que la del líquido extracelular del encéfalo, la de glucosa es 30% menor y la de potasio 40% más baja [17]. Algunos reportes indican que las concentraciones de sodio, cloruro, magnesio, potasio y bicarbonato son, respecto del plasma, igual para el primero, menores para los últimos dos y mayores para los restantes [18], o mayores para los dos primeros y menores para los otros tres [19, 20].

La presión del LCR cuando una persona está en posición horizontal puede variar de 70 a 180 mmH₂O [17] (130-150 en promedio [19, 20]).

La función principal del LCR es amortiguar los movimientos que pueda sufrir el encéfalo dentro de la cavidad craneana, con el fin de reducir los posibles daños a este órgano [14, 17, 20]. Esto es posible ya que el encéfalo y el LCR tienen aproximadamente la misma densidad [17], de modo que este órgano literalmente flota en el LCR. También sirve para proveer un medio ambiente controlado para favorecer la actividad cerebral, para regular el volumen del contenido craneano y como vía de transporte de hormonas y metabolitos [14, 20].

1.2.1. Producción y Circulación del Líquido Cefalorraquídeo

El LCR es un fluido secretado por el plexo coroideo [17, 20], que es un conjunto de vasos sanguíneos cubierto por una capa de células epiteliales [17, 18] que forman una estructura secretora especializada [19]. Una parte del LCR (20-40% del total) se produce directamente por el tejido cerebral [20]; algunos autores consideran que esta fracción puede ser incluso de 70% [14]. Este fluido es secretado hacia los ventrículos, que son un conjunto de cuatro cavidades encefálicas delineadas por una capa de epitelio cuboidal denominado epéndima

[14, 17, 19]. Estas cavidades contienen al LCR. La producción de este fluido es el resultado de dos procesos a nivel del plexo coroideo: la filtración del plasma a través de la pared de los capilares y la secreción de algunos componentes por parte del epitelio coroideo [14, 18]. Las proteínas plasmáticas son posiblemente digeridas por los lisosomas de las células endoteliales [14], lo que explica la menor concentración proteica del LCR respecto del plasma.

De este fluido se secretan aproximadamente 400-800 mL por día [14, 17-20] a una velocidad promedio de 0.3-0.4 mL/min [14, 18, 21].

Casi el total del LCR es producido por los dos ventrículos laterales [17]. El líquido producido en estas cavidades pasa al tercer ventrículo a través del *agujero de Monro*, se combina con el LCR ahí secretado y pasa hacia el cuarto ventrículo por el *acuoducto de Silvio* [14, 17, 18, 20]. Sale del cuarto ventrículo por dos aberturas laterales, los *agujeros de Luschka*, y una abertura media denominada *agujero de Magendie* [14, 17, 18, 20]; por cualquiera de estas tres vías pasa a la *cisterna magna*, que es un gran espacio detrás del bulbo raquídeo y debajo del cerebelo [17, 20]. Esta cisterna se comunica con el espacio subaracnoideo, el cual rodea la totalidad del cerebro y la médula espinal, por el cual fluye el LCR [14, 17, 18, 20]. En este espacio se reabsorbe hacia el torrente sanguíneo a través de las vellosidades aracnoideas [14, 17, 19] (Figura 3). Estas vellosidades están recubiertas por células endoteliales que permiten el flujo relativamente libre del LCR, proteínas, e incluso partículas tan grandes como los eritrocitos hacia la sangre venosa [14, 17, 18]. Una porción del LCR (un décimo de lo que se forma) puede reabsorberse por pinocitosis en el plexo coroideo [14]. La circulación del LCR se mantiene permanentemente debido a la presión generada por su secreción, las pulsaciones por los movimientos respiratorio y arterial, y el impulso de los cilios de las células ependimales, entre otros mecanismos [20].

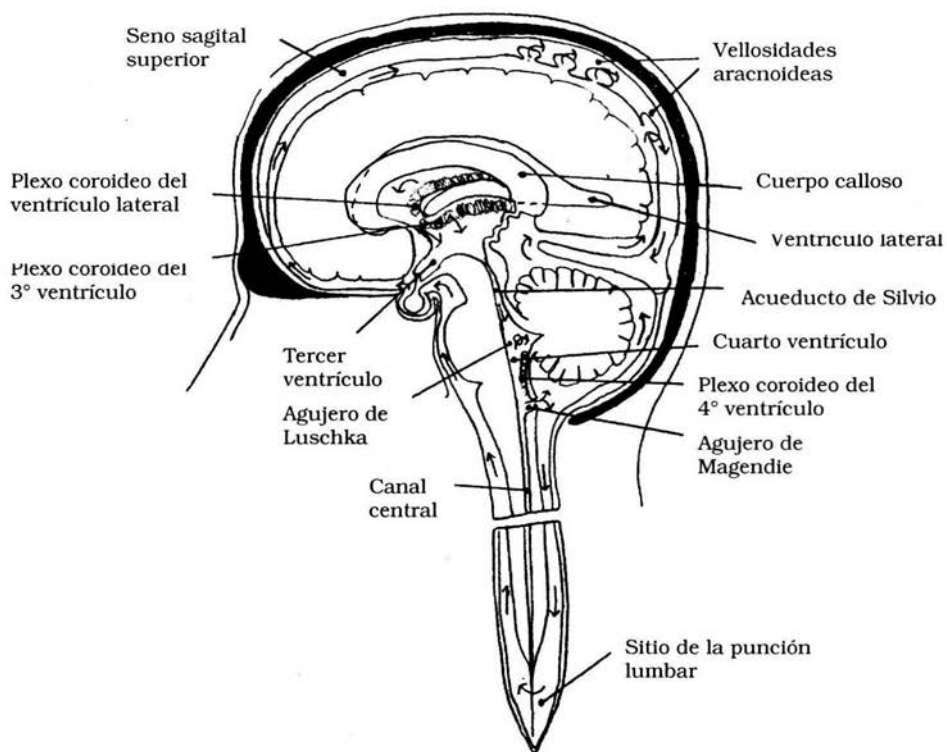


Figura 3. Circulación del LCR humano (reproducido de la referencia [19]).

1.2.2. Utilidad Diagnóstica del Líquido Cefalorraquídeo

Este fluido es útil para diagnóstico especialmente en casos de infecciones del SNC pero también en otras alteraciones. Diferentes metabolitos del tejido nervioso son secretados a, y transportados por, el LCR, por lo que los cambios en la composición de este fluido son reflejo de la actividad metabólica del SNC [21].

Para tomar una muestra de este líquido el paciente se coloca en decúbito lateral, se anestesia localmente luego de desinfectar la zona de la punción; se inserta una aguja en el conducto raquídeo lumbar por debajo del extremo inferior de la médula (generalmente en el 4° espacio lumbar), y cuando se observa la salida del líquido se une la aguja a un manómetro de agua [17, 20]. Se deja que el líquido suba libremente por el tubo. La distancia en milímetros que se eleve sobre el nivel de la aguja es la presión del LCR medida en mmH₂O, la cual dividida entre 13.6 equivale a mmHg [17]. La muestra obtenida puede colectarse (si se desea) en viales que contengan una mezcla de inhibidores de proteasas, especialmente si se estudiará la composición protéica o de aminoácidos de este fluido. Sin embargo, la utilidad de esta recomendación es relativa ya que el LCR contiene sus propios inhibidores de proteasas como α -antitripsina y α -antiquimotripsina (Tabla 4) [21]. Se mide nuevamente la presión del LCR luego de coleccionar la muestra [20]. La complicación más frecuente a la punción lumbar es cefalea causada por hipotensión [20]. Este procedimiento está contraindicado en casos de hipertensión endocraneana [20].

1.2.3. Barreras en el Sistema Nervioso Central

Muchas sustancias de peso molecular elevado, y otras como los electrolitos, pasan fácilmente hacia el líquido intersticial en casi todo el organismo pero difícilmente lo consiguen hacia el intersticio cerebral [17]. Esto

se debe a la presencia de la barrera hematocefalorraquídea (BHCR, entre la sangre y el LCR) y la barrera hematoencefálica (BHE, entre la sangre y el líquido intersticial del cerebro) [17]. Estas barreras se encuentran en el endotelio vascular del plexo coroideo y de prácticamente todo el parénquima encefálico excepto el hipotálamo [17].

La impermeabilidad de estas barreras no existe para moléculas como el agua, el oxígeno, el dióxido de carbono [17, 20] y el alcohol [17], entre otras, las cuales pueden atravesarlas por difusión pasiva.

Esta regulación selectiva en el transporte de moléculas de la sangre al SNC se debe a la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares [17, 18, 22] tanto en el plexo coroideo (BHCR) como en el parénquima encefálico (BHE), de modo que las membranas de estas células casi se fusionan entre sí, evitando la presencia de hendiduras como ocurre normalmente en los capilares del resto del organismo [17]. Además de estas uniones, las células endoteliales a nivel del SNC se caracterizan también por presentar entre 3 y 5 veces más mitocondrias, comparadas con las células de los capilares que irrigan otros órganos [18], lo que refleja su requerimiento del trifosfato de adenosina para los mecanismos de transporte activo que compensan la impermeabilidad de las barreras. La permeabilidad selectiva del plexo coroideo se debe solamente a las células del endotelio vascular ya que las células endoteliales no presentan uniones estrechas [18].

La función de estas barreras es proteger al SNC de las moléculas que se encuentren en el torrente sanguíneo, exógenas o endógenas, cuando puedan alterar las funciones del SNC, y para bloquear la salida de neurotransmisores y otras moléculas que podrían alterar la actividad de otros órganos y sistemas [14].

El epéndima es en general muy permeable, por lo que las moléculas que estén presentes en el LCR tienen fácil acceso al líquido intersticial cerebral, y viceversa [14, 17].

1.2.4. Composición Normal del Líquido Cefalorraquídeo

Normalmente, este fluido contiene algunos de los componentes del plasma pero en diferentes concentraciones. Los principales solutos encontrados en el LCR humano se muestran junto con sus concentraciones promedio en la Tabla 3 [23], mientras que la Tabla 4 presenta algunas de las principales proteínas presentes en ese mismo fluido [21].

Tabla 3. Principales solutos en el LCR humano (referencia [23], excepto donde se indica otra).

Soluto	Concentración
Ácido Láctico	10-24 mg/dL
Ácido úrico	0.5-4.5 mg/dL
Albumina	10-30 mg/dL
Aminoácidos totales	826 μ M [24]
Colesterol	0.2-0.6 mg/dL
Creatinina	0.5-1.2 mg/dL
Glucosa	40-70 mg/dL
GMPC	2.4 \pm 0.5 nM [14]
Ig G	3.1 mg/dL [25]
LDH	1/10 respecto a LDH sérica
Proteínas totales (adultos)	15-45 mg/dL
Urea	5-25 mg/dL
Calcio	2.1-2.7 meq/L
Cloro	118-132 meq/L
CO ₂	25-30 meq/L
Magnesio	2.4 meq/L
Potasio	2.0-3.5 meq/L
Sodio	144-154 meq/L

La composición proteica del LCR involucra en su mayor parte a albúmina sérica y se completa con pequeñas contribuciones de otras proteínas, entre las

que ya se mencionaron las inhibidoras de proteasas (sección 1.2.2); también lisozima, la sintasa D2 de prostaglandinas y la dismutasa de superóxido (DSO) están contenidas en este fluido; al parecer no está presente la sintasa del óxido nítrico (NOS) [21].

Tabla 4. Principales proteínas identificadas en el LCR humano [21]. pl, punto isoeléctrico.

Proteína	Masa (Da)	pI
Albumina sérica	69366	6.05
α_1 -Antitripsina	22828	6.11
α_1 -Antiquimotripsina	47651	5.33
Cadena Ig κ	15174	5.50
Cadena Ig λ	10187	4.60
Citocromo P450 monooxigenasa	49534	5.98
Dismutasa de superóxido	15935	5.70
Elastasa IIB	28936	7.98
Lisozima	15872	9.3
Transferrina sérica	36360	6.53
Precursor de C3 (complemento)	187165	6.02
Sintasa D2 de prostaglandinas	21028	7.65

1.2.4.1. Aminoácidos en el Líquido Cefalorraquídeo

Otros componentes importantes del LCR son los aminoácidos libres. Estos tienen diversas funciones en el SNC (como sustratos de procesos metabólicos, transmisores y/o moduladores, osmolitos [15, 26]) y su estudio es importante ya que el contenido de éstos en el LCR correlaciona con el contenido cerebral de los mismos [27].

Sin embargo, el análisis del LCR tiene la desventaja de ser un reflejo general de alteraciones que posiblemente suceden en regiones específicas del cerebro, por lo que no es posible obtener detalles sobre zonas particulares del

SNC a partir de este fluido. Lo que sí puede considerarse correcto es que las concentraciones de aminoácidos en el LCR son reflejo del metabolismo del SNC dado que éstos (al menos citrulina, glutamato, aspartato, glicina y GABA, entre otros) no atraviesan de forma significativa la BHE [28]. Otros aminoácidos sí la atraviesan significativamente, como fenilalanina, tirosina, arginina, ornitina y lisina, entre otros [28].

Las concentraciones de aminoácidos en el LCR humano no varían significativamente con la edad entre los 20 y los 60 años [27] excepto en el caso de valina y glicina [24]; tampoco se modifican en función del género, excepto por una mayor concentración de aspartato [27] y una menor concentración de leucina [24] en las mujeres.

La concentración de aminoácidos en el LCR depende de algunos factores como el nivel de aminoácidos circulantes en el plasma, el flujo sanguíneo cerebral, sus propiedades fisicoquímicas, los mecanismos de transporte (si los hay) hacia dentro y fuera del SNC, y su síntesis y utilización en dicho sistema [14, 29]. El primero de estos factores parece no afectar a todos los aminoácidos pero sí a algunos como glutamato, glutamina, glicina, tirosina, ornitina, lisina, histidina y arginina [24].

Las concentraciones promedio de algunos aminoácidos en el LCR humano se enlistan en la Tabla 5. Estas concentraciones son menores que las del plasma [24, 29], lo cual se debe al menos en parte, a la presencia de mecanismos de transporte cerebro-sangre para algunos aminoácidos [14, 22, 29].

Se han reportado alteraciones en la concentración de aminoácidos en el LCR en algunas patologías [14-16, 31, 33], entre las que pueden contarse: esclerosis múltiple, hipertensión intracraneana, coma hepático, hiperamonemia, fenilcetonuria, depresión, enfermedad de Parkinson, epilepsia, narcolepsia, esclerosis lateral amiotrófica y esquizofrenia, entre otras.

Tabla 5. Concentraciones promedio de algunos aminoácidos en LCR y plasma humanos.

Aminoácido	Concentración en el LCR (μM)	Concentración Plasmática (μM)
Arginina	6.27 [30]	76-80.9 [32]
	14.2 [20]	
	22.4 ± 4.2 [24]	80.9 ± 28.3 [24]
	39.0 ± 7.96 [31]	
Aspartato	0.26 ± 0.14 (varones) [27]	20 ± 5 [34]
	0.37 ± 0.16 (mujeres) [27]	
	2.99 ± 2.63 [31]	
Citrulina	0.84 [30]	29 [32]
	1.5-2.7 [32]	
	5.7 [32]	
	14.2-21.6 [32]	
Dimetilarginina Asimétrica	0.014-0.040 [33]	Aproximadamente 0.6 [35]
Fenilalanina	7.5 [20]	57.8 ± 22.3 (mujeres) [24]
	9.9 ± 2.0 [24]	70.9 ± 25.0 (varones) [24]
GABA	0.238 ± 0.202 [31]	NR
Glicina	3.05-11.50 [27]	282.7 ± 101.6 [24]
	11.6 ± 4.62 [31]	
Glutamato	0.18-1.15 [27]	61.3 ± 30.8 [24]
	2.84 ± 1.93 [31]	
	26.1 ± 18.9 [24]	
Glutamina	400-1100 [23]	641.0 ± 93.0 [24]
Taurina	2.90-13.3 [27]	77.2 ± 26.1 [24]
Tirosina	9.5 ± 2.6 [24]	73.0 ± 26.3 [24]
Aminoácidos Totales	826 ± 102 [24]	NR
	1760 ± 340 [14]	

Los datos de [30] fueron convertidos a concentración μM considerando 30 mg/dL de proteínas en LCR. NR, no reportado en las referencias que componen esta tabla.

Los resultados publicados hasta la fecha sobre las concentraciones de aminoácidos en el LCR humano son muy variables, pues dependen de la población estudiada (personas clínicamente sanas o pacientes con trastornos neurológicos), además de la dieta que reciban y la técnica de análisis utilizada, entre otros factores. Pero de cualquier modo queda clara la importancia del estudio de estas concentraciones en las alteraciones psiquiátricas y neurológicas.

1.3. El Óxido Nítrico

El NO es un mensajero no tradicional que ha puesto a trabajar a prácticamente el mundo entero en los años recientes. En 1988 Moncada y cols. concluyen que el NO es el denominado Factor Relajante Derivado del Endotelio [36]; en 1990 fue identificado como neurotransmisor parasimpático inhibitorio no adrenérgico no colinérgico [37]. Se han publicado aproximadamente 1000 artículos sobre el NO entre 1964 y 1988, y más de 55000 entre 1989 y 2003, de los cuales más de 3000 corresponden solo al primer semestre de este último. La importancia de este mensajero se debe a su participación en una gran variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos.

1.3.1. Características Generales

El NO es un gas incoloro producido por muchos tipos celulares, entre ellos: glia, neuronas, células endoteliales, macrófagos, células intestinales y de la retina [32, 38-42], que puede tener influencia sobre casi cualquier tipo celular en los mamíferos [43].

Además de los humanos, también es producido por otros organismos como los hongos, los artrópodos y los roedores [44].

Su vida media en sistemas biológicos es de unos cuantos segundos a temperatura ambiente (alrededor de 10s [42, 45-48], 30s [10] o hasta 50s [39, 49]), ya que se oxida formando nitritos y posteriormente nitratos [30, 50, 51], los cuales son los metabolitos estables de este gas.

Por ser no polar puede difundir hacia afuera de las células que lo producen [10, 11, 32, 46, 52-55] a una velocidad de 50 $\mu\text{m/s}$ [48] hasta un radio de cuando menos 95 μm [42].

Al difundir, una parte del NO producido llega al torrente sanguíneo donde reacciona con la oxihemoglobina (u oximioglobina en las células musculares)

formando metahemoglobina y nitratos [48, 49]; éste es el principal mecanismo que regula la concentración del NO *in vivo* [56].

El NO no es altamente reactivo a pesar de ser un radical libre, solo reacciona fácilmente con otros radicales libres y con los metales de transición [56]. Tiene afinidad por átomos metálicos y por grupos sulfhidrilo en proteínas como guanilato ciclasa, el receptor glutamatérgico para NMDA, citocromo C y aconitasa, entre otras [38, 39-42, 48, 52, 57, 58].

Los eventos fisiológicos en los que participa son muchos, muy diversos y están reportados ampliamente en la literatura [10, 32, 38, 42, 43, 46, 52-55, 58-62]. Algunos de ellos se enlistan en la Tabla 6. Los efectos del NO están, al menos en parte, mediados por la activación de guanilato ciclasa cuando el NO se une al grupo hemo de esta enzima; esto resulta en la síntesis del monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que activa diferentes procesos celulares [39-42, 45, 48, 53, 60].

En los sistemas biológicos el NO puede comportarse como agente oxidante o como reductor [42, 48]. Puede perder un electrón formando un catión nitrosonio o ganar uno convirtiéndose en anión nitroxilo; éstas y otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON's) se muestran en la Tabla 7. Estas especies reactivas pueden convertirse unas en otras de acuerdo con los cambios en el ambiente redox intracelular [63].

Las principales reacciones que sufre el NO en sistemas vivos son solamente tres: la reacción con oxihemoglobina, la interacción con los centros metálicos en algunas proteínas y su degradación por el anión superóxido [56].

Tabla 6. Algunas funciones en las que participa el NO.

Sistema	Función
Sistema Nervioso Central	Sinaptogénesis durante el desarrollo
	Detención de la proliferación
	Detención del crecimiento
	Inducción de diferenciación
	Migración celular
	Sensibilización al dolor
	Memoria y aprendizaje
	Olfato
	Visión
	Analgesia
	Flujo sanguíneo cerebral
	Liberación de neurotransmisores
Sistema Nervioso Periférico	Relajación muscular
	Coordinación motora
	Vasodilatación
Sistema vascular	Inhibición de la adhesión leucocitaria
	Inhibición de adhesión y agregación plaquetarias
Pulmón	Motilidad broncociliar
	Secreción de mucosa
Páncreas	Secreción de insulina y amilasa
Parótidas	Secreción de amilasa
Intestino	Peristalsis
	Secreción exócrina
Glándulas suprarrenales	Liberación de adrenalina y corticosteroides
Otros	Erección del pene
	Respuesta inmune celular
	Ciclos de sueño
	Ingesta de alimentos y bebidas
	Termorregulación
	Transcripción y traducción de ácidos nucleicos
	Esteroidogénesis
	Comportamiento sexual

Tabla 7. Algunas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Especie	Fórmula Molecular
Nitrosonio	NO ⁺
Óxido nítrico	NO [·]
Nitroxilo	NO [·]
Nitronio	NO ₂ ⁺
Dióxido de nitrógeno	NO ₂
Peroxinitrito	ONOO [·]
Dióxido de dinitrógeno	N ₂ O ₂

1.3.2. Efectos Intracelulares e Intercelulares

El NO participa en cascadas de transducción de señales mediante la activación de guanilato ciclasa (sección 1.3.1); esta enzima no se encuentra en las neuronas productoras de NO excepto por las células granulares del cerebelo, lo que sugiere que existe una cooperación intercelular en la transmisión de estas señales [42]. Algunos autores consideran a la biosíntesis del NO como continuación de la señalización glutamatérgica [53, 64].

En el sistema nervioso autónomo el NO es el neurotransmisor de las terminales inhibitorias parasimpáticas no adrenérgicas-no colinérgicas [32, 37, 42, 43, 52, 53]. Estas terminales inervan, entre otros, a los tejidos gástrico y cardiaco. Pero el NO no es un neurotransmisor clásico, ya que no es liberado por exocitosis sino por difusión [11, 46, 52, 54, 65], y es producido en el momento en que se requiere: no se almacena [43, 52, 65].

En el SNC, el NO contribuye principalmente a acoplar el nivel de actividad cerebral con la irrigación sanguínea al encéfalo, a dirigir el crecimiento de las terminaciones nerviosas (tanto en el sistema visual como en la corteza cerebral), a regular la sobrevivencia y la migración neuronales, así como la diferenciación de las células gliales y la liberación de neurotransmisores [43, 46, 47, 52, 60].

En el hipocampo el NO participa en la Potenciación a Largo Plazo [32, 42, 43, 52-54, 65, 66]. Se propone en este proceso que el NO actúa como mensajero retrógrado, al ser producido en terminales post-sinápticas como respuesta a un estímulo (p. ej. glutamato) y difundir hacia las neuronas presinápticas en las que aumenta la liberación de neurotransmisores [10, 42, 43, 52-54].

El GMPc producido como respuesta a la activación de guanilato ciclasa mediada por el NO puede abrir directamente canales de calcio o activar proteínas cinasas de serina/treonina, lo que resulta en la regulación de diferentes procesos intracelulares [10, 43, 52, 60].

1.3.3. Características de la Sintasa del Óxido Nítrico

La formación del NO en los mamíferos se debe a una reacción catalizada enzimáticamente por la NOS (L-arginina, NADPH: oxígeno reductasa; EC 1.14.13.39); ésta es una enzima homodimérica [32, 67] que existe en al menos tres isoformas. Las tres NOS's utilizan como sustratos 1 mol de L-arginina (K_m 2-20 μ M [50, 68, 69]), además de 2 moles de O_2 , y entre 1 y 2 moles de NADPH [32, 39, 41, 42, 44, 58, 59, 70-74], por cada mol de producto formado. Los cofactores requeridos para su actividad son FMN, FAD, protoporfirina IX, calcio-calmodulina y tetrahidrobiopterina [10, 32, 40, 42, 44, 52, 53, 62, 73-75].

El producto de la actividad de esta enzima es una mezcla de cantidades equimolares de NO y L-citrulina [45, 50, 65, 71]. Los productos de la actividad de la NOS pueden detectarse en la saliva, la orina y el aliento [44], además del LCR y la sangre. El cerebro es el órgano que presenta la mayor actividad de la NOS en los humanos [51].

En lo sucesivo se hablará en singular de la NOS para referirse en general a las tres isoformas de la enzima. Se especificará una isoenzima en particular solo cuando sea necesario.

Las NOS's que se expresan de forma constitutiva (NOS I y NOS III) dependen de calcio (más de 80-100 nM [41, 44], 150 nM para el 50% de su actividad [45]) y calmodulina [32, 42, 58, 62, 65, 69, 76].

La NOS tipo I se expresa principalmente en las neuronas, tanto en el cerebro como en la médula espinal y suprarrenal [59], aunque también se encuentra en las células endoteliales [58, 70] y las células epiteliales en el pulmón, el útero y el estómago, además de encontrarse en el riñón, el músculo esquelético, los islotes pancreáticos y también en los neutrófilos [44, 59, 72, 76]. Se localiza en el citosol de éstas células [10, 42], en el retículo endoplásmico [69] o también en la membrana neuronal asociada mediante otras proteínas con el receptor glutamatérgico para NMDA [32, 59, 70, 72].

Esta isoenzima es un homodímero de 280 kDa formado por monómeros α hélice de 150-160 kDa [42, 65, 70, 76]. Posee un dominio denominado PDZ en su extremo N-terminal que permite su asociación con proteínas de membrana [59, 70, 72]. Está codificada en la región q24.2-q24.3 del cromosoma 12 [44, 67, 70]. Se conocen algunas variantes de procesamiento alternativo del transcrito primario de este gen [59, 70, 72, 77].

La isoenzima tipo I se expresa solo en algunos grupos neuronales en el cerebro, pero no se relaciona con un sistema de neurotransmisión en particular [52, 65], sino que puede encontrarse junto con células glutamatérgicas, GABAérgicas, peptidérgicas, colinérgicas o células neuroendocrinas del hipotálamo [52].

La isoforma inducible (NOS II) es independiente de calcio y calmodulina [10, 40, 42, 58]. Se encuentra principalmente en el citosol de algunas células que participan en la respuesta inmune como los macrófagos y los neutrófilos [10, 42, 58, 67, 69, 72]. Está codificada en la región cen-q11.2 del cromosoma 17 [67, 70]. En el SNC se localiza en los astrocitos y las células microgliales [42, 58, 67, 72, 78].

La expresión de esta isoenzima puede inducirse con el lipopolisacárido

(LPS) bacteriano y el interferón (IFN)- γ en células como los hepatocitos y las neuronas [10, 32, 44, 53, 58, 64, 67, 70, 72, 76], y en prácticamente cualquier tipo celular durante una respuesta inmune [43, 67, 69, 76].

Una vez que esta enzima es sintetizada *de novo* puede producir cantidades mayores de NO que las otras isoenzimas [58, 67] y por periodos de hasta 5 días [67].

La NOS III se localiza principalmente en la membrana de las células endoteliales [10, 42, 52, 58, 59, 69]; también puede encontrarse en el citosol de los macrófagos [42] y en los astrocitos [32], las células epiteliales de los túbulos renales, las células intersticiales del colon canino y las neuronas de varias regiones cerebrales [42, 44, 60, 70] incluyendo el hipocampo [59, 66]. Está codificada en la región q35-q36 del cromosoma 7 [44, 67, 70]. Tiene un peso molecular de 133-135 kDa [70, 76]. No se conocen variantes de procesamiento alternativo del transcrito primario correspondiente a esta proteína [70].

Su anclaje a la membrana celular se debe a la presencia de un sitio de miristoilación [44, 59, 72, 76] en el residuo Gly2 de su extremo N-terminal y también a sitios de palmitoilación en residuos Cys15 y Cys26 del mismo extremo [59, 70, 72]. Esta isoenzima se encuentra en forma particulada (90% del total de la proteína) y tiene como principales efectos fisiológicos la dilatación de los vasos sanguíneos y el bloqueo de la expresión de moléculas de adhesión para leucocitos y plaquetas inducida por citocinas [58].

Las tres isoenzimas contienen dominios de reductasa y oxigenasa [42] y producen NO a partir del grupo guanidino de arginina en una reacción estereoespecífica para el isómero L de este aminoácido.

La NOS se ha localizado por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en las neuronas y en el endotelio vascular que irriga al cerebro [32, 42, 66] además de las células gliales [42, 66]. Las regiones cerebrales que más expresan esta enzima son el cerebelo [32, 42, 65, 66, 79-81], el tálamo [81], el

hipocampo [32, 81] y el bulbo olfatorio accesorio [42, 80]; solo el 2% (o menos) de las neuronas presentan la enzima en la corteza cerebral [32, 42, 65, 81], el cuerpo estriado [32, 42, 81], el bulbo olfatorio principal [80] y en general la región anterior del cerebro [80]. Los ensayos de actividad de la NOS reflejan una distribución similar: mayor actividad en el cerebelo y algunas regiones límbicas y baja actividad en el estriado, el hipocampo y la corteza cerebral [51].

Como parte de la biosíntesis del NO, la NOS cataliza la reducción de O₂ a peróxido y superóxido [70, 76, 78]; este último se detecta libre cuando la NOS actúa con niveles de arginina por debajo del óptimo [42, 52, 57, 67, 70, 72, 73, 76, 82] que es de 100 μM [32, 40, 74] o hasta 300 μM [50].

El mecanismo actualmente aceptado para la actividad de la NOS involucra el transporte de electrones desde el NADPH hasta el oxígeno unido al grupo hemo de la enzima a través de los nucleótidos de flavina (FAD y FMN, en ese orden) [70, 72, 74]. Esta transferencia ocurre desde el dominio reductasa de una subunidad hasta el dominio oxigenasa de la otra subunidad [70].

El primer paso en la catálisis enzimática es la hidroxilación de L-arginina que forma como intermediario N^ω-hidroxi-L-arginina (NHA) [57, 62, 70, 72, 76] en una reacción que requiere de un mol de O₂ y uno de NADPH en presencia de tetrahidrobiopterina [70, 76].

El segundo paso en la biosíntesis del NO es la oxidación de NHA para formar NO y citrulina [76].

1.3.4. Metabolismo y Transporte de Arginina

La biosíntesis de arginina (Figura 4) comienza con la síntesis de ornitina, la cual sucede en dos etapas catalizadas por la sintetasa I de carbamoilfosfato (EC 6.3.4.16) y la carbamoiltransferasa (o transcarbamilasa) de ornitina (EC 2.1.3.3) [32, 77]. Estas enzimas se localizan en la matriz mitocondrial y solo se expresan juntas en los hepatocitos periportales, las células epiteliales de la

mucosa del intestino delgado y los colonocitos [32], aunque se ha reportado una baja actividad de ambas enzimas en el cerebro de los recién nacidos [32]. La transcarbamilasa de ornitina [42, 79] y la sintetasa I de carbamoilfosfato [79] no se expresan en el cerebro, por lo que dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (ver más adelante en esta sección) y la NOS parecen ser las únicas enzimas que sintetizan citrulina en el SNC [32, 79].

La mayor parte de la ornitina que obtiene un adulto proviene de la dieta o es producida únicamente por el intestino, el cuál libera citrulina a la circulación general para que sea captada por los riñones, entre otros tejidos, en donde las células de los túbulos proximales sintetizan arginina y la liberan al torrente sanguíneo [32].

La conversión de citrulina en arginina es un proceso necesario para completar la ruta planteada arriba. Esto requiere de dos enzimas citosólicas que parecen expresarse en cualquier tipo celular [32, 69, 83]. La sintetasa (EC 6.3.4.5) y la liasa (EC 4.3.2.1) de argininosuccinato [32, 42, 79]. Ambas enzimas se localizan en algunas neuronas, pero no en las mismas, lo que sugiere que existe cooperación interneuronal en la biosíntesis de arginina en el SNC [32, 42, 79]. Del mismo modo, la NOS y la sintetasa de argininosuccinato se expresan generalmente en diferentes neuronas [79], por lo que también la reutilización de citrulina para la ruta arginina-NO/citrulina es un proceso intercelular. La síntesis de argininosuccinato es la única ruta metabólica conocida en la que citrulina actúa como sustrato [79]. El argininosuccinato debe ser liberado por las células que lo producen y captado por otras células, (posiblemente) mediante transportadores para péptidos [32], para ser convertido en arginina.

El paso limitante para la síntesis de arginina es la formación de argininosuccinato, porque depende de la disponibilidad de aspartato [32].

Arginina es transportada bidireccionalmente a través de la BHE [14, 50]. En el SNC este aminoácido se almacena principalmente en los astrocitos [32]. Estas células cuentan con las enzimas necesarias para la síntesis de aspartato, argininosuccinato, arginina y citrulina; pueden realizar el ciclo completo

citrulina-arginina-NO/citrulina, además de que expresan los transportadores que captan arginina. Todo esto favorece la acumulación de este aminoácido en los astrocitos, desde los cuales se libera por la estimulación de receptores glutamatérgicos no-NMDA para ser captado por las neuronas que producen NO [32].

La arginina sintetizada en los riñones o el hígado del adulto [32] puede ser utilizada para la formación de NO y citrulina en casi cualquier tipo celular [32] mediante la captación de arginina a través del sistema denominado y^+ , con contribuciones menores de otros sistemas [32, 69]. El sistema y^+ se caracteriza principalmente por tener alta afinidad para aminoácidos catiónicos (arginina, lisina, ornitina y derivados metilados de arginina), ser independiente de sodio extracelular; expresarse en células endoteliales, macrófagos, células de musculatura lisa, neuronas, astrocitos, microglia, células del epitelio del plexo coroideo, entre otras; y permitir la captación mitocondrial de arginina [32, 69, 83]. La presencia de este sistema transportador en el plexo coroideo permite la captación de arginina circulante en la sangre hacia el LCR y el cerebro. Todos los aminoácidos catiónicos compiten por este sistema de transporte [28, 69].

Arginasa (EC 3.5.3.1) (K_m 1-3 mM [50] o hasta 20 mM [69]) se expresa también en el SNC. Esta enzima participa en la regulación de la biosíntesis del NO modificando la disponibilidad del sustrato (L-arginina) de la NOS [40, 84]. En el SNC, arginasa puede encontrarse principalmente en las neuronas del cerebelo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio, entre otras regiones; una de sus isoformas se localiza en las células gliales [32]. Ambas isoenzimas parecen expresarse juntas solo en los macrófagos [32].

Otra ruta del catabolismo de arginina se debe a la actividad de la descarboxilasa de arginina (EC 4.1.1.19), la cual es una enzima mitocondrial que se expresa en diferentes tejidos incluyendo al cerebro [32, 69]. Se ha propuesto que agmatina (el producto de la descarboxilación de arginina) puede tener funciones como mensajero sobre receptores adrenérgicos, como regulador de la proliferación celular [32, 69], modulador del receptor glutamatérgico para NMDA [32] e inhibidor competitivo de la NOS [32, 69].

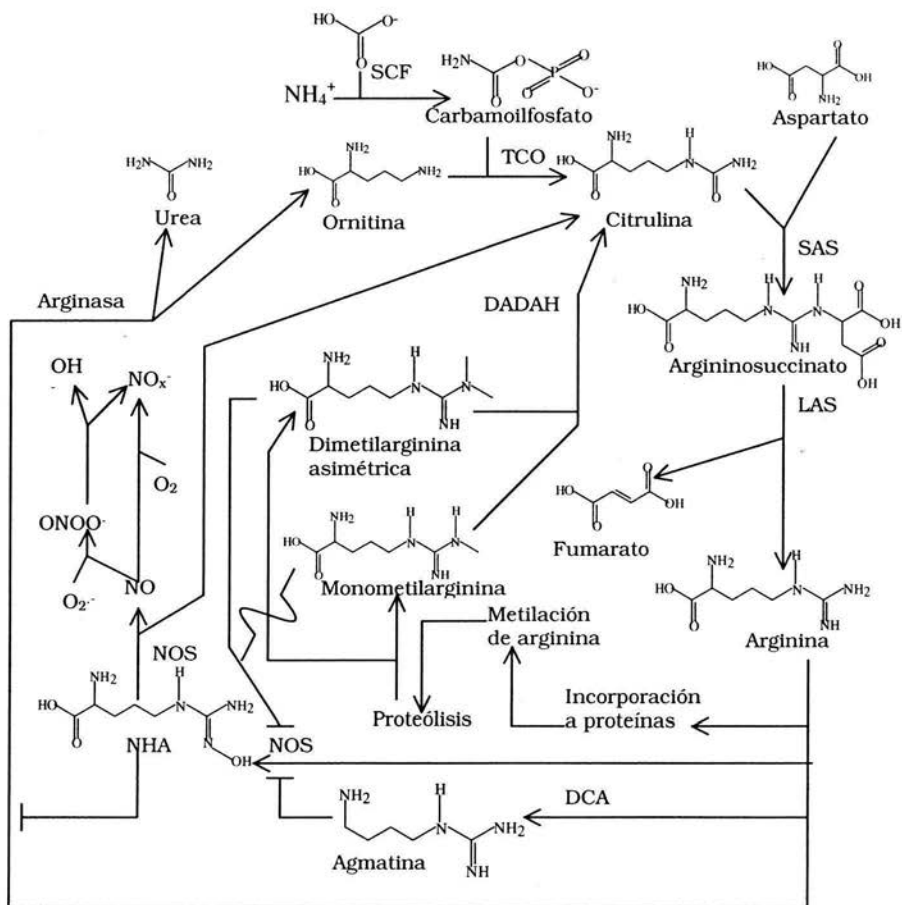


Figura 4. Metabolismo de arginina. Las líneas indican reacciones (\longrightarrow) o el bloqueo de algún proceso enzimático (\longleftarrow); DADAH, dimetilarginina dimetilaminohidrolasa; DCA, descarboxilasa de arginina; LAS, liasa de argininosuccinato; NO_x , nitritos y nitratos; SAS, sintetasa de argininosuccinato; SCF, sintetasa de carbamoilfosfato; TCO, transcarbamilasa de ornitina.

Los residuos de arginina que hayan sido incorporados durante la síntesis de proteínas pueden ser metilados como modificación post-traduccional y

posteriormente ser liberados por proteólisis [32, 76]. Esto genera derivados metilados de arginina, como N⁰-monometil-L-arginina y N⁰,N⁰-dimetil-L-arginina (dimetilarginina asimétrica), los cuales son inhibidores competitivos de la NOS [32, 33, 35, 76] y se han encontrado en regiones del SNC como el cerebelo, el hipocampo, el hipotálamo y el bulbo olfatorio [32]. La enzima que degrada a estos compuestos es la N⁰,N⁰-dimetil-L-arginina dimetilaminohidrolasa (EC 3.5.3.18), que se expresa en diferentes células incluyendo a los astrocitos y a las neuronas de algunas regiones cerebrales (principalmente en la corteza cerebral y el tálamo, además del hipotálamo y el cerebelo) y produce citrulina [32, 76]. El efecto global de esta enzima es favorecer la actividad de la NOS directamente por la hidrólisis de los inhibidores e indirectamente por la producción de citrulina, la cual puede ser convertida en arginina aumentando la disponibilidad del sustrato de la NOS.

Arginina es también un activador alostérico de la sintetasa de N-acetilglutamato, enzima hepática que cataliza la conversión de glutamato y acetil-CoA en N-acetilglutamato, el cual es un cofactor para la sintetasa I de carbamoilfosfato [69]. Esto completa el ciclo metabólico de arginina.

1.3.5. Regulación de la Biosíntesis y los Efectos del Óxido Nítrico

En esta sección se describen en primer lugar los mecanismos comunes que regulan positiva- y negativamente la actividad de las tres NOS's y los efectos del NO, y posteriormente se mencionan mecanismos particulares para cada isoforma de la enzima.

En el SNC el principal neurotransmisor asociado con la actividad de la NOS es el glutamato [60] mediante el receptor para NMDA [53, 65], pero también está reportada la síntesis de NO mediada por bradicinina, norepinefrina, serotonina, vasopresina y acetilcolina [10, 39, 42, 44, 73, 75], entre otros.

La disponibilidad del sustrato y los cofactores de la NOS regula la actividad de esta enzima [76, 85]. En condiciones fisiológicas, la NOS trabaja con niveles de arginina menores al óptimo, de modo que la actividad de esta enzima aumenta cuando se agrega arginina a un sistema *in vitro* [32] o *in vivo* [51] y disminuye cuando se reduce la ingesta de arginina en los adultos [69]. También disminuye la actividad de la NOS entre 18% y 42% en varias regiones cerebrales en animales deficientes en la transcarbamilasa de ornitina (sección 1.3.4) [86]. En el SNC, el glutamato induce la liberación de arginina por parte de las células que la producen y almacenan (sección 1.3.4) [32], favoreciendo la captación neuronal de arginina y la actividad de la NOS.

Cuando la NOS I no se encuentra unida a tetrahidrobiopterina mantiene su función de NADPH oxidasa, e incluso en presencia de concentraciones elevadas de arginina (pero en ausencia del cofactor) no se observa la formación de citrulina [72].

La NOS es susceptible de ser fosforilada en residuos de serina [65, 67] por proteínas cinasas como la dependiente del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (PKA), la dependiente de GMPc (PKG), y la dependiente de Ca²⁺-calmodulina [42, 59, 64, 65, 67, 76]. Todas parecen disminuir la actividad de la NOS *in vitro* [42, 59, 64, 65, 70], aunque algunos estudios reportan que la fosforilación de la NOS no afecta su actividad y otros indican que la aumenta [67].

El NO regula negativamente su biosíntesis por retroalimentación sobre la NOS, uniéndose al grupo hemo de esta enzima [42, 72, 76]. De forma indirecta, el NO regula su biosíntesis mediante S-nitrosilación del receptor glutamatérgico para NMDA, bloqueando temporalmente su activación [42, 58, 63].

Por otro lado, el argininosuccinato podría actuar como neuromodulador sobre receptores glutamatérgicos [79]; en estudios *in vitro* reduce el aumento intracelular de calcio inducido por glutamato [32] y podría reducir la síntesis del NO.

La producción de agmatina aumenta en los astrocitos por efecto del IFN- γ y puede regular negativamente la síntesis del NO, no solo en los mismos

astrocitos sino también en microglia y neuronas [32]. También la producción de metilargininas (sección 1.3.4) puede disminuir la actividad de la NOS [32, 41, 53]; de hecho, estos derivados metilados se localizan en el cerebro, principalmente en el cerebelo y el bulbo olfatorio, que son las regiones que más producen NO en el encéfalo y que menos expresan la enzima que degrada a estos inhibidores (sección 1.3.4).

Otro mecanismo regulador de los efectos del NO es el aumento de la actividad de la fosfodiesterasa de GMPc dependiente de calcio y calmodulina como respuesta a las mismas concentraciones intracelulares de calcio que activan a la NOS [42, 52]. Además, el anión superóxido inhibe reversiblemente a guanilato ciclasa y estimula la actividad de la NOS [42].

La expresión de la sintetasa de argininosuccinato es un punto clave en la regulación de la biosíntesis del NO ya que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de arginina (sección 1.3.4), por lo que esta enzima puede favorecer o no la actividad de la NOS. La inhibición de esta enzima o la no disponibilidad de su sustrato (aspartato) disminuyen notablemente la formación de NO en astrocitos aún en presencia de arginina extracelular [32, 69].

La NOS tipo I puede ser activada por diferentes mensajeros primarios como glutamato, noradrenalina, acetilcolina, vasopresina, oxitocina y algunas citocinas [10]. La expresión de esta isoforma es constitutiva pero puede inducirse por diferentes estímulos como dolor, estrés térmico, tratamiento con colchicina o litio, estimulación eléctrica del músculo esquelético, procesos infecciosos, disminución de la transmisión glutamatérgica en el cerebelo, algunos esteroides (como estradiol y testosterona pero no los glucocorticoides), y lesiones o encefalomiелitis alérgica experimental [59, 76]. Los glucocorticoides disminuyen su expresión, al igual que el LPS y el INF- γ [59]. Al ser fosforilada, se separa de las proteínas de membrana a las que normalmente se asocia, desplazándose hacia el citosol neuronal y perdiendo su acoplamiento con el receptor glutamatérgico para NMDA [64].

Las citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-1, el IFN- γ y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α , además del LPS bacteriano y el péptido amiloide β entre otros, aumentan la biosíntesis del NO favoreciendo la expresión de la NOS II [10, 32, 42, 44, 50, 58, 62, 78].

La expresión de esta isoenzima puede reducirse también por efecto de otras citocinas como IL-4 e IL-10 [58, 59, 64], IL-8, el Factor de Crecimiento Transformante (TGF)- β [44, 59], además de noradrenalina, AMPc [44, 58, 64], inhibidores de cinasas de tirosina y del factor nuclear (NF)- κ B [59], y los glucocorticoides (especialmente cortisol y cortisona) [10, 43, 53, 59].

La NOS tipo III es constitutiva pero su expresión puede inducirse mediante hormonas [10] como los estrógenos [59], además del ejercicio [59, 67], la hipoxia [67] y el estrés provocado por el flujo sobre los vasos sanguíneos [59]. Este último factor es capaz de estimular la actividad de la NOS III aún en ausencia de calcio extracelular y en presencia de antagonistas de calmodulina [59], lo que representa un comportamiento similar a la NOS II. Esta isoenzima aumenta su actividad al ser fosforilada en Ser1179 [70], aunque en otros casos la fosforilación puede hacer que se separe de la membrana celular y se desplace hacia el citoplasma reduciendo su actividad [59, 66, 67]. La hipoxia regula negativamente la expresión de la NOS III en el endotelio de la arteria pulmonar disminuyendo su transcripción y desestabilizando su ARNm, mientras que aumenta la expresión de la NOS III en endotelios no pulmonares [59]. El TNF- α desestabiliza al ARNm de esta proteína [59, 67] sin afectar su transcripción [59]. También disminuye la biosíntesis del NO por esta isoenzima cuando se presentan mutaciones en los sitios de miristoilación y palmitoilación evitando su acoplamiento a la membrana celular [59, 67]. La NOS III puede formar complejos que la inactivan con proteínas como caveolina-1, la cual puede ser desplazada por calmodulina revirtiendo la inactivación [60].

1.3.6. Efectos Tóxicos y Protectores del Óxido Nítrico

Se le atribuyen al NO algunos efectos protectores como el evitar la muerte celular por apoptosis y reducir la toxicidad del H₂O₂ y la peroxidación de lípidos [48, 87].

El NO evita el ensamble de la oxidasa de NADPH [87], que es la principal enzima responsable del estrés oxidante durante una respuesta inmune celular. Estos efectos protectores suceden a concentraciones bajas de NO y es la elevación en su concentración lo que da lugar a los efectos tóxicos que se le atribuyen [85], porque permite la formación de las ERON's (Tabla 7) que son las principales responsables de dichos efectos.

El NO no es neurotóxico *per se* [64] ya que no reacciona fácilmente con la mayoría de las biomoléculas más que con los centros metálicos de algunas proteínas [48, 56]. Para que el NO reaccione con los grupos sulfhidrilo debe ser primero oxidado formando un catión nitrosonio [55, 56, 63], el cual forma complejos nitrosotiol que pueden transferir al nitrosilo de un tiol a otro [55]. Los nitrosotioles favorecen la formación de puentes disulfuro [55] y pueden alterar la estructura de algunas proteínas.

La toxicidad del NO se conoce desde antes que sus efectos fisiológicos. Este gas se encuentra en el humo del tabaco [48], en la atmósfera como contaminante ambiental [39, 48] y participa indirectamente en la formación de la lluvia ácida [39]. Es potencialmente mutagénico por su capacidad para formar nitrosaminas [43], causar rupturas en moléculas del ácido desoxirribonucleico [64, 85] e inhibir a las enzimas reparadoras del mismo [85].

Las células productoras de NO son resistentes a los efectos tóxicos que derivan de dicha función [53, 65, 78, 88, 89], sin embargo el resto de las células en un tejido son susceptibles. Esto se debe posiblemente a una mayor expresión de la DSO en las neuronas NOS-positivas que limite la reacción entre el NO y el anión superóxido en estas células, pero no en las neuronas circundantes [64, 65].

En los mamíferos, la relación entre el NO y el glutamato respecto de la neurotoxicidad se apoya en algunas evidencias como el que un aumento de 2-5 μM en la concentración de glutamato en el LCR puede resultar en daño neuronal [15]. La participación de los receptores glutamatérgicos para NMDA en la excitotoxicidad se relaciona con el aumento intracelular de calcio [40, 58], lo que puede estar relacionado con la actividad de la NOS. Además, la estimulación neuronal con 300 μM NMDA por 24 h provoca muerte celular *in vitro* [40, 90] y este efecto puede ser bloqueado por la adición de arginasa (sección 1.3.4) al medio de cultivo [40].

La participación de las células gliales en la neurotoxicidad [42, 58, 64] es particularmente importante, ya que estas células expresan la NOS tipo II que es la isoenzima de mayor producción de NO (sección 1.3.3), lo que favorece la presentación de efectos tóxicos en el tejido nervioso [42]; además, estas células también producen superóxido [56], lo que favorece la formación de peroxinitrito.

Fisiológicamente, la concentración del NO se mantiene baja mediante su degradación por reducción u oxidación a nivel del complejo IV de la cadena respiratoria [49, 64] o su reacción con la oxihemoglobina [48] formando nitratos y metahemoglobina [76]; esta regulación es importante porque la concentración del NO determina, al menos en parte, la presentación de efectos tóxicos [56]. Pero esto es también relativo: Wink y cols. [87] consideran que el exceso del NO puede frenar la toxicidad del peroxinitrito ya que estas dos especies pueden reaccionar entre sí formando otras menos reactivas como NO_2^- .

El NO puede inhibir directamente por nitrosilación en residuos de cisteína, a diversas proteínas como catepsina B, O^6 -metilguanina-DNA metiltransferasa y las deshidrogenasas de alcohol, aldehído y gliceraldehído 3-fosfato [55], entre otras. También inhibe reversiblemente a la reductasa de ribonucleótidos [10, 48, 52, 56, 58] y a catalasa [56]. Puede alterar la integridad de la BHE [89].

Las funciones reductasa y oxigenasa de la NOS son independientes, por lo que la presencia de bajas concentraciones de arginina (o incluso su ausencia) reduce la función oxigenasa sin disminuir la reducción de oxígeno, permitiendo la producción simultánea de NO y superóxido [72, 82]. Este último al reaccionar con el NO [30, 32, 39, 55, 56, 58, 72, 78, 82] de 3-6 veces más rápido que con la DSO [42, 48, 56, 67] forma peroxinitrito (vida media de 1.9s a pH=7.4 [39]).

La DSO es una de las proteínas susceptibles de ser nitrada en residuos de tirosina (Tyr35 y Tyr136 en el sitio activo de la DSO dependiente de manganeso [91]) mediada por peroxinitrito. Esta modificación evita que la enzima pueda unirse al anión superóxido [42, 91], dejándolo libre y favoreciendo la formación de peroxinitrito [42]. El superóxido también puede generarse por la autooxidación de tetrahidrobiopterina cuando ésta no se encuentra unida a la NOS [72], por lo que puede formarse peroxinitrito aún en presencia de concentraciones elevadas de arginina.

El peroxinitrito formado es capaz de inhibir a la alquiltransferasa (que repara ADN) y a las enzimas del citocromo P450 [49] y oxidar sustratos como desoxirribosa formando malondialdehído [39] además de iniciar la peroxidación de lípidos [63, 64, 89]. El peroxinitrito también puede oxidar tioles [63, 73] además de nitrar y nitrosar diferentes aminoácidos [73], principalmente tirosina [48, 56, 72, 89, 91, 92] en presencia de átomos metálicos [48, 56], y estimula la liberación de arginina por los astrocitos [32] favoreciendo la producción de NO, pero también la del peroxinitrito. Este anión es solamente tóxico para las células que lo producen porque no difunde a través de la membrana celular [87].

Además de los efectos directos del peroxinitrito, éste puede descomponerse formando un radical hidroxilo (Figura 5), el cual es también un agente oxidante [39]. El anión peroxinitrito es estable en condiciones básicas, pero al ser protonado en condiciones fisiológicas (pKa=6.6 a 0°C [39]) se descompone por dos posibles mecanismos: 70-80% se reordena formando nitratos pero ninguna especie reactiva; mientras que el resto sufre ruptura

homolítica del enlace peróxido dando lugar a NO_2 y un radical hidroxilo [39, 78]. Estos mecanismos se ilustran en la siguiente figura.

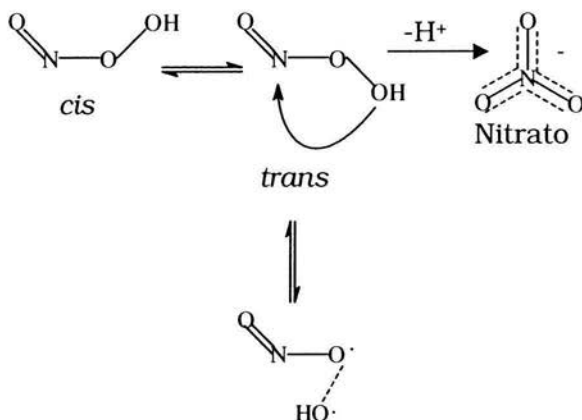


Figura 5. Mecanismos de descomposición del peroxinitrito. Reproducido de la referencia [56].

La presentación de efectos tóxicos depende también de cuál sea la ERON formada. Mientras que el peroxinitrito es neurotóxico el catión nitrosonio presenta un efecto protector, probablemente por la nitrosación que inactiva al receptor glutamatérgico para NMDA [42, 64]. En cambio, el dióxido de nitrógeno es un fuerte oxidante ($E^\circ=0.9 \text{ V}$ [39]) capaz de iniciar la peroxidación de ácidos grasos y la nitrosación de aminoácidos aromáticos [39].

En general, el efecto de las ERON's es la oxidación de sustratos celulares y la nitración protéica en residuos de tirosina [73, 91]. La nitrotirosina se forma naturalmente pero su concentración aumenta considerablemente en condiciones patológicas [82]. Solo algunas proteínas son susceptibles de ser nitradas y de ellas, no cualquier residuo de tirosina nitrado inactivará su función [82], por lo que este efecto tóxico es limitado.

Además, los efectos tóxicos del NO dependen también de la etapa de desarrollo en que se encuentren las células; las concentraciones elevadas de NO que causan muerte celular a neuronas maduras, detienen el crecimiento de

las inmaduras y favorecen su diferenciación [58].

A consecuencia del estrés oxidante las células pueden responder con la síntesis de moléculas como glutatión que puede captar al peroxinitrito [82] y a otras ERON's [48], y enzimas como la DSO, la cual puede disminuir la formación del peroxinitrito [52, 55]. La DSO reduce el daño neuronal en modelos animales de isquemia cerebral [52]. Paradójicamente, la presencia de la DSO dependiente de Cu y Zn favorece la nitración de otras proteínas causada por el anión peroxinitrito [56, 82, 89], por que la nitración de tirosina requiere de la presencia de átomos metálicos como los de la DSO [48, 56].

1.3.6.1. *El Óxido Nítrico y Algunas Patologías del Sistema Nervioso Central*

Además de sus efectos fisiológicos, el NO se asocia directa o indirectamente con diversas patologías. Entre éstas se pueden mencionar: depresión [84], isquemia cerebral [40, 43, 52, 58, 59, 93]; las enfermedades de Huntington [42, 52, 63], Alzheimer [32, 52, 89] y Parkinson [63, 64, 89]; esclerosis lateral amiotrófica [52, 56, 63, 89], encefalopatía hepática [32], migraña y epilepsia [43], encefalitis autoinmune y viral [44], y esclerosis múltiple [64, 89], entre otras.

Las patologías en las que está involucrado el NO no solo son enfermedades infecciosas o degenerativas y forman un conjunto muy diverso debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos en los que el NO participa y la variedad de células que lo producen y/o son sensibles a sus efectos.

1.4. Análisis Cuantitativo Aplicado al Estudio de la Esquizofrenia

1.4.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Cromatografía es una palabra de origen griego que significa “escribir o dibujar con colores”, y se debe a que en sus inicios esta técnica se utilizaba para separar pigmentos vegetales, obteniendo bandas de diferentes colores.

La cromatografía en columna se utiliza ampliamente como método de purificación desde su invención a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett.

En general, las técnicas cromatográficas consisten en hacer que se desplace un compuesto o una mezcla de compuestos a través de una fase estacionaria, arrastrados por una fase móvil que debe ser inmisible con la anterior. Las fases se eligen de tal manera que la afinidad de los componentes a separar por ambas fases sea diferencial, lo que resulta en que cada compuesto será retenido por la fase estacionaria con diferente fuerza, por lo que algunos irán retrasándose, permitiendo la separación. En otras palabras, la separación está dada por la diferencia en las constantes de equilibrio por las cuales cada analito se distribuye entre las fases móvil y estacionaria.

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse en dos grupos generales de acuerdo a la polaridad de las fases: cromatografía de fase normal, cuando se utiliza una fase móvil no polar y una fase estacionaria polar; y cromatografía de fase reversa, cuando la fase móvil es polar y la estacionaria es no polar.

Esta técnica permite identificar con relativa certeza la presencia de un compuesto en una mezcla a partir de su tiempo de retención (t_R), aunque este parámetro es sensible a variaciones ligeras en las condiciones cromatográficas, por lo que no es un elemento concluyente para asegurar o descartar la presencia de un analito.

La separación cromatográfica es gradual, por lo que irá sucediendo en función del tiempo en el que cada analito esté en contacto con ambas fases. Esto significa que la separación entre dos componentes es directamente proporcional a la longitud de la columna (L), e inversamente proporcional a la velocidad del flujo de la fase móvil.

Un parámetro que se utiliza para describir la migración de un analito en la columna cromatográfica es el factor de retención o factor de capacidad (k'), que representa el cociente entre el tiempo que tarda un compuesto en atravesar la columna ($t_R - t_M$), y el tiempo que pasa desde la inyección de una muestra hasta que un componente no retenido alcanza el detector (t_M).

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Preferentemente, el valor de k' debe encontrarse entre 2 y 10, lo que implica que el analito no está siendo retenido muy débilmente ni muy fuertemente. Cuando no se cuente con un compuesto que no sea retenido por la columna, se puede estimar el valor de t_M como $Ld_c^2/2F$, donde d_c es el diámetro interno de la columna (cm), y F es la velocidad del flujo de la fase móvil (mL/min).

El factor de capacidad es un parámetro que se refiere al comportamiento de un solo analito. El factor de selectividad (α) permite evaluar la separación de un par de componentes; este parámetro es el cociente que resulta de dividir el factor de retención de la especie más fuertemente retenida (k'_A) entre el factor de retención de la especie más débilmente retenida (k'_B),

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{t_{RA} - t_M}{t_{RB} - t_M}$$

donde t_{RA} y t_{RB} son los tiempos de retención de las especies más y menos fuertemente retenidas, respectivamente.

Los picos que se observan en un cromatograma tienen forma gaussiana debido a que hay factores aleatorios que modifican la migración de las moléculas a través de la columna. El ancho de la base de los picos (W) es inversamente proporcional a la eficacia de la columna. Dos parámetros que describen esa eficacia son el número de platos teóricos (N), y la altura de cada plato (H). Como el ancho de la base de una curva gaussiana se relaciona con la varianza (σ^2) y la desviación estándar (σ) de una medida, y considerando que prácticamente el total (96%) del área de una curva gaussiana se encuentra en un intervalo de $\pm 2\sigma$, pueden determinarse tanto H como N a partir de un cromatograma experimental de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$H = LW^2 / 16t_R^2 \quad N = 16(t_R/W)^2$$

La comparación de las áreas de cada pico en una muestra con la que corresponde a estándares de concentración conocida, permite realizar un análisis cuantitativo de la composición de una mezcla. Para este fin, la cromatografía es una técnica muy útil, ya que combina la separación y la cuantificación de cada analito en un proceso continuo.

El ensanchamiento de una banda cromatográfica (que corresponde a una menor eficacia de la columna utilizada) se debe en parte a que no todas las moléculas de un analito siguen exactamente el mismo camino entre las partículas de la fase estacionaria, por lo que algunas de ellas salen de la columna antes que otras. Este fenómeno de caminos múltiples es directamente proporcional al tamaño de las partículas de la fase estacionaria e inversamente proporcional a la velocidad del flujo de la fase móvil.

La difusión longitudinal también contribuye al ensanchamiento de las bandas. Las moléculas de un analito pueden alejarse de la zona central de una

banda difundiendo en la dirección del flujo o en la dirección contraria. Este fenómeno es directamente proporcional al coeficiente de difusión del analito en la fase móvil e inversamente proporcional a la velocidad del flujo de la misma.

Independientemente del ensanchamiento de las bandas, es importante que éstas se separen completamente unas de otras. El parámetro que evalúa esta separación es la resolución (R_s), que se calcula a partir de un cromatograma experimental con la ecuación siguiente:

$$R_s = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{W_A + W_B}$$

Este valor debe ser cuando menos de 1.5 para tener una separación completa, pero se recomienda que sea mayor a 2.

Cada molécula presente en la fase móvil debe primero difundir hacia la interfase para poder estar en equilibrio con la fase estacionaria. Este fenómeno también genera ensanchamiento de las bandas cromatográficas, y es inversamente proporcional a la velocidad del flujo y directamente proporcional al diámetro de las partículas de la fase estacionaria.

Las técnicas de cromatografía en las que la fase móvil es un líquido pueden ser de cuatro tipos: reparto, adsorción o líquido-sólido, intercambio iónico, y exclusión por tamaño. El primero de ellos puede llevarse a cabo utilizando como fase estacionaria un líquido adsorbido en un soporte sólido, o un líquido unido químicamente a un soporte sólido. Estos últimos son generalmente derivados de sílice recubiertos con cadenas de n-octilo (C_8) o n-octadecilo (C_{18}).

El uso de partículas cada vez más pequeñas en la fase estacionaria ha llevado al desarrollo de la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión o de Alta

Resolución (CLAR o HPLC por su nombre en inglés), que utiliza partículas de 3-10 μm de diámetro. Esta técnica requiere hasta 40 MPa (aproximadamente 400 atm) de presión para hacer pasar la fase móvil a través de una fase estacionaria tan fina en un tiempo aceptable, por lo que se requiere de un equipo de bombeo especializado. Es recomendable que la presión no se eleve más allá de 15 MPa (aproximadamente 150 atm) para prolongar la vida útil de todo el equipo de cromatografía.

En CLAR se utilizan comúnmente derivados de sílica como fase estacionaria; estos pueden tener grupos funcionales enlazados que favorezcan la separación de ciertos analitos. Estas fases estacionarias pueden utilizarse en un amplio intervalo de pH que no sea inferior a 2, para evitar la hidrólisis de los grupos enlazados, ni mayor de 8, porque se disolvería la fase estacionaria.

Diferentes parámetros afectan la separación de los componentes de una mezcla mediante CLAR, especialmente cuando se trata de mezclas complejas. Entre ellos sobresalen: el pH, la concentración de sales en la fase móvil y la concentración del componente orgánico en la fase móvil.

Algunos sistemas comerciales de bombeo permiten modificar la composición de la fase móvil durante un tiempo determinado, de modo que la cromatografía se lleve a cabo con un gradiente de concentraciones. Esto tiene como principal ventaja la reducción en el tiempo que se requiere para eluir a los analitos. Por ejemplo, si queremos separar una mezcla que contenga a los componentes A y B, y sabemos que el componente A se eluye rápidamente cuando la fase móvil contiene 80 % de un amortiguador de pH y 20 % de un disolvente orgánico, pero que el componente B requiere de un tiempo mucho mayor que A para atravesar la columna en esas condiciones, podemos programar el equipo para que comience bombeando esta mezcla de disolventes (80%/20%) hasta que se eluya el componente A, y que posteriormente aumente en forma gradual el porcentaje del componente orgánico de la fase móvil para eluir al componente B en un tiempo menor.

Los disolventes que se utilizan en esta técnica deben ser muy puros, para evitar que algún contaminante que se adsorba fuertemente a la columna afecte su eficacia. También deben estar libres de partículas suspendidas y burbujas de aire, ya que las primeras pueden tapan la columna, y las otras interfieren con el detector.

Las variaciones con las que se inyecta un volumen de muestra en la columna pueden reducir significativamente la reproducibilidad de una separación por CLAR. Para esto, los sistemas de CLAR se encuentran equipados con un asa o bucle (loop) cuya capacidad (5-500 μL) limita la cantidad de muestra que se inyecta de modo que ésta sea constante siempre que se llene el bucle.

La longitud de las columnas que se utilizan en CLAR generalmente se encuentra entre 10 y 30 cm, con 4-10 mm de diámetro interno y 3-10 μm de diámetro de partícula. Recientemente se han fabricado columnas de entre 1 y 5 mm de diámetro interior y 1-7.5 cm de longitud, que permiten lograr separaciones más rápidas y eficientes.

En algunos casos es conveniente hacer reaccionar a los analitos de interés, de modo que se formen derivados que se separen o se detecten más fácilmente. Una de las reacciones más comunes para este fin es la derivatización con o-ftalaldehído para aminas primarias (entre ellas la mayoría de los aminoácidos) que forma isoindoles sustituidos [96] muy fluorescentes, permitiendo la detección de unos pocos picomoles del analito. Una de las principales ventajas de esta técnica es que el OPA no es por sí mismo fluorescente, de modo que el exceso del reactivo no influirá en las mediciones [15].

1.4.2. Fluorimetría

En general, las técnicas espectrofotométricas permiten cuantificar compuestos debido a que la absorción de luz (A) es directamente proporcional a

la concentración (c) del analito y a la longitud de paso óptico (b), de acuerdo con la Ley de Beer: $A = \epsilon bc$, la cual es válida solo cuando se utilizan radiaciones monocromáticas.

La constante (ϵ) que relaciona estas variables es el coeficiente de absorptividad, y es distinto para cada compuesto a una longitud de onda determinada.

La Ley de Beer se cumple para compuestos puros, pero puede verse afectada por la presencia de alguno de los componentes de una mezcla. Por ejemplo, las trazas de etanol o de yoduros disminuyen notablemente la intensidad de fluorescencia de una solución de sulfato de uranilo [97]. Este efecto es mínimo cuando se utilizan soluciones diluidas, ya que la baja concentración de los analitos puede no ser suficiente para causar interferencias.

Los fenómenos de Fluorescencia se conocen desde 1852, cuando Stokes observó la emisión de luz de cierto color, causada por la irradiación con luz de un color distinto. Tanto la luz UV como los rayos X y los haces de electrones pueden causar fluorescencia.

A diferencia de la mayoría de las técnicas espectrofotométricas, que miden la absorción de luz, la fluorimetría se basa en la intensidad de luz emitida por un compuesto al ser irradiado con ultravioleta. Para conseguir esto, la fuente de irradiación debe estar colocada perpendicularmente al detector de emisión de luz.

La detección por fluorescencia tiene la ventaja de ser altamente sensible, ya que puede detectar entre 1 y 10 pg de un analito. Su sensibilidad es aproximadamente un orden de magnitud mayor que la de algunas técnicas de absorbancia.

Una de las características que hace a las técnicas fluorimétricas tan sensibles, es que la intensidad de la luz emitida es directamente proporcional a la de la luz con que se irradia la muestra, de modo que puede intensificarse la

fluorescencia simplemente aumentando la intensidad de la lámpara que irradia las muestras.

Las técnicas fluorimétricas también requieren, en primer lugar, que la energía con la que se irradia una molécula sea absorbida por ella, para ser liberada posteriormente en forma de luz de una longitud de onda menor a la inicial. En estas técnicas se cumple una relación proporcional entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de los analitos, similar a la Ley de Beer.

La absorción de un fotón por parte de una molécula (Figura 6) causa transiciones electrónicas en las cuales, de algún par de electrones, un electrón se desplaza del estado electrónico basal a otro de mayor energía. Los electrones del par resultante (un electrón en el nivel basal y otro en el nivel excitado) pueden tener aún espines opuestos, o espines iguales, lo que da lugar a un estado de singlete (S) en el primer caso, o a un triplete (T) en el segundo caso.

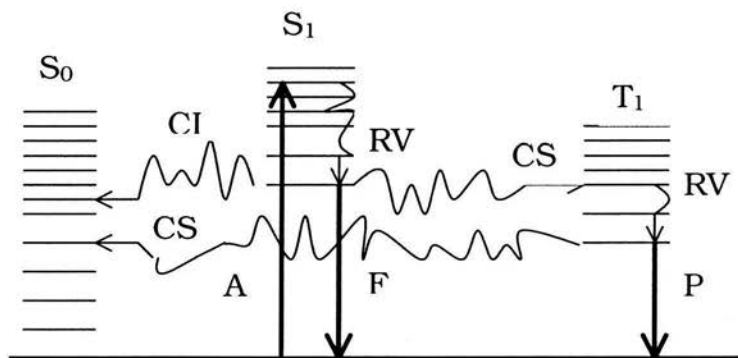


Figura 6. Transiciones electrónicas durante los procesos de absorción y emisión de luz. Las barras horizontales indican niveles rotacionales y vibracionales, cuya energía equivale a la altura a la que se encuentran respecto de la línea base. Los diferentes estados electrónicos se muestran como S₀, S₁ y T₁. Las flechas onduladas indican transiciones no radiantes. Las flechas rectas indican absorción (flecha ascendente) o emisión (flechas descendentes) de luz por fluorescencia (F) o fosforescencia (P). CI, conversión interna; CS, cruce entre sistemas; RV, relajación vibracional. Reproducido de [95], p. 515.

Cuando los electrones pasan del estado electrónico basal (S_0) a otro excitado (S_1), la energía absorbida puede perderse en forma de calor por las colisiones que sufre la molécula con otras del mismo compuesto o del disolvente. Los electrones también pueden pasar del nivel vibracional de menor energía en S_1 al de mayor energía en S_0 (proceso que se conoce como conversión interna), desde el cual pueden también perder energía mediante colisiones hasta regresar al nivel vibracional más bajo de S_0 .

Los electrones también pueden pasar de S_1 a otro estado vibracional excitado en T_1 (cruce entre sistemas), perder un poco de energía en forma de calor y desplazarse hacia S_0 , desde el cual puede seguir liberando energía debido a las colisiones intermoleculares.

Hasta aquí, todos los movimientos electrónicos descritos, excepto la absorción de energía inicial y la pérdida en forma de calor, suceden entre niveles vibracionales de igual energía entre estados de diferente energía (S_0 , S_1 y T_1)

Si desde S_1 o T_1 , luego de haber perdido cierta energía en algunas colisiones (que son inevitables), los electrones liberan toda la energía que aún contienen (en forma de un fotón) en una sola transición electrónica que los lleve hasta un nivel vibracional de menor energía en S_0 , la molécula emite luz por fluorescencia (transición de S_1 a S_0) o fosforescencia (de T_1 a S_0).

Ambos procesos de emisión de luz son poco comunes ya que en la mayoría de los casos la radiación absorbida se libera en forma de calor.

Aún durante las transiciones que dan lugar a la fluorescencia y la fosforescencia, una parte de la energía absorbida se perderá durante las colisiones que sufran las moléculas con otras, principalmente las del disolvente, por lo que la energía emitida es menor que la energía absorbida y, por lo tanto, de una longitud de onda mayor.

2. Desarrollo Experimental

Existen algunas técnicas para evaluar la biosíntesis del NO, como la medición de nitratos y nitritos [30, 41, 50], o de GMPc [40, 41], pero aunque se trata de técnicas muy útiles, ésta última tiene la desventaja de ser inespecífica, mientras que la primera puede ser influenciada por algunos factores como la ingestión de nitratos y nitritos en la dieta, la presentación de procesos infecciosos o inflamatorios previos a la toma de las muestras, así como el consumo de algunos fármacos (p. ej. antiinflamatorios o vasodilatadores), principalmente. Además debe considerarse que ni el GMPc ni los nitritos y nitratos son producidos directamente por la actividad de la NOS, a diferencia de citrulina, que es producida por la enzima en cantidades equimolares al NO [45, 50].

Otra técnica muy útil para evaluar la biosíntesis del NO consiste en medir la conversión de [³H]arginina en [³H]citrulina [45, 68], pero esto requiere de una muestra, ya sea cruda o purificada, en la que esté presente la enzima, lo cuál no parece ser el caso para el LCR [21].

Por estas razones, proponemos en este trabajo la cuantificación de arginina y citrulina (el sustrato y el producto de la SON, respectivamente) para evaluar la biosíntesis del NO en pacientes con esquizofrenia.

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo General

Determinar la concentración de arginina y citrulina en el líquido cefalorraquídeo mediante cromatografía de líquidos para detectar alteraciones en la biosíntesis de óxido nítrico en pacientes con esquizofrenia.

2.1.2. Objetivos Particulares

Cuantificar arginina y citrulina mediante cromatografía en el líquido cefalorraquídeo de pacientes esquizofrénicos para estimar la actividad de la sintasa del óxido nítrico.

Evaluar estadísticamente si existe correlación entre la concentración de ambos aminoácidos y la escala de síntomas positivos y negativos para esquizofrenia, para detectar si existe relación entre los marcadores bioquímicos y la sintomatología de los pacientes.

2.2. Hipótesis

Los bajos niveles de nitritos y nitratos en el LCR de individuos esquizofrénicos se deben a una menor biosíntesis del NO en estos pacientes.

2.3. Criterios para la Elección de Pacientes

2.3.1. Consideraciones Éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de

Neurología y Neurocirugía. La punción lumbar no se realizó en ningún caso para los propósitos de esta investigación sino para diagnóstico diferencial de los pacientes según el criterio del Neurólogo o Neuropsiquiatra a cargo. Se cuenta en todos los casos con un consentimiento escrito por parte de los pacientes o sus familiares para la punción lumbar, ninguno de los pacientes mostró complicaciones a causa de ese procedimiento.

2.3.2. Criterios de Inclusión

Para este estudio se consideraron solamente pacientes con síntomas psicóticos agudos, atendidos en los servicios de Emergencias u Hospitalización Psiquiátrica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, con diagnóstico de esquizofrenia (DSM-IV, American Psychiatric Association, 1994) según la entrevista clínica estructurada correspondiente y la revisión de sus registros médicos.

Para el grupo control, se incluyeron otros pacientes que, por indicación de un médico especialista, requirieron que se les realizara la punción lumbar.

2.3.3. Criterios de Exclusión

Luego de los exámenes realizados para el diagnóstico, se excluyeron los pacientes que presentaron condiciones neurológicas diferentes de esquizofrenia (excepto aquellos considerados como control), hipertensión arterial, desórdenes neurodegenerativos o inflamatorios, así como los pacientes que recibían tratamiento con analgésicos o antiinflamatorios esteroideos. No se incluyeron pacientes que presentaran alguna contraindicación para el procedimiento de punción lumbar.

2.4. Métodos

2.4.1. Pacientes

Siete pacientes fueron incluidos en el grupo de estudio, de los cuales dos fueron excluidos por diferentes causas [trastorno psicótico secundario a encefalitis viral (1), diagnóstico no definido al cierre del estudio (1)]. De los 26 pacientes considerados inicialmente como control, 20 cumplieron con algún criterio de exclusión: migraña o cefalea tensional (6), epilepsia (4), neuroinfecciones (6), hernia de disco lumbar (1), hidrocefalia normotensa (1), hipertensión arterial (2).

Cinco pacientes (4 esquizofrénicos paranoides, 1 esquizofrénico desorganizado; 29.50 ± 4.12 años) forman el grupo de estudio; dos de ellos no recibían tratamiento alguno al momento de la punción lumbar, el resto recibía haloperidol (2) o risperidona (1).

Seis pacientes [que padecen desórdenes oftalmológicos (3), neuropatías controladas (2), o probable neurocisticercosis (NCC) con reacción negativa (ELISA) para NCC en el LCR (1); 39.8 ± 2.94 años) forman el grupo control. El examen citoquímico de rutina para el LCR resultó normal en todos los casos. No participan individuos sanos en este estudio porque el procedimiento de punción lumbar no está indicado para ellos.

2.4.2. Reactivos

Tanto el metanol absoluto (Mallinckrodt Baker, México) como el tetrahidrofurano (THF) (Mallinckrodt Baker, Kentucky) utilizados son grado HPLC. El o-ftalaldehído (OPA), 2-mercaptoetanol (ME), y los estándares de L-

arginina y L-citrulina se obtuvieron de Sigma (St. Louis, M.O.). Los demás compuestos empleados son grado reactivo.

2.4.3. Disolventes y Soluciones

Todas las soluciones se prepararon en agua destilada desionizada obtenida con un equipo Milli-Q Water System (Millipore, Bedford, MA). Con la sensibilidad empleada para analizar las muestras no se observó ninguna señal en el agua desionizada. El disolvente A es metanol absoluto grado HPLC. El disolvente B se prepara añadiendo THF a un amortiguador de acetatos (50 mM, pH 5.9) hasta una concentración final de 1.5 % (v/v); esta solución se filtra a través de una membrana de 0.45 μm y se desgasifica por sonicación (5 min) antes de ser utilizada.

El reactivo de OPA-ME se preparó de acuerdo con Turnell y Cooper [98], con pequeñas modificaciones: 25 mg de OPA se disolvieron en 625 μL de metanol absoluto, se mezclaron con 5.6 mL de un amortiguador de boratos (0.3 M, pH 9.5), y finalmente se agregaron 25 μL de ME. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante todo el análisis.

2.4.4. Muestras

Las muestras obtenidas por punción lumbar se mantuvieron a -80°C . Para el análisis, se colocaron primero en hielo, y después en agua con hielo, hasta descongelarse por completo, luego de lo cual fueron filtradas a través de una membrana de 0.45 μm . Alícuotas de 20 μL de LCR se diluyeron con 80 μL de agua desionizada y se mezclaron con 100 μL del reactivo de OPA-ME, se dejaron reaccionar por 1 min en un vórtex, y se inyectaron a la columna. El análisis de las muestras fue ciego al diagnóstico de los pacientes.

2.4.5. Equipo

La separación de los derivados se llevó a cabo con una bomba binaria Serie 200 LC (Perkin Elmer), las señales se obtuvieron con un detector de fluorescencia (Modelo 157, Beckman), y fueron analizadas con un integrador HP 3396 serie II (Hewlett Packard). Las inyecciones se realizaron con un loop de 20 μ L. Los derivados se separaron en una columna Adsorbosphere OPA HS (C₁₈, 5 μ m, 100 x 4.6 mm, Alltech).

2.4.6. Condiciones Cromatográficas

El método empleado está basado en el que desarrollaron Jarrett y cols. [99], pero tiene algunas modificaciones. El programa utilizado consiste en un gradiente lineal de 10 % a 30 % A en 12 min, un paso de lavado con 99 % A durante 5 min, y 5 min con 10 % A para reequilibrar la columna. El tiempo mínimo que debe transcurrir entre dos inyecciones es de 22 min.

2.4.7. Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con ayuda del programa SPSS versión 11. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba de *t* de Student. Se realizaron pruebas de correlación de Pearson con las concentraciones de aminoácidos y la escala de síntomas positivos y negativos (PANSS) para esquizofrenia.

3. Resultados y Discusión

3.1. Método

La identificación de los picos en los cromatogramas se consiguió mediante la comparación de los tiempos de retención entre las muestras y soluciones estándar obtenidos bajo las mismas condiciones, del mismo modo en que lo han hecho otros autores [26, 71, 73]; se confirmó mediante pruebas de co-elución entre una solución estándar de cada aminoácido y una alícuota de LCR (diluida 1:5).

Las figuras 7 y 8 muestran los cromatogramas obtenidos con una solución estándar de aminoácidos (aspartato, glutamato, glutamina, glicina, citrulina, arginina y taurina; 10 μM cada uno), y una muestra de LCR (diluida 1:5) obtenida de un paciente con hidrocefalia normotensa, respectivamente [100]. Se observa en ellos cómo cada aminoácido presenta el mismo comportamiento tanto en la solución estándar como en la muestra de LCR; por esto podemos decir que los demás componentes de este fluido no interfieren en la separación cromatográfica. Los tiempos de retención para los aminoácidos evaluados son los mismos tanto para la solución estándar, como para el LCR [100].

El método utilizado permite la cuantificación de arginina y citrulina desde 0.9 μM y 0.7 μM , respectivamente. La respuesta obtenida es lineal hasta 500 μM (para citrulina) o 1000 μM (para arginina). Los tiempos de retención bajo las condiciones empleadas son 10.191 ± 0.029 min para citrulina, y 11.900 ± 0.041 min para arginina. Las determinaciones realizadas son repetibles y reproducibles, con una variación menor al 5 % tanto para la concentración como para el tiempo de retención de estos dos aminoácidos. Los detalles sobre la validación de este método pueden consultarse en la literatura [100]. Todos los picos se separan completamente. Se obtuvieron aproximadamente 3×10^4 platos teóricos de 3×10^{-3} mm de altura cada uno.

Tabla 8. Algunos parámetros de la separación cromatográfica de arginina y citrulina, calculados a partir de los cromatogramas experimentales de una solución estándar de aminoácidos (10 μ M cada uno). Arg, arginina; Cit, citrulina; Gly, glicina; Tau, taurina. N. A., no aplica.

Aminoácido	Factor de capacidad	Factor de selectividad	Resolución (min/mm)
Arginina	15.87	N. A.	N. A.
Citrulina	13.45	N. A.	N. A.
Gly-Cit	N. A.	1.09	3.23
Cit-Arg	N. A.	1.17	6.78
Arg-Tau	N. A.	1.11	4.86

3.2. Concentración de Aminoácidos

Como citrulina no atraviesa significativamente la BHE (sección 1.2.4.1), la concentración de este aminoácido en el LCR refleja su metabolismo dentro del SNC, casi sin interferencia de otros tejidos. Algunos autores consideran que la NOS es la única enzima que sintetiza citrulina en el cerebro (sección 1.3.4); sin embargo, dimetilarginina dimetilaminohidrolasa también se expresa en el SNC y produce citrulina a partir de metilargininas (sección 1.3.4); la concentración de estos derivados de arginina en el LCR es normalmente menor a 50 nM (Tabla 5), de modo que la contribución de esta enzima a la concentración total de citrulina en el LCR podría ser mínima considerando la concentración promedio de citrulina en el LCR (Tabla 5), por lo que la NOS es, quizás no la única, pero sí la principal enzima que sintetiza citrulina en el SNC. De hecho, algunos estudios inmunohistoquímicos usando anticuerpos anti-citrulina, han detectado a este aminoácido solamente en las células que expresan la NOS [79].

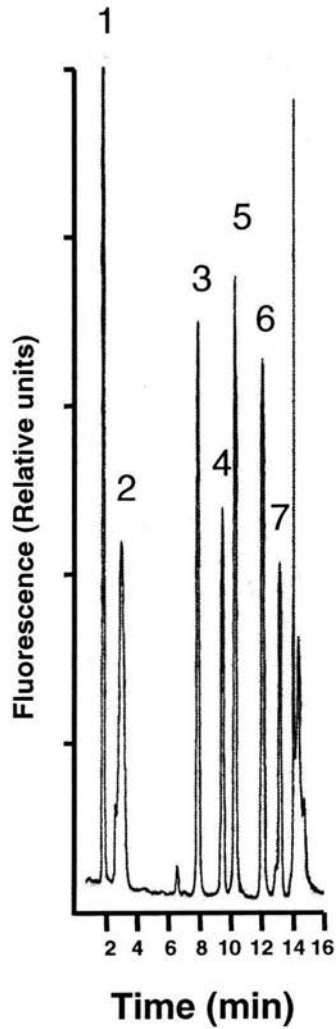


Figura 7. Cromatograma de una solución estándar de aminoácidos (10 μM cada uno). Los picos numerados corresponden a: aspartato (1), glutamato (2), glutamina (3), glicina (4), citrulina (5), arginina (6), y taurina (7). El último pico que se observa se debe al reactivo de OPA-ME. Reproducido de la referencia [100].

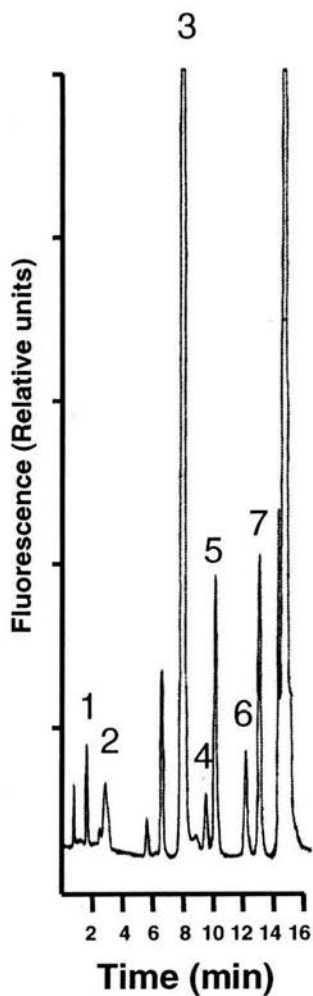


Figura 8. Cromatograma de una muestra de LCR (diluida 1:5) obtenida de un paciente con hidrocefalia normotensa. Los picos numerados corresponden a: aspartato (1), glutamato (2), glutamina (3), glycina (4), citrulina (5), arginina (6), y taurina (7). El último pico que se observa se debe al reactivo de OPA-ME. Los demás picos son componentes no identificados. Reproducido de la referencia [100].

De acuerdo con lo anterior, el aumento en la actividad de la NOS que se espera como respuesta a un proceso infeccioso y/o inflamatorio en el SNC, se refleja en un aumento significativo en la concentración de citrulina en el LCR humano que no se debe a cambios en la permeabilidad de la BHE [100]. De igual forma, un aumento significativo en la concentración de arginina y citrulina se observa en el LCR de pacientes con trastornos neurodegenerativos, como Esclerosis Lateral Amiotrófica y la Enfermedad de Huntington (I. Pérez-Neri, M. C. Boll, S. Montes, C. Ríos, resultados no publicados), que se asocian con la sobreproducción de NO y la formación de peroxinitrito. Esos resultados se resumen en la Tabla 9.

Todo lo anterior indica que este método permite detectar alteraciones en la biosíntesis del NO dentro del SNC en humanos vivos. Esto nos permite evaluar el resultado de los procesos que regulan la actividad de la NOS *in vivo*, y que no se reproducen en un ensayo de actividad enzimática *in vitro* (como el transporte de arginina a través de la membrana neuronal, o la disponibilidad de los cofactores de la enzima).

Con estos antecedentes, cuantificamos arginina y citrulina en las muestras de LCR. Los resultados que se presentan a continuación son preliminares. El tamaño de las muestras limita el análisis de los mismos, por lo que no se discutirá la posible influencia de algunos factores como la edad, el género, etc.

La concentración de arginina en el grupo de estudio es 26% mayor a la del grupo control ($p < 0.05$; Tabla 10). Este resultado podría deberse a una disminución en la actividad de la NOS que causara la acumulación de su sustrato. Un estudio *post mortem* previo reporta una disminución de aproximadamente 30 % en la actividad *in vitro* de las isoformas constitutivas de la NOS, en tejido cerebral de la corteza prefrontal de personas que padecieron esquizofrenia [101]. Si esto sucede también *in vivo*, el incremento en la concentración extracelular de arginina podría ser también un mecanismo de compensación (causado quizás por un aumento en el transporte de este aminoácido a través de la BHE), ya que favorece la actividad de la enzima

(sección 1.3.5). El mecanismo por el cual arginina regula la expresión de la NOS a nivel traduccional ha sido reportado recientemente para la isoforma tipo II [102], aunque está aún por definirse si sucede algo similar para las otras isoenzimas.

El método utilizado por Xing y cols. [101] emplea homogenados crudos para evaluar la conversión de [³H]arginina a [³H]citrulina. La concentración de esta última dependerá, en un caso como este, de que el sustrato marcado compita con el sustrato no marcado (endógeno) presente en las muestras; es decir, cuando no se purifica la enzima para ensayar su actividad, el estudio que resulta es en realidad un ensayo de competencia entre los sustratos. Aunque la concentración de [³H]arginina se mantenga constante, un aumento en la concentración endógena de arginina puede resultar en una menor captación de arginina marcada por parte de la enzima, y una menor concentración de [³H]citrulina, que puede confundirse con una menor actividad de la enzima. Nosotros hemos detectado un aumento en la concentración de arginina en el LCR de magnitud similar a la disminución reportada en la actividad de la NOS.

De cualquier modo, debe considerarse que el incremento en la concentración extracelular de arginina podría no estimular la actividad de la NOS si hubiera alteraciones en los mecanismos de transporte que permiten la captación de este aminoácido por las células (sección 1.3.4), lo cual, aunque no está siendo evaluado directamente en nuestro trabajo, parece no estar sucediendo. La concentración de citrulina es 25% mayor en los pacientes esquizofrénicos ($p < 0.05$; Tabla 10). En conjunto, nuestros resultados sugieren un aumento en la actividad de la NOS en los esquizofrénicos, aún cuando no podemos descartar las otras hipótesis que se comentan más adelante.

Los cambios observados en las concentraciones de ambos aminoácidos en el grupo de estudio no se deben a un aumento en la permeabilidad de la BHE. Si ese fuera el caso la concentración de taurina, otro aminoácido que está presente en la sangre (Tabla 5), también se habría elevado en el LCR, y sin

embargo no es significativamente distinta entre los grupos (media \pm E.E.: Control $63.88 \pm 6.18 \mu\text{M}$, Esquizofrenia $59.44 \pm 14.04 \mu\text{M}$; $p = 0.779$).

No se encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones de arginina y citrulina con la PANSS (Tabla 9), pero por tratarse de un resultado preliminar no podemos descartar la posibilidad de que esas correlaciones existan.

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de arginina y citrulina en el LCR y la puntuación de la PANSS en los pacientes con esquizofrenia.

Escala	Arginina		Citrulina	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Síntomas Positivos	0.578	0.306	0.558	0.328
Síntomas Negativos	-0.201	0.746	0.209	0.735
PANSS Total	0.439	0.459	0.427	0.473

3.3 Otras Enzimas Metabolizadoras de Citrulina

Un aumento en la actividad de dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (sección 1.3.4) también podría resultar en la acumulación de citrulina, pero como al menos uno de los sustratos de esta enzima (dimetilarginina asimétrica) se encuentra normalmente en concentraciones menores a 50 nM en el LCR humano (Tabla 5), la actividad de esta enzima no explica el aumento de $6 \mu\text{M}$ que observamos en la concentración de citrulina, aún cuando la concentración de dimetilarginina asimétrica se encuentre elevada en el plasma de pacientes esquizofrénicos [35].

La acumulación de citrulina puede resultar también por la disminución en la actividad de la sintetasa de argininosuccinato, ya que esta enzima consume citrulina (sección 1.3.4). Este efecto provocaría también una menor biosíntesis de arginina, con la subsecuente disminución en la concentración extracelular de este aminoácido, la cual podría ser compensada con un

aumento en el transporte de arginina a través de la BHE (sección 1.3.4). Esta enzima está regulada por la disponibilidad de aspartato (sección 1.3.4), cuya concentración se ha reportado disminuida en la corteza frontal de los esquizofrénicos (sección 1.1.3). Esta es una hipótesis probable, pero no explica las alteraciones en la biosíntesis del NO reportadas previamente.

3.4. Posible Participación del Estrés Oxidante

La hipótesis que, al parecer, mejor explica los resultados obtenidos por algunos grupos de investigación, incluyendo el nuestro, es un aumento en la actividad de la NOS que posiblemente causa efectos neurotóxicos. Esta hipótesis junto con los elementos que la apoyan, se comenta en los siguientes párrafos y se esquematiza en la Figura 9.

Probablemente por la combinación de varios factores, entre ellos el aumento en la concentración extracelular de arginina, la NOS presenta un aumento de su actividad en los esquizofrénicos, lo que da lugar a un aumento en las concentraciones de citrulina y NO. Este último puede reaccionar con el anión superóxido que se produce normalmente en las células (p. ej., por el metabolismo respiratorio o por autooxidación de tetrahidrobiopterina) formando peroxinitrito (sección 1.3.6). Este anión altamente tóxico altera la fisiología celular por mecanismos como peroxidación lipídica y nitración de proteínas en residuos de tirosina (sección 1.3.6). Una de las proteínas susceptibles a la nitración mediada por peroxinitrito es la DSO (sección 1.3.6), que al ser inhibida por este mecanismo, deja libre al anión superóxido, favoreciendo la formación de peroxinitrito.

Srivastava y cols. [103] han encontrado una disminución en el contenido de nitritos en células polimorfonucleares (que expresan la NOS tipo III; sección 1.3.3), junto con un aumento en algunos marcadores de estrés oxidante en pacientes esquizofrénicos. Akyol y cols. [104] han propuesto alteraciones en el balance oxidante-antioxidante en los esquizofrénicos. Esto sugiere que los

mecanismos de estrés oxidante posiblemente participan en la patofisiología de esta enfermedad.

El aumento en la concentración del anión superóxido favorece la actividad de la NOS, es capaz de inhibir a enzimas como guanilato ciclasa (sección 1.3.5), y podría explicar tanto la disminución en la concentración de GMPc en el LCR [105], como la menor irrigación sanguínea en la corteza prefrontal de los esquizofrénicos (sección 1.1.3). Además, el peroxinitrito favorece la liberación de arginina por parte de los astrocitos (sección 1.3.6) y podría contribuir al aumento que hemos encontrado en la concentración extracelular de este aminoácido.

Tabla 10. Resultados de la cuantificación de arginina y citrulina en el LCR de pacientes esquizofrénicos. Un grupo de pacientes con procesos infecciosos y/o inflamatorios en el SNC [100], y otro grupo con un trastorno neurodegenerativo (Enfermedad de Huntington) se incluyen como referencia. E.E., error estándar. * $p < 0.05$.

Aminoácido	Concentración (μM) (Media \pm E.E.)			
	Control (n=6)	Inflamación (n=5)	Huntington (n=10)	Esquizofrenia (n=5)
Arginina	18.68 \pm 1.09	22.84 \pm 1.83	24.99 \pm 1.70 *	23.90 \pm 1.88 *
Citrulina	24.29 \pm 2.06	31.65 \pm 1.59 *	33.43 \pm 1.32 *	31.08 \pm 1.93 *

De acuerdo con algunos reportes, aproximadamente el 70% del peroxinitrito formado se isomeriza formando nitratos (sección 1.3.6); el porcentaje restante se descompone en otras especies reactivas, de modo que del total del NO producido por la NOS, una parte puede ser convertida en peroxinitrito, del que a su vez, una parte se descompone sin formar nitritos o nitratos. Este modelo coincide con una reducción en la concentración de estos aniones, como se ha reportado por algunos autores [13, 35, 103], y que podría ser causada no por una menor actividad de la NOS, sino por un aumento en la degradación del NO mediada por el anión superóxido.

Tabla 11. Concentraciones de aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo por paciente.

Grupo	Pacientes		Concentración (μM)		Tratamiento
		Diagnóstico	Arginina	Citrulina	
Control	1	Vitreítis	20.33	27.94	Ninguno
	2	Neuropatía secundaria a malabsorción intestinal	22.35	28.37	Ninguno
	3	Neuropatía periférica	14.56	29.16	Ninguno
	4	Degeneración de la retina	18.13	22.53	Ninguno
	5	Pseudotumor cerebri	17.29	21.4	Ninguno
	6	Posible neurocisticercosis con reacción negativa en el LCR	18.23	13.62	Ninguno
Esquizofrenia	1	Tipo Paranoide	28.8	33.1	Ninguno
	2	Tipo Paranoide	19.8	31.6	Haloperidol
	3	Tipo Paranoide	27.2	24.2	Haloperidol
	4	Tipo Paranoide	19.6	30.6	Ninguno
	5	Tipo Desorganizado	24.2	35.9	Risperidona

Debido a que el NO regula su propia biosíntesis por retroalimentación sobre la NOS (sección 1.3.5), la menor disponibilidad del NO, causada por su reacción con el anión superóxido, es otro factor que posiblemente favorece la actividad de la NOS en los pacientes esquizofrénicos.

De acuerdo con lo anterior, algunos reportes indican una disminución en las concentraciones de nitritos y nitratos en el LCR de pacientes con la enfermedad de Alzheimer [30], un trastorno neurodegenerativo asociado con la sobreproducción de NO y la formación de peroxinitrito (sección 1.3.6.1). Nosotros, aunque de manera preliminar, hemos observado un aumento en la concentración de citrulina en el LCR de un pequeño grupo de pacientes con esa misma enfermedad (I. Pérez-Neri, M. C. Boll, S. Montes, C. Ríos, resultados no publicados), lo que apoya la hipótesis de que el aumento en la actividad de la NOS puede reflejarse en el aumento de la concentración de citrulina, a pesar de la disminución de los nitritos y nitratos.

3.5. Participación del NO en la Patofisiología de la Esquizofrenia

Las alteraciones en la biosíntesis del NO en la esquizofrenia pueden tener implicaciones diversas, y no puede asegurarse aún el papel exacto de este gas en la enfermedad.

El NO participa en los procesos de proliferación, diferenciación, y detención del crecimiento celular durante el desarrollo del SNC (Tabla 6), por lo que las alteraciones en su biosíntesis pueden tener repercusiones en esos y otros procesos en dicho sistema (sección 1.3.2).

La estimulación de las neuronas catecolaminérgicas con NMDA provoca la liberación de sus neurotransmisores [46], y la adición de inhibidores de la NOS o agentes que capturan al NO bloquea la liberación de dopamina *ex vivo* [46]. Esto sugiere que el efecto reportado involucra la formación de NO y, de suceder también en el sistema límbico, representaría un posible mecanismo para la generación de conductas hiperdopaminérgicas en individuos cuya biosíntesis del NO fuera anormalmente elevada.

3.6. Estudios Clínicos

Los estudios previos que relacionan al NO con la esquizofrenia son poco consistentes. Das y cols. [35] encontraron una disminución en la concentración de nitratos en el plasma de pacientes esquizofrénicos, excepto en aquellos con tratamiento antipsicótico. También han reportado un aumento en la actividad (medida por la formación de citrulina) de la NOS constitutiva aislada de plaquetas de pacientes con esquizofrenia [106]. Zoroglu y cols. [107], al igual que Yanik y cols. [108], han encontrado un aumento en la concentración plasmática de nitritos en pacientes esquizofrénicos. Este último grupo de investigadores también encontró una disminución en la actividad sérica de arginasa (sección 1.3.4), que al menos en teoría, puede generar a un aumento

en la concentración plasmática de arginina, favoreciendo su transporte a través de la BHE y su acumulación en el SNC.

Algunos estudios de biología molecular han encontrado una asociación entre un polimorfismo en una región no traducible del gen de la NOS I y la presentación de esquizofrenia entre la población japonesa [109].

Otros estudios *post mortem* han encontrado un aumento de células inmunorreactivas para la NOS en el cerebelo [110, 111] y una disminución en el hipotálamo [112] de personas que padecieron esquizofrenia.

3.7. Modelos Experimentales

En modelos animales de esquizofrenia, está reportado que los efectos inducidos con un fármaco psicotomimético (fenciclidina), son menores tanto en los ratones knock out para la NOS [113], como en los ratones tratados con un fármaco formador de NO [114]; además, los efectos inducidos con fenciclidina son mayores en los ratones a los que se administra un inhibidor de la NOS [115]. Black y cols. [116] han reportado que la administración de un inhibidor competitivo de la NOS a ratas neonatas les provoca hipersensibilidad a amfetamina (a los machos) o a fenciclidina (a las hembras), que se observan solo hasta que son adultas.

Lo anterior sugiere, en unos casos, que el NO es necesario para la presentación de algunas conductas observables en la esquizofrenia, mientras que en otros, sugiere que el NO protege contra la presentación de las mismas.

3.8. Consideraciones Finales

Es probable que la actividad de la NOS se encuentre alterada en diferentes regiones cerebrales, en algunas aumentada y en otras disminuida, y que el NO presente efectos que favorecen o protegen contra la generación de

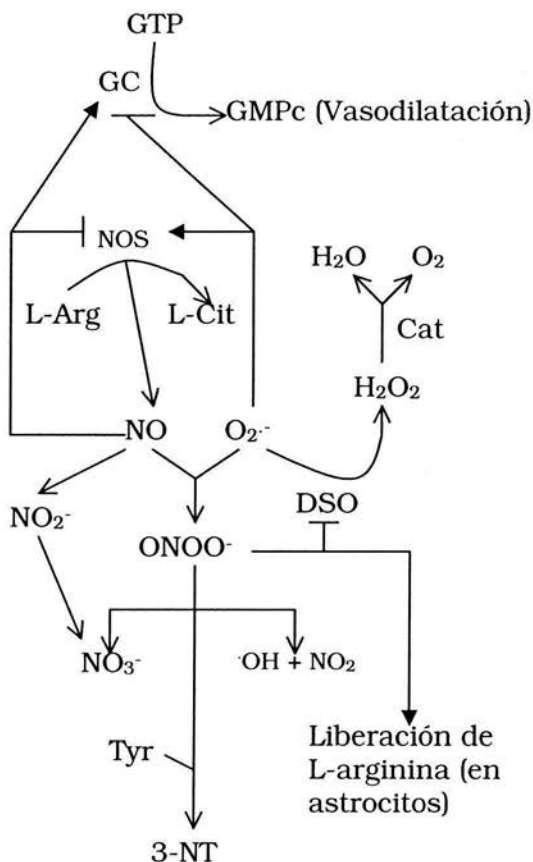


Figura 9. Principales mecanismos que podrían estar causando alteraciones en la biosíntesis del óxido nítrico en la esquizofrenia. Las líneas indican reacciones (\rightarrow), o la estimulación (\rightarrow) o bloqueo (\dashv) de algún proceso. Cat, catalasa; GC, guanilato ciclasa; GTP, trifosfato de guanosina; L-Arg, L-arginina; L-Cit, L-citrulina; 3-NT, 3-nitrotirosina; Tyr, tirosina.

algunos de los síntomas de la esquizofrenia dependiendo de la concentración que de él se produzca en cada zona del encéfalo, y de la etapa de maduración en que se encuentren las células cuando estén expuestas a estas alteraciones.

Las concentraciones de aminoácidos que hemos encontrado son resultado del metabolismo global del SNC, y no dan información sobre los procesos que suceden en regiones específicas del cerebro.

Este estudio coincide con otros reportes previos, al sugerir que hay alteraciones en la biosíntesis del NO en los esquizofrénicos, aunque difiere con algunos de ellos al indicar que es mayor la actividad de la NOS en estos pacientes. La controversia solo se resolverá con estudios posteriores que permitan definir con precisión cuales son las alteraciones en la biosíntesis del NO en la esquizofrenia, y cuál es su participación como causa o consecuencia de la misma.

4. Conclusiones

Las concentraciones de arginina y citrulina en el LCR son significativamente mayores (26 y 25 % respectivamente) en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes esquizofrénicos.

De forma preliminar, el aumento en la concentración de aminoácidos no correlaciona con la sintomatología de los pacientes, por lo que no puede asegurarse que exista relación entre los marcadores bioquímicos y el cuadro clínico de la enfermedad.

La actividad de la NOS *in vivo* probablemente es mayor en los pacientes esquizofrénicos.

El posible aumento en la actividad de la NOS podría estar causando efectos neurotóxicos mediados por el anión peroxinitrito en los esquizofrénicos.

No puede asegurarse aún cuál es el papel del NO en la esquizofrenia.

Referencias

1. Plomin, R., DeFries, J., McLearn, G., McGuffin, P. (2001). Behavioral Genetics. 4 ed. Worth Publishers: Nueva York.
2. Bailer, U., Leisch, F., Meszaros, K., Lenzinger, E., Willinger, U., Strobl, R., Heiden, A., Gebhardt, C., Döge, E., Fuchs, K., Sieghart, W., Kasper, S., Hornik, K., Aschauer, H. (2002). Genome Scan for Susceptibility Loci for Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Biol. Psychiatry*. 52: 40-52.
3. Bocchio, L., Boin, F., Zanardini, R., Popoli, M., Michelato, A., Bignotti, S., Battista, G., Gennarelli, M. (2002). Association Between Promoter Polymorphic Haplotypes of Interleukin-10 Gene and Schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 51: 480-4.
4. Drevets, W. (1999). Schizophrenia. En *Fundamental Neuroscience*. (Zigmond y cols., eds.). Academic Press: San Diego, CA. p. 1554.
5. Kato, Ch., Petronis, A., Okazaki, Y., Tochigi, M., Umekage, T., Sasaki, T. (2002). Molecular Genetic Studies of Schizophrenia: Challenges and Insights. *Neurosci. Res.* 43: 295-304.
6. Drevets, W. (1999). Mania. En *Fundamental Neuroscience*. (Zigmond y cols., eds.). Academic Press: San Diego, CA. p. 1254-5.
7. Dehaene, S., Jonides, J., Smith, E., Spitzer, M. (1999). Thinking and Problem Solving. En *Fundamental Neuroscience*. (Zigmond y cols., eds.). Academic Press: San Diego, CA.
8. Koenig, J., Kirkpatrick, B., Lee, P. (2002). Glucocorticoid Hormones and Early Brain Development in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 27: 309-18.
9. Tsuang, M., Faraone, S. (1998). Schizophrenia. En *Principles of Molecular Medicine*. (Jameson, J., ed.). Humana Press: Totowa, NJ.
10. Michal, G. (1999). Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology. John Wiley & Sons: Berlin.
11. Shibuya, K., Takata, N., Hojo, Y., Furukawa, A., Yasumatsu, N., Kimoto, T., Enami, T., Suzuki, K., Tanabe, N., Ishii, H., Mukai, H., Takahashi, T., Hattori, T., Kawato, S. (2003). Hippocampal Cytochrome P450s Synthesize Brain Neurosteroids which are Paracrine Neuromodulators of Synaptic Signal Transduction. *Biochim. Biophys. Acta*. 1619: 301-16.
12. Bachneff, S. (1996). Regional Cerebral Blood Flow in Schizophrenia and the Local Circuit Neurons Hypothesis. *Schizophr. Bull.* 22(1): 163-82.
13. Ramírez, J., Garnica, R., Boll, M.C., Montes, S., Ríos, C. (2003). Low Concentration of Nitrite and Nitrate in the Cerebrospinal Fluid from Schizophrenic Patients: A Pilot Study. *Schizophr. Res.* En prensa.
14. McConnell, H., Bianchine, J. (1994). Cerebrospinal Fluid in Neurology and Psychiatry. Chapman & Hall Medical: Londres.
15. Shah, A., Crespi, F., Heidbreder, Ch. (2002). Amino Acid Neurotransmitters: Separation Approaches and Diagnostic Value. *J. Chromatogr. B.* 781: 151-63.

16. McCarthy, B., Gomes, U., Neethling, A., Shanley, B., Taljaard, J., Potgieter, L., Rouz, J. (1981). γ -Aminobutyric Acid Concentration in Cerebrospinal Fluid in Schizophrenia. *J. Neurochem.* 36 (4): 1406-8.
17. Guyton, A. (1984). *Tratado de Fisiología Médica*. 6 ed. Nueva Editorial Interamericana: México.
18. Fishman, R. (1992). *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System*. 2 ed. W. B. Saunders: México.
19. Anderson, S., McCarthy, L. (1992). *Pathophysiology: Clinical Concepts of Disease Processes*. 4 ed. Mosby Year Book: St Louis, MO.
20. Rinaldi, M., Ardanaz, S., Notario, R. (1982). *Líquido Cefalorraquídeo*. Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires.
21. Sickmann, A., Dormeyer, W., Wortelkamp, S., Weitalla, D., Kuhn, W., Meyer, H. (2002). Towards a High Resolution Separation of Human Cerebrospinal Fluid. *J. Chromatogr. B.* 771: 167-96.
22. Hosoya, K., Ohtsuki, S., Terasaki, T. (2002). Recent Advances in the Brain-to-Blood Efflux Transport Across the Blood-Brain Barrier. *Int. J. Pharm.* 248: 15-29.
23. Fischbach, F. (1997). *Manual de Pruebas Diagnósticas*. 5 ed. McGraw Hill-Interamericana: México.
24. McGale, E., Pye, I., Stonier, C., Hutchinson, E., Aber, G. (1977). Studies of the Inter-Relationship Between Cerebrospinal Fluid and Plasma Amino Acid Concentrations in Normal Individuals. *J. Neurochem.* 29: 291-7.
25. Blennow, K., Fredman, P., Wallin, A., Gottfries, C., Karlsson, G., Langström, G., Skoog, I., Svennerholm, L., Wikkelso, C. (1993). Protein Analysis in Cerebrospinal Fluid: II. Reference Values Derived from Healthy Individuals 18-88 Years of Age. *Eur. Neurol.* 33: 129-33.
26. Begley, D., Reichel, A., Ermisch, A. (1994). Simple High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Primary Amino Acid Concentrations in Rat Plasma and Cisternal Cerebrospinal Fluid. *J. Chromatogr. B.* 657: 185-91.
27. Rizzo, V., Anesi, A., Montalbetti, L., Bellantoni, G., Trotti, R., Melzi, G. (1996). Reference Values of Neuroactive Amino Acids in the Cerebrospinal Fluid by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical and Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A.* 729: 181-8.
28. Oldendorff, W. (1971). Brain Uptake of Radiolabeled Amino Acids, Amines, and Hexoses after Arterial Injection. *Am. J. Physiol.* 221(6): 1629-39.
29. Lorenzo, A., Smoly-Caruthers, J., Greene, E. (1975). Development of Amino Acid Transport Mechanisms in the Choroid Plexus. En *Fluid Environment of the Brain*. (Cserr y cols., eds.). Academic Press: Nueva York.
30. Molina, J., Leza, J., Ortiz, S., Moro, M., Pérez, S., Lizasoain, I., Urigüen, L., Oliva, J., Manzanares, J. (2002). Cerebrospinal Fluid and Plasma Concentrations of Nitric Oxide Metabolites are Increased in Dementia with Lewy Bodies. *Neurosci. Lett.* 333: 151-3.
31. Toghi, H., Abe, T., Takahashi, S., Kimura, M. (1992). A Selective Reduction of Excitatory Amino Acids in Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer Type Dementia Compared with Vascular Dementia of the Binswanger Type. *Neurosci. Lett.* 141: 5-8.

- 32.** Wiesinger, H. (2001). Arginine Metabolism and the Synthesis of Nitric Oxide in the Nervous System. *Prog. Neurobiol.* 64: 365-91.
- 33.** Abe, T., Toghi, H., Murata, T., Isobe, C., Sato, C. (2001). Reduction in Asymmetrical Dimethylarginine, an Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor, in the Cerebrospinal Fluid During Aging and in Patients with Alzheimer's Disease. *Neurosci. Lett.* 312: 177-9.
- 34.** Qureshi, G., Qureshi, R. (1989). Determination of Free Amino Acids in Biological Samples: Problems of Quantitation. *J. Chromatogr.: Biomedical Applications.* 491: 281-9.
- 35.** Das, I., Khan, N., Puri, B., Hirsch, S. (1996). Elevated Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor in Schizophrenic Plasma May Reflect Abnormalities in Brain Nitric Oxide Production. *Neurosci. Lett.* 215: 209-11.
- 36.** Moncada, S., Radomski, M., Palmer, R. (1988). Endothelium-Derived Relaxing Factor: Identification as Nitric Oxide and Role in the Control of Vascular Tone and Platelet Function. *Biochem. Pharmacol.* 37(13): 2495-501.
- 37.** Bult, H., Boeckxstaens, G., Pelckmans, P., Jordaens, F., Maercke, M., Herman, A. (1990). Nitric Oxide as an Inhibitory Non-adrenergic Non-cholinergic Neurotransmitter. *Nature.* 345: 346-7.
- 38.** Adams, M., Nock, B., Truong, R., Cicero, T. (1991). Nitric Oxide Control of Steroidogenesis: Endocrine Effects of N^o-Nitro-L-Arginine and Comparisons to Alcohol. *Life Sci.* 50: PL35-40.
- 39.** Beckman, J., Beckman, T., Chen, J., Marshall, P., Freeman, B. (1990). Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1620-4.
- 40.** Dawson, V., Dawson, T., London, E., Bredt, D., Snyder, S. (1991). Nitric Oxide Mediates Glutamate Neurotoxicity in Primary Cortical Cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6368-71.
- 41.** Knowles, R., Palacios, M., Palmer, R., Moncada, S. (1989). Formation of Nitric Oxide from L-Arginine in the Central Nervous System: A Transduction Mechanism for Stimulation of the Soluble Guanylate Cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5159-62.
- 42.** McCaslin, P., Oh, S. (1995). Nitric Oxide and Glutamate Receptors. In *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate.* (Stone, T., ed.). CRC Press: Nueva York.
- 43.** Schmidt, H., Walter, U. (1994). NO at Work. *Cell.* 78: 919-25.
- 44.** Nathan, C., Xie, Q. (1994). Nitric Oxide Synthases: Roles, Tolls and Controls. *Cell.* 78: 915-18.
- 45.** Bredt, D., Snyder, S. (1989). Nitric Oxide Mediates Glutamate-Linked Enhancement of cGMP Levels in the Cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9030-3.
- 46.** Edelman, M., Gally, J. (1992). Nitric Oxide: Linking Space and Time in the Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11651-2.
- 47.** Hess, D., Patterson, S., Smith, D., Skene, P. (1993). Neuronal Growth Cone Collapse and Inhibition of Protein Fatty Acylation by Nitric Oxide. *Nature.* 366: 562-6.

48. Wink, D., Grisham, M., Mitchell, J., Ford, P. (1996). Direct and Indirect Effects of Nitric Oxide in Chemical Reactions Relevant to Biology. En *Methods in Enzymology*. Vol. 268. (Packer, L., ed.). Academic Press: San Diego, CA.
49. Clarkson, R., Norby, S., Smirnov, A., Boyer, S., Vahidi, N., Nims, R., Wink, D. (1995). Direct Measurement of the Accumulation and Mitochondrial Conversion of Nitric Oxide within Chinese Hamster Ovary Cells Using an Intracellular Electron Paramagnetic Resonance Technique. *Biochim. Biophys. Acta*. 1243: 496-502.
50. Buga, G., Singh, R., Pervin, S., Rogers, N., Schmitz, D., Jenkinson, C., Cederbaum, S., Ignarro, L. (1996). Arginase Activity in Endothelial Cells: Inhibition by N^G-Hydroxy-L-arginine During High-Output NO Production. *Am. J. Physiol.* 271: H1988-98.
51. Salter, M., Duffy, C., Garthwaite, J., Strijbos, P. (1996). Ex Vivo Measurement of Brain Tissue Nitrite and Nitrate Accurately Reflects Nitric Oxide Synthase Activity In Vivo. *J. Neurochem.* 66: 1683-90.
52. Brenman, J., Bredt, S. (1996). Nitric Oxide Signaling in the Nervous System. En *Methods in Enzymology*. Vol. 269. (Packer, L., ed.). Academic Press: San Diego, CA.
53. Moncada, S., Higgs, A. (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N. Eng. J. Med.* 329(27): 2002-12.
54. Sherwood, L. (2001). Human Physiology: From Cells to Systems. 4 ed. Brooks/Cole: Pacific Grove, CA.
55. Stamler, J. (1994). Redox Signaling: Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric Oxide. *Cell*. 78: 931-6.
56. Beckman, J., Koppenol, W. (1996). Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: The Good, the Bad, and the Ugly. *Am. J. Physiol.* 40: C1424-37.
57. Marletta, M. (1994). Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. *Cell*. 78: 927-30.
58. Muñoz-Fernández, M., Fresno, M. (1998). The Role of Tumor Necrosis Factor, Interleukin 6, Interferon- γ and Inducible Nitric Oxide Synthase in the Development and Pathology of the Nervous System. *Prog. Neurobiol.* 56: 307-40.
59. Förstermann, U. (2000). Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity. En *Handbook of Experimental Pharmacology: Nitric Oxide*. Vol. 143. (Mayer, B., ed.). Springer: Berlin.
60. Garthwaite, J. (2000). The Physiological Roles of Nitric Oxide in the Central Nervous System. En *Handbook of Experimental Pharmacology: Nitric Oxide*. Vol. 143. (Mayer, B., ed.). Springer: Berlin.
61. Schmidt, H., Warner, T., Ishii, K., Sheng, H., Murad, F. (1992). Insulin Secretion from Pancreatic B Cells Caused by L-Arginine-Derived Nitrogen Oxides. *Science*. 255: 721-3.
62. White, K., Marletta, M. (1992). Nitric Oxide Synthase is a Cytochrome P-450 Type Hemoprotein. *Biochemistry*. 31(29): 6627-31.
63. Lipton, S., Choi, Y., Pan, Z., Lei, S., Chen, H., Sucher, N., Loscaizo, J., Singel, D., Stamler, J. (1993). A Redox-Based Mechanism for the Neuroprotective and Neurodegenerative Effects of Nitric Oxide and Related Nitroso-Compounds. *Nature*. 364: 626-32.

64. Bolaños, J., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J., Clark, J., Heales, S. (1997). Nitric Oxide-Mediated Mitochondrial Damage in the Brain: Mechanisms and Implications for Neurodegenerative Diseases. *J. Neurochem.* 68: 2227-40.
65. Snyder, S. (1992). Nitric Oxide and Neurons. *Curr. Op. Neurobiol.* 2:323-7.
66. Dinerman, J., Dawson, T., Schell, M., Snowman, A., Snyder, S. (1994). Endothelial Nitric Oxide Synthase Localized to Hippocampal Pyramidal Cells: Implications for Synaptic Plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4214-8.
67. Nathan, C., Xie, Q. (1994). Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* 269(19): 13725-8.
68. Hope, B., Michael, G., Knigge, K., Vincent, S. (1991). Neuronal NADPH Diaphorase is a Nitric Oxide Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2811-4.
69. Wu, G., Morris, S. (1998). Arginine Metabolism: Nitric Oxide and Beyond. *Biochem. J.* 336: 1-17.
70. Alderton, W., Cooper, C., Knowles, R. (2001). Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.
71. Carlberg, M. (1994). Assay of Neuronal Nitric Oxide Synthase by HPLC Determination of Citrulline. *J. Neurosci. Meth.* 52: 165-7.
72. Hemmens, B., Mayer, B. (1998). Enzymology of Nitric Oxide Synthases. En *Methods in Molecular Biology: Nitric Oxide Protocols.* Vol. 100. (Titheradge, M., ed.). Humana Press: Totowa, NJ.
73. Xia, Y., Dawson, V., Dawson, T., Snyder, S., Zweier, J. (1996). Nitric Oxide Synthase Generates Superoxide and Nitric Oxide in Arginine-Depleted Cells Leading to Peroxynitrite-Mediated Cellular Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 6770-4.
74. Xia, Y., Zweier, J. (1997). Direct Measurement of Nitric Oxide Generation from Nitric Oxide Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12705-10.
75. Brecht, D., Snyder, S. (1990). Isolation of Nitric Oxide Synthetase, a Calmodulin-Requiring Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 682-5.
76. Knowles, R., Moncada, S. (1994). Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem. J.* 298: 249-58.
77. Eliasson, M., Blackshaw, S., Schell, M., Snyder, S. (1997). Neuronal Nitric Oxide Synthase Alternatively Spliced Forms: Prominent Functional Localizations in the Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3396-401.
78. Bolaños, J., Peuchen, S., Heales, S., Land, J., Clark, J. (1994). Nitric Oxide-Mediated Inhibition of the Mitochondrial Respiratory Chain in Cultured Astrocytes. *J. Neurochem.* 63: 910-6.
79. Arnt-Ramos, L., O'Brien, W., Vincent, R. (1992). Immunohistochemical Localization of Argininosuccinate Synthetase in the Rat Brain in Relation to Nitric Oxide Synthase-Containing Neurons. *Neuroscience.* 51(4): 773-89.
80. Chao, D., Hwang, P., Huang, F., Brecht, D. (1996). Localization of Neuronal Nitric Oxide Synthase. En *Methods in Enzymology.* Vol. 268. (Packer, L., ed.). Academic Press: San Diego, CA.
81. Huang, P., Dawson, T., Brecht, D., Snyder, S., Fishman, M. (1993). Targeted Disruption of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene. *Cell.* 75: 1273-86.

- 82.** Crow, J. (1999). Measurement and Significance of Free and Protein-Bound 3-Nitrotyrosine, 3-Chlorotyrosine, and Free 3-Nitro-4-Hydroxyphenylacetic Acid in Biologic Samples: A High-Performance Liquid Chromatography Method Using Electrochemical Detection. En *Methods in Enzymology*. Vol. 301. (Packer, L., ed.). Academic Press: San Diego, CA.
- 83.** Simmons, W., Closs, E., Cunningham, J., Smith, T., Kelly, R. (1996). Cytokines and Insulin Induce Cationic Amino Acid Transporter (CAT) Expression in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 271(20): 11694-702.
- 84.** Elgün, S., Kumbasar, H. (2000). Increased Serum Arginase Activity in Depressed Patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 24: 227-32.
- 85.** Gotoh, T., Mori, M. (1999). Arginase II Downregulates Nitric Oxide (NO) Production and Prevents NO-Mediated Apoptosis in Murine Macrophage-Derived RAW 264.7 Cells. *J. Cell Biol.* 144(3): 427-34.
- 86.** Ratnakumari, L., Qureshi, I., Butterworth, R., Marescau, B., De Deyn, P. (1996). Arginine-Related Guanidino Compounds and Nitric Oxide Synthase in the Brain of Ornithine Transcarbamylase Deficient spf Mutant Mouse: Effect of Metabolic Arginine Deficiency. *Neurosci. Lett.* 215: 153-156.
- 87.** Wink, D., Vodovotz, Y., Grisham, M., DeGraff, W., Cook, J., Pacelli, R., Krishna, M., Mitchell, L. (1999). Antioxidant Effects of Nitric Oxide. En *Methods in Enzymology*. Vol. 301. (Packer, L., ed.). Academic Press: San Diego, CA.
- 88.** Dawson, T., Bredt, D., Fotuhi, M., Hwang, P., Snyder, S. (1991). Nitric Oxide Synthase and Neuronal NADPH Diaphorase are Identical in Brain and Peripheral Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7797-801.
- 89.** Heales, S., Bolaños, J., Stewart, V., Brookes, P., Land, J., Clark, J. (1999). Nitric Oxide, Mitochondria and Neurological Disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1410: 215-28.
- 90.** Regan, R., Renn, K., Panter, S. (1993). NMDA Neurotoxicity in Murine Cortical Cell Cultures is not Attenuated by Hemoglobine or Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. *Neurosci. Lett.* 153: 53-6.
- 91.** MacMillan-Crow, L., Crow, J., Kerby, J., Beckman, J., Thompson, J. (1996). Nitration and Inactivation of Manganese Superoxide Dismutase in Chronic Rejection of Human Renal Allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11853-8.
- 92.** Shigenaga, M. (1999). Quantitation of Protein-Bound 3-Nitrotyrosine by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. En *Methods in Enzymology*. Vol. 301. (Packer, L., ed.). Academic Press: San Diego, CA.
- 93.** Huang, Z., Huang, P., Panahian, N., Dalkara, T., Fichman, M., Moskowitz, M. (1994). Effects of Cerebral Ischemia in Mice Deficient in Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Science.* 265: 1883-5.
- 94.** Skoog, D., Holler, F., Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. 5 ed. McGraw-Hill: Madrid.
- 95.** Harris, D. (1999). Análisis Químico Cuantitativo. 2 ed. Reverté: Barcelona.
- 96.** Simons, S., Johnson, D. (1976). The Structure of the Fluorescent Adduct Formed in the Reaction of o-Phtalaldehyde and Thiols With Amines. *J. Am. Chem. Soc.* 98(22): 7098-9.

- 97.** Kolthoff, I., Sandell, E., Meehan, E., Bruckenstein, S. (1969). *Quantitative Chemical Analysis*. 4 ed. ManMillan Company: Londres.
- 98.** Turnell, D., Cooper, J. (1982). Rapid Assay for Amino Acids in Serum or Urine by Pre-Column Derivatization and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Clin. Chem.* 28(3): 527-31.
- 99.** Jarrett, H., Cooksy, K., Ellis, B., Anderson, J. (1986). The Separation of o-Phtalaldehyde Derivatives of Amino Acids by Reversed-Phase Chromatography on Octylsilica Columns. *Anal. Biochem.* 153: 189-98.
- 100.** Pérez-Neri, I., Montes, S., Boll, M.C., Ramírez-Bermúdez, J., Ríos, C. (2003). HPLC-Fluorimetric Method for the Estimation of Nitric Oxide Biosynthesis in the Central Nervous System. *J. Chromatogr. B.* Enviado para publicación.
- 101.** Xing, G., Chavko, M., Zhang, L., Yang, S., Post, R. (2002). Decreased Calcium-dependent Constitutive Nitric Oxide Synthase (cNOS) Activity in Prefrontal Cortex in Schizophrenia and Depression. *Schizophr. Res.* 58: 21-30.
- 102.** Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R., Moris, S., Ratan, R. (2003). Translational Control of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Arginine Can Explain the Arginine Paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(8): 4843-8.
- 103.** Srivastava, N., Barthwal, M., Dalal, P., Agarwal, A., Nag, D., Srimal, R., Seth, P., Dikshit, M. (2001). Nitrite Content and Antioxidant Enzyme Levels in the Blood of Schizophrenia Patients. *Psychopharmacology.* 158: 140-5.
- 104.** Akyol, Ö., Herken, H., Uz, E., Fadillioglu, E., Ünal, S., Sögüt, S., Özyurt, H., Savas, H. (2002). The Indices of Endogenous Oxidative and Antioxidative Processes in Plasma from Schizophrenic Patients: The Possible Role of Oxidant/Antioxidant Imbalance. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 26: 995-1005.
- 105.** Gattaz, W., Cramer, H., Beckmann, H. (1983). Low CSF Concentration of Cyclic GMP in Schizophrenia. *Br. J. Psychiatry.* 142: 288-91.
- 106.** Das, I., Khan, N., Puri, B., Sooranna, S., de Bellerocche, J., Hirsch, S. (1995). Elevated Platelet Calcium Mobilization and Nitric Oxide Synthase Activity may Reflect Abnormalities in Schizophrenic Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(2): 375-80.
- 107.** Zoroglu, S., Herken, H., Yürekli, M., Uz, E., Tutkun, H., Savas, H., Bagci, C., Özen M., Cengiz, B., Cakmak, E., Dogru, M., Akyol, Ö. (2002). The Possible Pathophysiological Role of Plasma Nitric Oxide and Adrenomedullin in Schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 36: 309-15.
- 108.** Yanik, M., Vural, H., Kocyigit, A., Tutkun, H., Zoroglu, S., Herken, H., Savas, H., Köylü, A., Akyol, Ö. (2003). Is the Arginine-Nitric Oxide Pathway Involved in the Pathogenesis of Schizophrenia? *Neuropsychobiology.* 47: 61-5.
- 109.** Shinkai, T., Ohmori, O., Hori, H., Nakamura, J. (2002). Allelic Association of the Neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS1) Gene with Schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 7: 560-3.
- 110.** Bernstein, H., Krell, D., Braunewell, K., Baumann, B., Gundelfinger, E., Diekmann, S., Danos, P., Bogerts, B. (2001). Increased Number of Nitric Oxide Synthase Immunoreactive Purkinje Cells and Dentate Nucleus Neurons in Schizophrenia. *J. Neurocytol.* 30: 661-70.

- 111.** Karson, C., Griffin, S., Mrak, R., Husain, M., Dawson, T., Snyder, S., Moore, N., Sturner, W. (1996). Nitric Oxide Synthase (NOS) in Schizophrenia: Increases in Cerebellar Vermis. *Mol. Chem. Neuropathol.* 27: 275-84.
- 112.** Bernstein, H., Stanarius, A., Baumann, B., Henning, H., Krell, D., Danos, P., Falkai, P., Bogerts, B. (1998). Nitric Oxide Synthase-Containing Neurons in the Human Hypothalamus: Reduced Number of Immunoreactive Cells in the Paraventricular Nucleus of Depressive Patients and Schizophrenics. *Neuroscience.* 83(3): 867-75.
- 113.** Bird, D., Bujas-Bobanovic, M., Robertson, H., Dursun, S. (2001). Lack of Phencyclidine-induced Effects in Mice with Reduced Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Psychopharmacology.* 155: 299-309.
- 114.** Bujas-Bobanovic, M., Bird, D., Robertson, H., Dursun, S. (2000). Blockade of Phencyclidine-induced Effects by a Nitric Oxide Donor. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1005-12.
- 115.** Bujas-Bobanovic, M., Robertson, H., Dursun, S. (2000). Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitor N^G-Nitro-L-arginine Methyl Ester on Phencyclidine-induced Effects in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 409: 57-65.
- 116.** Black, M., Selk, D., Hitchcock, J., Wettstein, J., Sorensen, S. (1999). On the Effect of Neonatal Nitric Oxide Synthase Inhibition in Rats: a Potential Neurodevelopmental Model of Schizophrenia. *Neuropharmacology.* 38: 1299-1306.