



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGIA

MANUEL VELASCO SUAREZ

Evaluación del efecto antioxidante de la olanzapina en combinación con N acetilcisteína en un modelo de esquizofrenia inducido por MK-801 en ratón.

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA

En Psiquiatría

PRESENTA

Dra. Reyna Minerva Lamas Aguilar

TUTOR DE TESIS

Dra. María de los Ángeles Araceli Diaz Ruiz



Ciudad de México, octubre 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso


DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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


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



INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA



DRA. SONIA ILIANA MEJIA PEREZ
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



(Dr. Edgar Daniel Crail Meléndez)

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE PSIQUIATRÍA



(Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruiz)

TUTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Araceli Díaz Ruíz, al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda y al Dr. Iván Pérez Neri por darme la oportunidad de formar parte de su admirable equipo de trabajo, por guiarme y acompañarme en todo momento desde el inicio y hasta el final del desarrollo del presente proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de neuroquímica: Alfonso y Erick por brindarme su apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

Al Dr. Carlos Aviña Cervantes por ser un ejemplo durante mi formación como psiquiatra, por enseñarme lo necesario para ejercer esta profesión con humildad y compasión.

A mi familia por volverse un pilar fundamental durante todos estos años que me ha tomado volver realidad aquel sueño de convertirme en médico y finalmente en especialista.

Pero sobre todo agradezco a mis pacientes, por su confianza, por permitirme acompañarlos durante los momentos más oscuros, por darme la oportunidad de poder aprender de ellos y por motivarme no solo a intentar ser una mejor especialista si no también un mejor ser humano.

Índice General

1. Introducción.....	8
2. Marco teórico	9
2.1 Fisiopatología de la Esquizofrenia:	8
2.2 Tratamiento farmacológico para la esquizofrenia:	8
2.3 Resistencia al tratamiento farmacológico:	8
2.4 Olanzapina:	8
2.5 N-acetilcisteína (NAC):	9
2.6 Glutati3n:	9
2.7 Estr3s oxidativo:	10
2.8 Peroxidaci3n lip3dica:	10
2.9 Papel del estr3s oxidativo en enfermedades psiqui3tricas:	10
2.10 Proceso de neuroprogresi3n en enfermedades psiqui3tricas:	11
2.11 Uso de NAC en el tratamiento de enfermedades psiqui3tricas:	11
3. Pregunta de investigaci3n	12
4. Hip3tesis	12
5.0. Objetivo general	12
6.0. Materiales y m3todos	12
6.1. Animales:	12
6.2 Tratamiento farmacol3gico:	13
6.3 An3lisis estad3stico:	13
6.4 Dise1o experimental	14
6.5 Determinaci3n de la concentraci3n de glutati3n reducido	14
6.6 Ensayo de lipoperoxidaci3n:	15

7.0. Resultados	15
7.1 Participación del estrés oxidativo y niveles de glucosa sérica	15
7.2 Niveles de peroxidación lipídica:	16
7.3 Niveles de Glutación reducido:	17
8.0. Discusión	18
9. Conclusiones	20
10 . Referencias	20

Índice de figuras

Figura 1. Sistemas antioxidantes.....	11
Figura 2. Generación de EROS y peroxidación lipídica.....	12
Figura 3. Estrés oxidativo y niveles de glucosa sérica	17
Figura 4. Niveles de Peroxidación lipídica	18
Figura 5. Niveles de Glutación reducido	19

Abreviaturas

NMDA: N-Methyl-d-Aspartato

NAC: N acetil cisteína

OLA: Olanzapina

PANSS: Escala para el síndrome positivo y negativo en la Esquizofrenia

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

EROS: Especies reactivas del oxígeno

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CGI: Escala de impresión clínica global

FDA: Food and drug administration

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

SSF 0.9%: Solución salina fisiológica al 0.9%

NADPH oxidasas: Nicotinamida adenina fosfato dinucleótido en su forma oxidada

Resumen

La esquizofrenia es una condición crónica que afecta al 1% de la población. Además de los síntomas positivos y negativos, los pacientes con esquizofrenia presentan disfunción a nivel cognitivo. Una de las principales teorías que explican la etiología de la esquizofrenia, es la relacionada a la hipofunción en los receptores de glutamato N-Methyl-d-Aspartato (NMDA), induciendo la pérdida del equilibrio entre la producción de especies oxidantes generados en el metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidante, lo que inevitablemente generan un estado de estrés oxidante. Se ha propuesto a la NAC como un agente adyuvante para potencializar la eficacia de antipsicóticos atípicos como la olanzapina, mejorando los procesos de oxidación y muerte celular propios de la enfermedad. Los experimentos fueron realizados en 30 ratones divididos en 5 grupos experimentales. Uno de los modelos en animales mejor establecidos en esquizofrenia, es el modelo de hipofunción de NMDA, al utilizar de forma aguda un antagonistas de NMDA como el MK801 y observarse un perfil de cambios en el comportamiento similar a los síntomas positivos, negativos y cognitivo de la esquizofrenia. Se evaluó la participación del estrés oxidativo al medir la peroxidación lipídica y la concentración de glutatión reducido a nivel de la corteza prefrontal. La administración de MK-801 produjo un aumento en la peroxidación lipídica y una disminución en la concentración de glutatión reducido a nivel de la corteza prefrontal. En este mismo sentido, tanto el tratamiento con Olanzapina como con NAC y con la combinación de OLA-NAC disminuyeron la peroxidación lipídica y aumentaron el glutatión en el tejido cerebral. Estos datos sugieren que el tratamiento con Olanzapina y NAC pudiera regular el daño oxidativo propio de la enfermedad y representar una opción terapéutica para pacientes con psicosis crónica o inclusive aquellos resistentes al tratamiento farmacológico.

Palabras clave: Olanzapina, N acetil cisteína, esquizofrenia

1. Introducción

La esquizofrenia es una condición crónica que afecta al 1% de la población, se estima que alrededor de 21 millones de personas en el mundo viven con esta enfermedad ⁽¹⁾. Debido a que la sintomatología inicia por lo general en la adultez temprana, representa una carga económica y social significativa ⁽²⁾. Esta condición se considera uno de los trastornos psiquiátricos más graves, principalmente por las altas tasas de mortalidad en quienes padecen esta condición. Debido a la alta tasa de mortalidad en todos los grupos de edad, los pacientes con esquizofrenia tienen una esperanza de vida hasta 20 años menor que la población general ⁽¹⁾⁽³⁾. La esquizofrenia también se ha relacionado con un mayor riesgo de enfermedad comórbida, principalmente enfermedades crónicas degenerativas como accidentes cerebrovasculares, diabetes mellitus tipo II, enfermedades coronarias, respiratorias y algunos tipos de cáncer. También, los pacientes con esquizofrenia tienen un riesgo superior (del 5 al 10%) que la población general de morir por suicidio ⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾. Además de los síntomas positivos como la presencia de ideas delirantes y alteraciones en la sensorpercepción y síntomas negativos como abulia, anhedonia y aplanamiento afectivo, los pacientes con esquizofrenia presentan disfunción a nivel cognitivo como alteraciones en la atención, memoria de trabajo y función ejecutiva, lo que repercute directamente en el pronóstico y calidad de vida. A pesar del éxito terapéutico del tratamiento con antipsicóticos atípicos como la olanzapina en pacientes con esquizofrenia, su uso se ve limitado; por los efectos adversos como: ganancia de peso y mayor riesgo cardio metabólico. Con base en esta información, el tratamiento con N-acetilcisteína (que es un potente antioxidante) podría reducir el estrés oxidativo en un modelo de esquizofrenia en ratones tratados con olanzapina. Los resultados de este protocolo de investigación proporcionan evidencia que relaciona el papel del estrés oxidativo en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia. Nuestros resultados podrían reforzar la posible modificación de los esquemas actuales de tratamiento para este grupo de pacientes, brindando una oportunidad de mejoría para el importante porcentaje de pacientes que no presentan respuesta a los esquemas de tratamiento farmacológico convencionales.

2. Marco teórico

2.1 Fisiopatología de la Esquizofrenia:

Dentro de las principales teorías que tratan de explicar la etiopatogenia de la esquizofrenia, se sugiere que existe una hipofunción en los receptores de glutamato N-Methyl-d-Aspartato (NMDA), sustentada por medio de estudios postmortem en cerebros de pacientes con esquizofrenia así como por la realización de modelos con roedores al administrar de manera aguda o crónica un antagonista de los receptores NMDA como el MK 801 (dizocilpina) e inducir síntomas que mimetizan la enfermedad (6) (7). La segunda teoría sugiere que existe un estado de transmisión dopaminérgica excesiva, que se sustenta al observar la disminución de los síntomas tras la administración de antagonistas de los receptores D2 de dopamina y al observar en estos pacientes por medio de tomografía por emisión de positrones, anomalías tanto en la síntesis como en la liberación de dopamina a nivel de la corteza prefrontal (PFCx) (6) (8) (9). Dentro de la fisiopatología de la esquizofrenia se han localizado áreas cerebrales fuertemente involucradas, como la PFCx, responsable de procesos cognitivos complejos por medio de la interconexión de áreas corticales sensoriales y motoras y de estructuras subcorticales (10) (11). La PFCx está formada principalmente por neuronas glutamatérgicas piramidales (75 al 80% del total de las células neuronales) e interneuronas gabaérgicas (6).

2.2 Tratamiento farmacológico para la esquizofrenia:

Los antipsicóticos constituyen el tratamiento central para la esquizofrenia. Por medio del bloqueo de los receptores D2 de dopamina a nivel estriatal, estos fármacos son efectivos para el manejo de las manifestaciones agudas de la enfermedad, disminuyendo también el riesgo de futuras recaídas. Se considera que es necesario el bloqueo del 60% de los receptores D2 para una adecuada respuesta terapéutica, sin embargo, una ocupación superior al 80% se asocia con presencia efectos adversos como síntomas extrapiramidales como distonía aguda, temblor, rigidez y discinesia tardía. Estos efectos adversos, pueden llegar a ser poco tolerables por los pacientes, incrementando el riesgo de abandono terapéutico y por consiguiente el número de recaídas y hospitalizaciones (12) (2).

2.3 Resistencia al tratamiento farmacológico:

En la actualidad; se cuenta con varias alternativas de tratamiento, sin embargo; se ha reportado que el 20 al 30% de los pacientes presentan falta de respuesta al tratamiento farmacológico (13). Se conoce como esquizofrenia resistente al tratamiento cuando no es posible demostrar una mejoría en la sintomatología

de por lo menos un 20% a través de escalas que valoran tanto síntomas positivos como negativos como la PANSS, después de por lo menos dos esquemas de tratamiento distintos con antipsicótico en dosis y tiempo adecuado ⁽¹³⁾ ⁽¹⁴⁾.

2.4 Olanzapina:

La olanzapina, un antipsicótico atípico de segunda generación que, a pesar de poseer propiedades estructurales y farmacológicas similares a la clozapina, es considerado un antipsicótico más potente, con un mejor perfil de tolerabilidad en comparación con antipsicóticos típicos como el haldol, al causar menos efectos extrapiramidales, menor efecto de sedación y menor hiperprolactinemia, no solo a dosis antipsicóticas moderadas si no incluso con dosis mayores. A diferencia de otros antipsicóticos, la olanzapina presenta un inicio de acción relativamente rápido, observándose mejoría de la sintomatología desde la primera semana de tratamiento, además se ha reportado una mejoría en mayor medida de los síntomas negativos, en comparación con antipsicóticos típicos como el haldol ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁶⁾. Fue aprobada en un inicio para el tratamiento de pacientes con esquizofrenia y posteriormente para pacientes con trastorno afectivo bipolar y depresión resistente al tratamiento ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁶⁾. Sin embargo, su uso como agente de primera línea, se ve limitado en pacientes con riesgo metabólico, debido a que no solo se asocia de manera consistente con ganancia de peso, si no que posee un alto riesgo cardiometabólico al incrementar de manera importante los niveles de triglicéridos en ayunas y la resistencia a la insulina ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁸⁾. De acuerdo a estudios realizados en modelos animales con MK-801, los antipsicóticos atípicos han mostrado ser superiores a los antipsicóticos típicos en la reversión del déficit cognitivo inducido por el bloqueo del receptor NMDA, al presentar mejoría en el aprendizaje espacial, el aprendizaje de reversión y la memoria de reconocimiento ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾. Específicamente se observó que la olanzapina, además de revertir de manera parcial estos déficits cognitivos, también revirtió parcialmente la reducción de las subunidades del receptor NMDA inducida por MK-801 ⁽²²⁾. En los últimos años, los antipsicóticos atípicos como la olanzapina, se han relacionado con propiedades neuroprotectoras, al contribuir en la expresión de diferentes proteínas sinápticas y factores de transcripción. Varios estudios reportan que la olanzapina incrementa la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la formación de CREB, un importante factor de transcripción que regula la expresión genética ⁽²³⁾ ⁽²⁴⁾. Además de promover la modulación de factores de supervivencia celular, la olanzapina también se asoció con el bloqueo de caspasa-3, un marcador de muerte celular apoptótica ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾.

2.5 N-acetilcisteína (NAC):

La NAC es un agente mucolítico y antioxidante derivado del aminoácido L-cisteína. Es precursor del glutatión, normalizando sus niveles. Desde 1985 fue aprobado su uso por la FDA como antídoto para la sobredosis por acetaminofén ⁽²⁶⁾ ⁽²⁷⁾ ⁽²⁸⁾ ⁽²⁹⁾. Debido a su amplio perfil de seguridad y tolerancia se ha utilizado para el tratamiento de una gran variedad de condiciones médicas ⁽³⁰⁾ ⁽³¹⁾. Existe evidencia suficiente para sugerir su uso como antioxidante y mucolítico en el tratamiento de la enfermedad obstructiva pulmonar crónica, como agente nefroprotector en la nefropatía inducida por medio de contraste, como tratamiento preventivo en la fibrilación auricular y como tratamiento adyuvante en la infección por VIH ⁽³²⁾ ⁽²⁹⁾ ⁽³¹⁾ ⁽³³⁾. En los últimos años se ha asociado con efectos inhibitorios en la replicación del virus A de la influenza, por lo que es considerado como un agente potencial para su tratamiento ⁽²⁹⁾ ⁽³⁴⁾.

2.6 Glutatión:

El glutatión es un tripéptido no proteico compuesto por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Constituye el principal antioxidante endógeno por lo que es responsable de mantener el balance oxidativo a nivel celular. En las células y tejidos sanos, se encuentra principalmente en su estado reducido (GSH) y en una menor proporción en su forma oxidada (GSSG) ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾.

2.7 Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desbalance entre factores oxidantes y antioxidantes dentro de los límites fisiológicos, con la producción subsecuente de especies reactivas del oxígeno (EROS) como: iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos. Las EROS son producidas por procesos fisiológicos normales, jugando un papel importante en procesos de señalización celular y homeostasis tisular. Sin embargo, el exceso de EROS produce modificaciones adversas en los componentes celulares, provocando daño en proteínas, lípidos y el DNA ⁽³⁰⁾ ⁽³⁷⁾ ⁽³⁶⁾.

Las membranas celulares y la membrana de orgánulos celulares, debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, son especialmente susceptibles al daño de las EROS, lo que se denomina peroxidación lipídica.

Debido a que la generación intracelular de EROS es un proceso inevitable, todas las células en general, poseen diferentes sistemas de defensa antioxidante ^{Figura 1.} En el presente trabajo de investigación nos centraremos en el daño oxidante producido por la peroxidación lipídica, que se describe a continuación.

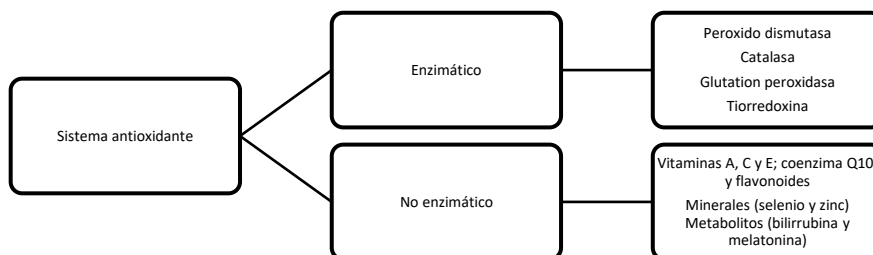


Figura 1. El sistema antioxidante protege a las células de la peroxidación lipídica inducida por las EROS.

2.8 Peroxidación lipídica:

La peroxidación lipídica es un proceso en el que los radicales libres oxilo, peroxilo e hidroxilo eliminan electrones de los lípidos para generar productos intermedios con el subsecuente daño celular, alterando el ensamblaje, la composición, la estructura y la dinámica de las membranas lipídicas, el ADN y las proteínas. Recientemente, se ha descubierto que la ferroptosis, una nueva forma de muerte celular programada, está causada por la peroxidación de lípidos ³⁸.

La peroxidación lipídica daña a los fosfolípidos directamente y también puede actuar como señal de muerte celular que induce una muerte celular programada. Los fosfolípidos oxidados también pueden desempeñar un papel importante en muchas enfermedades inflamatorias y con frecuencia median cambios proinflamatorios ^{38, 39}.

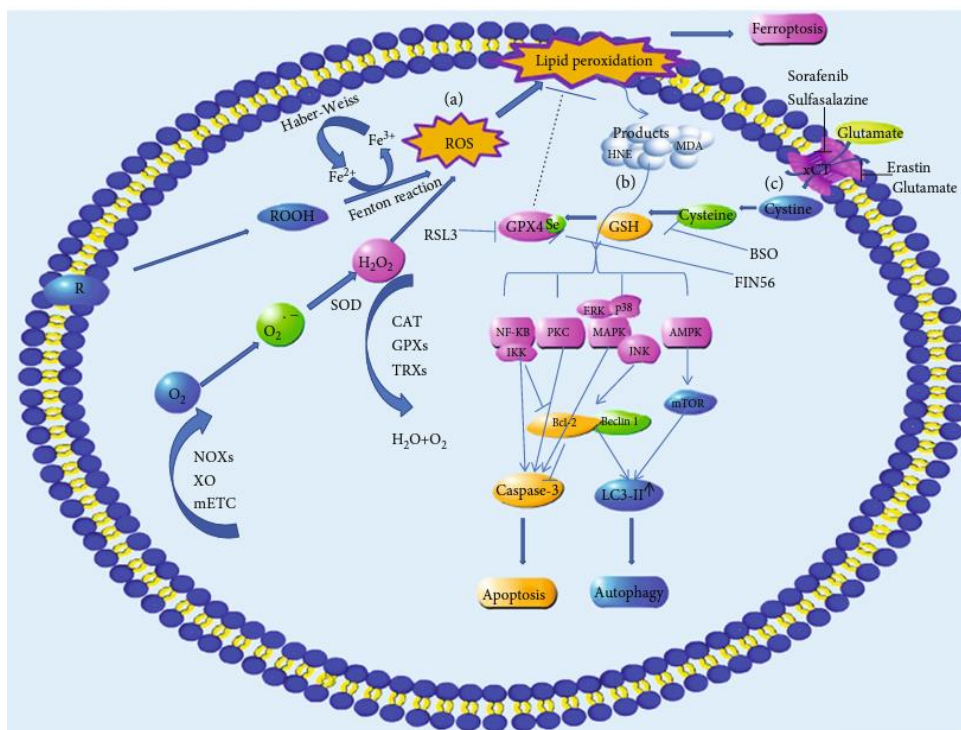


Figura 1. Generación de EROS y peroxidación lipídica en la muerte celular. (a) Generación de EROS; Las EROS se derivan del radical superóxido, cuya formación se produce principalmente a través de NADPH oxidasas, xantina oxidasa y la cadena de transporte de electrones mitocondriales. Los ácidos grasos poliinsaturados que contienen fosfolípidos pueden generar radicales alcoxilo (RO) mediante la reacción química de Fenton. (b) Los productos de la peroxidación lipídica inducen la apoptosis y la autofagia a través de diferentes vías. (c) La actividad de GPX4 disminuye y un agotamiento de GSH causa peroxidación de lípidos y, en consecuencia, ferroptosis. Modificado por Su et al., 2019.

2.9 Papel del estrés oxidativo en enfermedades psiquiátricas:

A pesar de que los sustratos moleculares del papel del estrés oxidativo en las enfermedades psiquiátricas no se encuentran del todo establecidos, por medio de estudios en tejidos periféricos y en modelos con animales se ha encontrado una relación entre el estrés oxidativo y la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas como esquizofrenia y trastorno afectivo bipolar. El GSH tiene un papel importante en la protección del daño producido en las células por las EROS, generadas entre otras, por el metabolismo de la dopamina ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁴¹⁾. Se estima que un déficit de GSH conduce a un proceso degenerativo alrededor de las terminales dopaminérgicas ⁽⁴²⁾. El descubrimiento de las anomalías en el metabolismo del GSH en la esquizofrenia, ofrece un nuevo objetivo para la intervención farmacológica en este grupo de pacientes.

2.10 Proceso de neuroprogresión en enfermedades psiquiátricas:

La activación de vías inmuno-inflamatorias tiene una fuerte relación con la producción de estrés oxidativo, la disminución en defensas antioxidantes y el incremento en la formación de especies reactivas al oxígeno y al nitrógeno que desencadenan daño celular y una condición de neuroprogresión ⁽⁴³⁾. Se entiende por neuroprogresión al acumulo de alteraciones en el cerebro durante toda la enfermedad psiquiátrica, en el que contribuyen múltiples factores como modificaciones neuroestructurales, procesos inmuno-inflamatorios, factores inmunogenéticos, incremento del estrés oxidativo y disfunción a nivel mitocondrial ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁵⁾. Estas condiciones producen cambios funcionales que pudieran contribuir a una mayor vulnerabilidad para recaídas, una respuesta menor al tratamiento y un incremento en el decline funcional y cognitivo ⁽⁴⁶⁾.

2.11 Uso de NAC en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas:

La NAC actúa como antioxidante, al disminuir el daño oxidativo producido por las EROS al reducir o prevenir la depleción de GSH ⁽³⁰⁾ ⁽⁴⁵⁾. Se ha demostrado que tiene un papel importante en distintos trastornos psiquiátricos, al intervenir en la modulación de procesos como la neuro-inflamación, el estrés oxidativo y la regulación de los sistemas de neurotransmisión de glutamato y dopamina. Por lo que en los últimos años se ha incrementado el interés por utilizar este fármaco como una opción terapéutica en este grupo de pacientes ⁽⁴³⁾ ⁽⁴⁶⁾.

Debido lo anterior, a su buen perfil de seguridad y la mejor comprensión de su mecanismo de acción, se ha considerado a la NAC como un agente adyuvante para potencializar la eficacia de antipsicóticos atípicos como la olanzapina, mejorando los procesos de oxidación y muerte celular propios de la enfermedad y representando una opción de tratamiento para los pacientes con esquizofrenia o psicosis asociadas, inclusive aquellos resistentes al tratamiento

3. Pregunta de investigación

¿La administración de la combinación de olanzapina con N acetil cisteína en un modelo de esquizofrenia inducido por MK-801 en ratón puede disminuir el estrés oxidativo a nivel de la corteza prefrontal?

4. Hipótesis

La administración de la combinación de olanzapina con N acetil cisteína en un modelo de esquizofrenia inducido por MK-801 en ratón disminuye el estrés oxidativo en la corteza prefrontal al ser comparado con el grupo control sin tratamiento.

5.0. Objetivo general

Evaluar el efecto antioxidante de la olanzapina en combinación con N acetil cisteína en un modelo de esquizofrenia inducido por MK-801 en ratón.

5.1 Objetivos específicos:

Evaluar el efecto en los niveles de glucosa sérica en un modelo de esquizofrenia inducido por MK-801 en ratón tratados con la olanzapina en combinación con N acetil cisteína.

Evaluar los niveles de peroxidación lipídica en un modelo de esquizofrenia inducido por MK-801 en ratón tratados con la olanzapina en combinación con N acetil cisteína.

6.0. Materiales y métodos

6.1. Animales:

Los experimentos fueron realizados en 30 ratones albinos de la cepa CD1 machos adultos de 25 a 30 g (donados por la Universidad Autónoma Metropolitana) que se mantuvieron en condiciones estándares de laboratorio con ciclos de luz-oscuridad 12:12 y a una temperatura de 22°C, con acceso libre acceso a agua y alimentos. Todos los procedimientos para el manejo de animales fueron realizados de acuerdo con las Guías regulatorias para el cuidado y uso de animales de laboratorio conforme la NOM-062-ZOO-1999 y fueron revisados y observados por el Comité Institucional para el Cuidado de los Animales de Laboratorio del Instituto (CICUAL- INNN) (Protocolo No. 38/20).

6.2 Tratamiento farmacológico:

La olanzapina fue disuelta para su administración en solución salina fisiológica al 0.9% (SSF 0.9%). Dosis (4 mg/Kg) cada 12 horas, intraperitoneal (i.p.)

La N-acetil-cisteína fue disuelta para su administración en solución salina fisiológica al 0.9% (SSF 0.9%). Dosis (80 mg/Kg) cada 24 horas intraperitoneal (i.p.).

El MK801 (dizocilpina) fue disuelto para su administración en solución salina fisiológica al 0.9% (SSF 0.9%). Dosis (0.25 mg/Kg) intraperitoneal (i.p.).

Los 30 ratones fueron divididos en 5 grupos con las siguientes características:

Sana: animales intactos

MK801 + Veh: Se le administró tratamiento con solución salina al 0.9% a 0.1 ml (i.p.) cada 12 horas, 14 días previos a la administración de MK 801 (dizocilpina) (0.25 mg/kg, i.p.); un antagonista de los receptores N-Metil-d-Aspartato (NMDA) para inducir el modelo de esquizofrenia ⁶.

MK801 + OLZ: Se le administró tratamiento con Olanzapina 4 mg/Kg (i.p.) cada 12h horas, 14 días previos a la administración de MK 801 (0.25 mg/kg, i.p.) ²⁴.

MK801+ NAC: Se le administró tratamiento con N acetil cisteína 80 mg/kg (i.p.) cada 24 horas, 14 días previos a la administración de MK 801 (0.25 mg/kg, i.p.).

MK801 +OLAZ/NAC: Se le administró tratamiento con la combinación de Olanzapina a 4 mg/Kg (i.p.) cada 12h horas y NAC 80 mg/kg (i.p.) cada 24 horas 14 días previos a la administración de MK 801 (0.25 mg/kg, i.p.) ⁴⁷.

6.3 Análisis estadístico:

Se obtuvieron los valores promedio \pm error estándar. La estimación del tamaño de la muestra para este estudio experimental aleatorizado y controlado se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

$$n = 2 \left[\frac{(z_{\alpha} - z_{\beta})\sigma}{\mu_{\tau} - \mu_2} \right]^2$$

Donde n es el número de sujetos para cada grupo de tratamiento, $\mu_{\tau} - \mu_2$ es la diferencia detectable entre la media de los dos grupos, σ es la desviación estándar común de cada grupo, y Z_{α} y Z_{β} son los valores que incluyen alfa en las dos colas y beta en la cola inferior de la distribución normal estándar de acuerdo a lo descrito por Greenberg y cols. en 1998. σ^2 , μ_{τ} y μ_2 se estimaron con datos de un ensayo piloto. En todos los casos, se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar si existe o no una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Una vez determinado esto, se emplearán pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas de acuerdo con las suposiciones de cada análisis.

En todos los casos, se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar si existe o no una distribución normal utilizando la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Una vez determinado esto, se emplearon pruebas estadísticas paramétricas

ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Dunnett para el análisis de los valores de los ensayos bioquímicos.

6.4 Diseño experimental

Tres horas posteriores a la administración de MK801 los animales fueron sacrificados y decapitados. Se extrajo rápidamente el cerebro y se realizó cuidadosamente la disección de la corteza prefrontal para su posterior análisis.

6.5 Determinación de la concentración de glutatión reducido

Tres horas después de la administración del MK-801 los animales fueron sacrificados por decapitación (previa anestesia con pentobarbital sódico) y se realizó la disección de la corteza prefrontal. El estándar de GSH se preparó en fosfato de sodio 0.1 M y un buffer de EDTA 5 mM (pH 8) y se mantuvo en hielo hasta su uso. La solución de o-ftalaldehído (OPA) se preparó en metanol absoluto de grado reactivo justo antes de su uso. Las muestras se homogenizarán en 3.75 ml de buffer EDTA-fosfato (pH 8.0) más 1 ml de HPO₃ (25%). Los homogeneizados se centrifugaron a 3,000 x g durante 15 min y los sobrenadantes fueron separados. 500 µl de alícuotas de sobrenadante se agregaron a 4.5 ml de buffer de fosfato más 100 µl de o-ftalaldehído. Las muestras se incubarán a temperatura ambiente durante 15 minutos y sus señales fluorescentes se registrarán en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión ⁴⁸.

6.6 Ensayo de lipoperoxidación:

Se diseccionó la corteza prefrontal de los ratones para medir los productos fluorescentes solubles en lípidos (LFP), un índice de LP, utilizando la técnica descrita por Triggs y Willmore (1984) ⁽⁴⁹⁾ y modificado por Santamaría y Ríos (1993) ⁽⁵⁰⁾. Cada fragmento se homogeneizó en 3 ml de solución salina (NaCl al 0,9%). Se añadieron alícuotas de un mililitro del homogeneizado a 4 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2: 1, v / v). Después de agitar, la mezcla se enfrió con hielo durante 30 min para permitir la separación de fases y se midió la fluorescencia de la capa de cloroformo en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B a 370 nm (excitación) y 430 nm (emisión). La sensibilidad del espectrofotómetro se ajustó a 150 unidades de fluorescencia con una solución estándar de quinina (0,1 g / ml). Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia / g de tejido. La significación estadística de las diferencias en LP entre grupos se determinó mediante análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, utilizando el software SPSS.

7.0. Resultados

7.1 Participación del estrés oxidativo y niveles de glucosa sérica

Para analizar la participación del estrés oxidativo y niveles de glucosa sérica tres horas después de la administración del MK-801, se tomaron muestras de sangre mediante tiras reactivas en cada uno de los grupos.

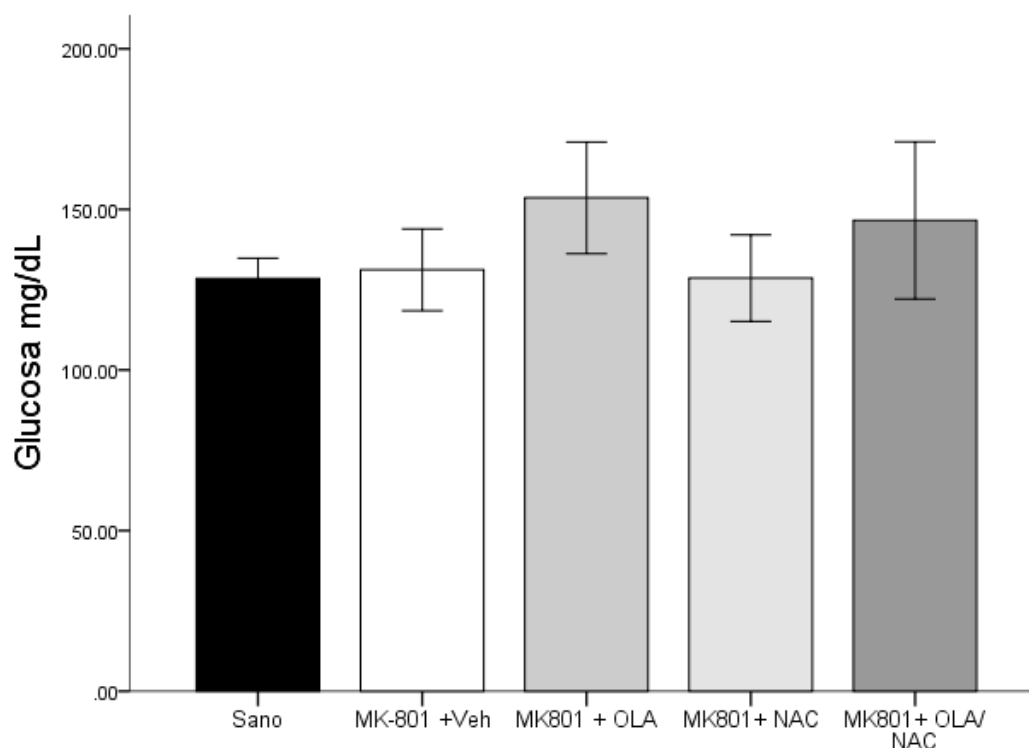


Figura 3. Grafica en la que se muestran los resultados obtenidos de los niveles de glucosa sérica. Los valores son el promedio \pm error estándar de 4 a 5 animales por grupo y están expresados en miligramos de glucosa por decilitro. Sano: animales intactos, MK-801+Veh: animales con MK801 y vehículo, MK801+OLZ: ratones con MK801 y olanzapina a una dosis de 4 mg/Kg (i.p.) cada 12 h horas durante 14 días, MK801+NAC: ratones con MK801 más N acetil cisteína 80 mg/kg (i.p.) cada 24 horas, por 14 días y MK801+ OLA/NAC: animales MK801 y con ambos tratamientos a las mismas dosis antes mencionadas. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

Se observó una tendencia al aumento en el grupo de ratones que recibió tratamiento únicamente con olanzapina, así como una tendencia a la baja de glucosa en los ratones que recibieron la combinación de OLA/NAC.

7.2 Niveles de peroxidación lipídica:

Para medir los niveles de peroxidación lipídica, tres horas después de la administración del MK-801 se tomó una muestra de corteza prefrontal en cada ratón para medir las concentraciones de los productos finales de la peroxidación lipídica en el tejido cerebral.

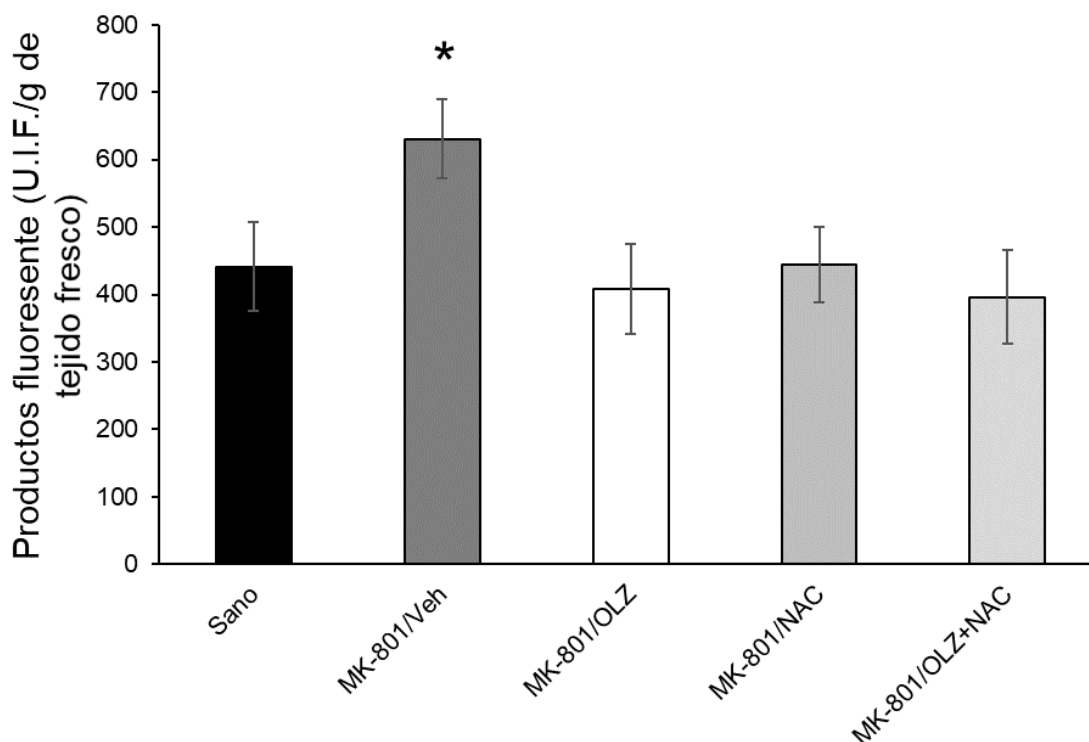


Figura 4. Grafica en la que se muestran los resultados obtenidos de los niveles de peroxidación lipídica evaluados en la corteza pre frontal. Los valores son el promedio \pm error estándar de 5 a 6 animales por grupo y están expresados en unidades internacionales de fluorescencia (U.I.F.) por gramo de tejido fresco. Sano: animales intactos, MK-801+Veh: animales con MK801 y vehículo, MK801+OLZ: ratones con MK801 y olanzapina a una dosis de 4 mg/Kg (i.p.) cada 12 h horas durante 14 días, MK801+NAC: ratones con MK801 más N acetil cisteína 80 mg/kg (i.p.) cada 24 horas, por 14 días y MK801+ OLA/NAC: animales MK801 y con ambos tratamientos a las mismas dosis antes mencionadas. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$

Se observó que los ratones que recibieron el tratamiento tanto con Olanzapina, con NAC y con la combinación OLA-NAC, presentaron una disminución en los niveles de peroxidación lipídica con una diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo control ($P < 0.05$).

7.3 Niveles de Glutación reducido:

Para medir los niveles de glutación reducido, tres horas después de la administración del MK-801 se tomó una muestra de corteza prefrontal en cada ratón para establecer las concentraciones de glutación reducido presentes en el tejido cerebral.

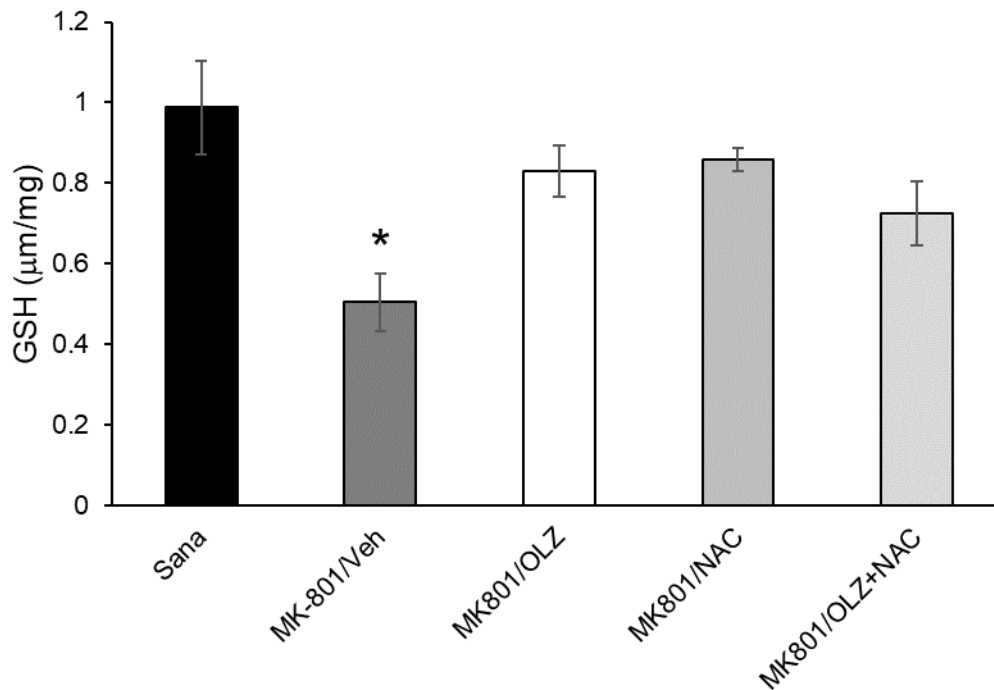


Figura 5. Grafica en la que se muestran los resultados obtenidos de los niveles de glutación reducido (GSH) evaluados en la corteza pre frontal. Los valores son el promedio \pm error estándar de 5 a 6 animales por grupo y están expresados en micro moles por miligramos. Sano: animales intactos, MK-801+Veh: animales con MK801 y vehículo, MK801+OLZ: ratones con MK801 y olanzapina a una dosis de 4 mg/Kg (i.p.) cada 12 h horas durante 14 días, MK801+NAC: ratones con MK801 más N acetil cisteína 80 mg/kg (i.p.) cada 24 horas, por 14 días y MK801+ OLA/NAC: animales MK801 y con ambos tratamientos a las mismas dosis antes mencionadas. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$

Se observó que el tratamiento tanto con Olanzapina como con NAC y con la combinación OLA-NAC, aumentaron el glutatión en el tejido cerebral con una diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo control ($P < 0.05$).

8.0. Discusión

Como se mencionó previamente, la hipofunción en los receptores de glutamato NMDA es una de las teorías que en los últimos años ha tomado mayor importancia respecto a la posible etiopatogénesis de la esquizofrenia. En este estudio, se eligió la administración aguda de MK-801 como un el modelo de esquizofrenia en ratones, debido a que este fármaco produce un estado de hipofunción en los receptores de NMDA en ratones que hipotéticamente es análogo al que ocurre en pacientes con esquizofrenia⁶.

En un estudio realizado en pacientes con esquizofrenia y trastorno afectivo bipolar, se encontró una notable disminución en los niveles séricos de GSH en comparación con los controles, además se encontró una asociación entre la disminución de estos niveles con la magnitud de los síntomas psicóticos⁽⁵¹⁾. Por otro lado, se han reportado disminuciones significativas hasta de un 27% ($p < 0.05$) del GSH total en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia sin tratamiento farmacológico en comparación con los controles. Además, por medio de espectroscopia por resonancia magnética se ha detectado que los niveles de GSH en la corteza prefrontal medial eran hasta 52% ($p < 0.0012$) más bajos que los controles⁽⁵²⁾.

En pacientes con esquizofrenia, se ha observado que la administración de NAC oral, incrementa los niveles de cisteína plasmática, reponiendo los niveles de GSH y previniendo de esta manera el agotamiento de GSH cerebral. En un ensayo en donde se administraron 2 gr. de NAC al día en pacientes que recibían tratamiento con distintos antipsicóticos; principalmente clozapina y olanzapina, se observó una mejoría significativa ($p = 0.007$) en la gravedad clínica, de acuerdo a la escala de impresión clínica global (CGI) desde el inicio del tratamiento adyuvante con NAC en comparación con los controles, así como una mejoría significativa en las escalas de síntomas positivos y negativos (PANSS) en el componente total, general y negativo, mas no en la sintomatología positiva. El tratamiento con NAC también se asoció con una mejoría en la acatisia ($p = .022$)⁽⁵³⁾. Estos resultados han sido replicados en otros ensayos controlados, aleatorizados y con placebo que han comprobado la efectividad de la NAC en combinación con otros antipsicóticos atípicos como clozapina y risperidona^{(54) (55)}. Por otro lado, se reportó que en un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, de pacientes con esquizofrenia crónica en

tratamiento con antipsicóticos convencionales que recibieron 1200mg de NAC como tratamiento adyuvante, los pacientes tratados con NAC mostraron mejoría significativa en la escala PANSS tanto para síntomas positivos como negativos y mejoría en el rendimiento cognitivo al presentar mejoría en áreas como atención, memoria de trabajo y de corto plazo, funcionamiento ejecutivo y velocidad de procesamiento ⁽⁵⁶⁾.

En nuestro estudio, la administración de MK801 en los ratones que no recibieron tratamiento con antipsicótico, antioxidante, o la combinación de ambos, presentaron una disminución estadísticamente significativa del glutatión reducido, así como un incremento de la peroxidación lipídica a nivel de la corteza prefrontal lo que refleja estrés oxidativo y por consiguiente daño celular a este nivel. Por lo tanto, el tratamiento con Olanzapina y con NAC administrados solos o en combinación reducen los niveles de peroxidación lipídica e incrementan los niveles de GSH, regulando posiblemente el daño oxidativo propio de esta enfermedad. Lo anterior nos orienta a que la NAC podría ser un tratamiento adyuvante principalmente en pacientes con un curso crónico de esta enfermedad.

Los resultados de este protocolo de investigación apoyan la teoría existente relacionada al papel del estrés oxidativo y por consiguiente de la apoptosis neuronal en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia. Nuestros resultados podrían reforzar la posible modificación de los esquemas actuales de tratamiento para este grupo de pacientes, brindando una oportunidad de mejoría para el importante porcentaje de pacientes que no presentan respuesta a los esquemas de tratamiento farmacológico convencionales.

9. Conclusiones

1. La administración del tratamiento con la combinación de OLA y NAC, podría representar una opción terapéutica para pacientes con psicosis crónica o inclusive para pacientes considerados como resistentes al tratamiento.
2. Se podrían reducir los efectos secundarios metabólicos que limitan el uso de olanzapina como el incremento de la glucosa sérica.
3. Podría representar un tratamiento para la mejoría de los síntomas cognitivos para los cuales actualmente no existe un tratamiento.

4. Sin embargo, se requieren más estudio que demuestren el beneficio del tratamiento combinado de OLZ y NAC y así poder considerarse como tratamiento en pacientes con esquizofrenia.

10. Referencias

1. Charlson FJ, Ferrari AJ, Santomauro DF, Diminic S, Stockings E, Scott JG, et al. Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016. *Schizophr Bull.* 17 de octubre de 2018;44(6):1195-203.
2. McCutcheon RA, Marques TR, Howes OD. Schizophrenia—An Overview. *JAMA Psychiatry.* 1 de febrero de 2020;77(2):201-10.
3. Laursen TM, Nordentoft M, Mortensen PB. Excess Early Mortality in Schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol.* 28 de marzo de 2014;10(1):425-48.
4. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis - *The Lancet Psychiatry* [Internet]. [citado 6 de abril de 2020]. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lanpsy/article/PIIS2215-0366\(17\)30078-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanpsy/article/PIIS2215-0366(17)30078-0/fulltext)
5. Charlson FJ, Baxter AJ, Dua T, Degenhardt L, Whiteford HA, Vos T. Excess mortality from mental, neurological and substance use disorders in the Global Burden of Disease Study 2010. *Epidemiol Psychiatr Sci.* abril de 2015;24(2):121-40.
6. Aquino-Miranda G, Rivera-Ramírez N, Márquez-Gómez R, Escamilla-Sánchez J, González-Pantoja R, Ramos-Languren L-E, et al. Histamine H3 receptor activation reduces the impairment in prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle response and Akt phosphorylation induced by MK-801 (dizocilpine), antagonist at N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30 de 2019;94:109653.
7. Nakazawa K, Sapkota K. The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Pharmacol Ther.* 2020;205:107426.
8. Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science.* 30 de abril de 1976;192(4238):481-3.

9. Slifstein M, van de Giessen E, Van Snellenberg J, Thompson JL, Narendran R, Gil R, et al. Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia: a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA Psychiatry*. abril de 2015;72(4):316-24.
10. Miller EK, Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:167-202.
11. Hoffman P. The meaning of 'life' and other abstract words: Insights from neuropsychology. *J Neuropsychol*. 2016;10(2):317-43.
12. Kaar SJ, Natesan S, McCutcheon R, Howes OD. Antipsychotics: Mechanisms underlying clinical response and side-effects and novel treatment approaches based on pathophysiology. *Neuropharmacology*. 1 de agosto de 2020;172:107704.
13. Vaquero-Baez M, Díaz-Ruiz A, Tristán-López L, Aviña-Cervantes C, Torner C, Ramírez-Bermúdez J, et al. Clozapine and desmethylclozapine: correlation with neutrophils and leucocytes counting in Mexican patients with schizophrenia. *BMC Psychiatry*. 9 de octubre de 2019;19(1):295.
14. Lowe P, Krivoy A, Porffy L, Henriksdottir E, Eromona W, Shergill SS. When the drugs don't work: treatment-resistant schizophrenia, serotonin and serendipity. *Ther Adv Psychopharmacol*. 1 de enero de 2018;8(1):63-70.
15. Komossa K, Rummel-Kluge C, Hunger H, Schmid F, Schwarz S, Duggan L, et al. Olanzapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2010 [citado 13 de mayo de 2020];(3). Disponible en: <https://www-cochranelibrary-com.pbidi.unam.mx:2443/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD006654.pub2/full>
16. Fulton B, Goa KL. Olanzapine: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in the Management of Schizophrenia and Related Psychoses. *Drugs*. febrero de 1997;53(2):281-98.
17. Barbosa L, Bernardo M. Utilización de olanzapina en el tratamiento de la esquizofrenia y el trastorno bipolar. *Psiquiatr Biológica*. enero de 2016;23(1):4-22.
18. Atmaca M, Kuloglu M, Ustundag B. Serum Leptin and Triglyceride Levels in Patients on Treatment With Atypical Antipsychotics. *J Clin Psychiatry*. 15 de mayo de 2003;64(5):598-604.
19. Abdul-Monim Z, Reynolds GP, Neill JC. The effect of atypical and classical antipsychotics on sub-chronic PCP-induced cognitive deficits in a reversal-learning paradigm. *Behav Brain Res*. mayo de 2006;169(2):263-73.
20. Goetghebeur P, Dias R. Comparison of haloperidol, risperidone, sertindole, and modafinil to reverse an attentional set-shifting impairment following subchronic PCP administration in the rat—a back translational study. *Psychopharmacology (Berl)*. enero de 2009;202(1-3):287-93.

21. Song JC, Seo MK, Park SW, Lee JG, Kim YH. Differential Effects of Olanzapine and Haloperidol on MK-801-induced Memory Impairment in Mice. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 31 de agosto de 2016;14(3):279-85.
22. Liu X, Li J, Guo C, Wang H, Sun Y, Wang H, et al. Olanzapine Reverses MK-801-Induced Cognitive Deficits and Region-Specific Alterations of NMDA Receptor Subunits. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2018 [citado 13 de mayo de 2020];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2017.00260/full>
23. Park SW, Lee CH, Cho HY, Seo MK, Lee JG, Lee BJ, et al. Effects of antipsychotic drugs on the expression of synaptic proteins and dendritic outgrowth in hippocampal neuronal cultures. *Synap N Y N*. mayo de 2013;67(5):224-34.
24. Reddy NR, Krishnamurthy S. Repeated olanzapine treatment mitigates PTSD like symptoms in rats with changes in cell signaling factors. *Brain Res Bull*. 1 de junio de 2018;140:365-77.
25. Wang H, Xu H, Dyck LE, Li X-M. Olanzapine and quetiapine protect PC12 cells from β -amyloid peptide₂₅₋₃₅-induced oxidative stress and the ensuing apoptosis. *J Neurosci Res*. 2005;81(4):572-80.
26. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci*. 1 de marzo de 2011;36(2):78-86.
27. Scalley RD, Conner CS. Acetaminophen poisoning: a case report of the use of acetylcysteine. *Am J Hosp Pharm*. agosto de 1978;35(8):964-7.
28. Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther*. 1 de diciembre de 2008;8(12):1955-62.
29. Deepmala, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 1 de agosto de 2015;55:294-321.
30. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav*. marzo de 2014;4(2):108-22.
31. Quintavalle C, Donnarumma E, Fiore D, Briguori C, Condorelli G. Therapeutic strategies to prevent contrast-induced acute kidney injury. *Curr Opin Cardiol*. noviembre de 2013;28(6):676-82.
32. Dekhuijzen PNR. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1 de abril de 2004;23(4):629-36.
33. Rosa SCD, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(10):915-29.

34. Geiler J, Michaelis M, Naczk P, Leutz A, Langer K, Doerr H-W, et al. N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochem Pharmacol*. 1 de febrero de 2010;79(3):413-20.
35. Berk M, Ng F, Dean O, Dodd S, Bush AI. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends Pharmacol Sci*. 1 de julio de 2008;29(7):346-51.
36. Halliwell B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs Aging*. 1 de septiembre de 2001;18(9):685-716.
37. Andreatza AC, Frey BN, Valvassori SS, Zanotto C, Gomes KM, Comim CM, et al. DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 15 de agosto de 2007;31(6):1282-8.
38. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 13 de octubre de 2019;2019:e5080843.
39. Que X, Hung M-Y, Yeang C, Gonen A, Prohaska TA, Sun X, et al. Oxidized Phospholipids are Proinflammatory and Proatherogenic in Hypercholesterolemic Mice. *Nature*. junio de 2018;558(7709):301-6.
40. Meister A, Anderson ME. GLUTATHIONE. *Annu Rev Biochem*. 1 de junio de 1983;52(1):711-60.
41. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Gutknecht WF. Autoxidation versus Covalent Binding of Quinones as the Mechanism of Toxicity of Dopamine, 6-Hydroxydopamine, and Related Compounds toward C1300 Neuroblastoma Cells in Vitro. *Mol Pharmacol*. 1 de julio de 1978;14(4):644-53.
42. Wood SJ, Yücel M, Pantelis C, Berk M. Neurobiology of Schizophrenia Spectrum Disorders: The Role of Oxidative Stress. 2009;38(5):6.
43. Robertson OD, Coronado NG, Sethi R, Berk M, Dodd S. Putative neuroprotective pharmacotherapies to target the staged progression of mental illness. *Early Interv Psychiatry*. 2019;13(5):1032-49.
44. Kerksick C, Willoughby D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *J Int Soc Sports Nutr*. 1 de diciembre de 2005;2(2):38.
45. Rossell SL, Francis PS, Galletly C, Harris A, Siskind D, Berk M, et al. N-acetylcysteine (NAC) in schizophrenia resistant to clozapine: a double blind randomised placebo controlled trial targeting negative symptoms. *BMC Psychiatry*. diciembre de 2016;16(1):1-9.
46. Moylan S, Berk M, Dean OM, Samuni Y, Williams LJ, O'Neil A, et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? *Neurosci Biobehav Rev*. 1 de septiembre de 2014;45:46-62.

47. Smaga I, Pomierny B, Krzyżanowska W, Pomierny-Chamiolo L, Miszkiel J, Niedzielska E, et al. N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: Behavioral and biochemical analyses in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 3 de diciembre de 2012;39(2):280-7.
48. Diaz-Ruiz A, Alcaraz-Zubeldia M, Maldonado V, Salgado-Ceballos H, Mendez-Armenta M, Rios C. Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*. 2009 Mar 6;452(1):56-9.
49. Triggs WJ, Willmore LJ. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J Neurochem*. 1984 Apr;42(4):976-80.
50. Santamaría A, Ríos C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett*. 1993 Sep 3;159(1-2):51-4.
51. Nucifora LG, Tanaka T, Hayes LN, Kim M, Lee BJ, Matsuda T, et al. Reduction of plasma glutathione in psychosis associated with schizophrenia and bipolar disorder in translational psychiatry. *Transl Psychiatry*. agosto de 2017;7(8):e1215.
52. Berk M, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, et al. N-Acetyl Cysteine as a Glutathione Precursor for Schizophrenia—A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Biol Psychiatry*. 1 de septiembre de 2008;64(5):361-8.
53. Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Krüger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, et al. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci*. 2000;12(10):3721-8.
54. Farokhnia M, Azarkolah A, Adinehfar F, Khodaie-Ardakani M-R, Hosseini S-M-R, Yekehtaz H, et al. N-Acetylcysteine as an Adjunct to Risperidone for Treatment of Negative Symptoms in Patients With Chronic Schizophrenia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Clin Neuropharmacol*. diciembre de 2013;36(6):185–192.
55. Sepehrmanesh Z, Heidary M, Akasheh N, Akbari H, Heidary M. Therapeutic effect of adjunctive N-acetyl cysteine (NAC) on symptoms of chronic schizophrenia: A double-blind, randomized clinical trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 02 de 2018;82:289-96.
56. Dean OM, Mancuso SG, Bush AI, Copolov D, Do KQ, Cuénod M, et al. Benefits of adjunctive N-acetylcysteine in a sub-group of clozapine-treated individuals diagnosed with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 30 de diciembre de 2015;230(3):982-3.