



Revista Brasileira de Psiquiatria

RBP Psychiatry

Official Journal of the Brazilian Psychiatric Association
Volume 34 • Supplement 2 • October/2012



ARTICLE

Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis

João Paulo Maia-de-Oliveira,^{1,5,6} Clarissa Trzesniak,^{1,2,6} Irismar R. Oliveira,^{3,6} Matthew J. Kempton,² Tatiana M. N. de Rezende,^{1,6} Sandro Igo,³ Glen B. Baker,⁴ Serdar M. Dursun,⁴ João Paulo Machado-de-Sousa,¹ Jaime E. C. Hallak^{1,6}

¹ Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (National Institute for Science and Technology - INCT) Translational Medicine, Brazil

² Department of Psychosis Studies, Institute of Psychiatry, King's College London, UK

³ Affective Disorders Center, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador (BA), Brazil

⁴ Department of Psychiatry, University of Alberta, Edmonton, Canada

⁵ Department of Clinical Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil

⁶ Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences: NAPNA), Brazil

Received on October 7, 2011; accepted on February 29, 2012.

DESCRIPTORS

Nitric Oxide;
Schizophrenia;
Psychosis;
Plasma levels;
Serum levels;
Meta-analysis;
Systematic review.

Abstract

For the last 40 years, schizophrenia has been considered to be the result primarily of a dysfunction in brain dopaminergic pathways. In this review, it is described and discussed findings concerning nitric oxide-mediated neurotransmission in schizophrenia. Studies were searched in PubMed, SciELO, and LILACS using the terms *schizophrenia and nitric oxide plasma levels* or *nitric oxide serum levels*, with no time limit. The reference lists of selected articles were also hand-searched for additional articles. From 15 potential reports, 10 were eligible to be included in the review and meta-analysis. These studies included a total of 505 patients with schizophrenia and 339 healthy volunteers. No significant difference was found between patients and healthy controls regarding total nitrite plasma/serum levels (effect size $g = 0.285$, 95%CI = -0.205 to 0.774, $p = 0.254$). However, when studies with patients under antipsychotic treatment were examined separately, there was a significant difference between patients and healthy volunteers (effect size $g = 0.663$, 95%CI = 0.365 to 0.961, $p < 0.001$), showing that patients under treatment have higher levels of plasma/serum nitric oxide than controls. These results suggest that antipsychotics increase nitric oxide plasma/serum levels and that the nitric oxide pathway would be a fertile target for the development of new treatments for patients with schizophrenia.

Corresponding author: João Paulo Maia de Oliveira, Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Av. Tenente Catão Roxo, 2650, Ribeirão Preto, SP, Brazil. CEP: 14051-140. Phone: (+55 16) 3602.4607. Fax: (+55 16) 3602.4605. E-mail: j.p@usp.br

1516-4446 - ©2012 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

doi:10.1016/j.rbp.2012.07.001

Introduction

Schizophrenia is a devastating disorder that occurs in about 1% of the population throughout life. Individuals are usually affected somewhere between the end of adolescence and the beginning of adult life and the course of schizophrenia is chronic and debilitating.¹

For the last 40 years, schizophrenia was believed to be primarily the result of a dysfunction in brain dopaminergic pathways.² However, antipsychotic drugs that act as dopamine receptor antagonists have proven effective in treating only some of the symptoms of schizophrenia.

Recent research suggests that hypoactivity of a subtype of glutamatergic receptor, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, may be involved in schizophrenia.^{3,4} One of the pieces of evidence supporting this hypothesis comes from the psychotic syndrome produced by NMDA receptor antagonists. This pharmacological model is the one that best mimics schizophrenia symptoms, as it induces both the positive and negative symptoms commonly seen in the disorder.⁵⁻⁸ However, research on NMDA receptor agonists for the treatment of schizophrenia has produced inconsistent results⁹, possibly due to the development of rapid tolerance to these compounds secondary to down-regulation of NMDA receptors.¹⁰

Accordingly, researchers have suggested the possible implication of nitric oxide (NO) in the pathophysiology of schizophrenia and other psychiatry disorders, such as bipolar disorder and depression.^{11,12}

NO is a gas with a unique chemistry and has been shown to influence the release of neurotransmitters, learning, memory, and neurodevelopment. In addition, questions have been raised about whether NO plays an important role in the maturation of neurons and synaptogenesis. The activation of NMDA receptors by glutamate results in calcium influx into the cell, which binds to calmodulin and stimulates the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) enzyme to produce NO in the nervous system. NO activates guanylate cyclase, which increases the levels of the second messenger cyclic GMP (cyclic guanosine monophosphate). This "NMDA-NO-cyclic GMP pathway" has been demonstrated to modulate the release of neurotransmitters such as glutamate and dopamine. Although the direction of abnormalities in this pathway is still under debate, it has been repeatedly implicated in schizophrenia, and perhaps the development of drugs that act downstream NMDA receptors - on NO for instance - could circumvent the problem of the down-regulation of those receptors.¹²

In this review we describe empirical studies available in the literature that analyzed the role of NO in schizophrenia by examining NO plasma/serum levels in patients diagnosed with the condition.

Methods

The search was performed in the PubMed, SciELO, and LILACS databases using the keywords *schizophrenia* and *nitric oxide plasma levels* or *nitric oxide serum levels*, with no time limit. The reference lists of selected articles were also hand-searched for additional articles.

In order to be included in the analysis, studies had to meet the following criteria: 1) be published in any language; 2) include patients with schizophrenia diagnosed according

to DSM-IV-TR criteria; 3) have a comparison group of healthy subjects; 4) measure total nitrite plasma (or serum) levels to indirectly assess NO plasma levels.

Since NO is a very labile molecule and has a short half-life, the detection of NO in its native form is very difficult.¹³ In aqueous solution, NO reacts with molecular oxygen and accumulates in plasma/serum as nitrite (NO-2) and nitrate (NO-3) ions. These ions can be measured in biological fluids and have been used as correlates of NO levels.¹⁴ In most studies, plasma/serum NO metabolite levels are represented as total nitrite (nitrite + nitrate) after nitrate conversion to nitrite.¹⁵

Among the studies analyzed in this review, 80% investigated differences in total nitrite *plasma* levels between schizophrenia patients and healthy volunteers, while the remaining 20% investigated differences in total nitrite *serum* levels between the two groups. Given the considerable agreement concerning the equivalence between serum and plasma concentrations of certain drugs and assuming that the same is true for NO,¹⁶ we decided to analyze studies using plasma and serum as a single group.

Four studies measured patients' total nitrite levels at two different times - before and after antipsychotic treatment.¹⁷⁻²⁰ In these cases, we opted to work with measures obtained before antipsychotic treatment to ensure equivalence with the results of the remaining studies.

In order to select potentially relevant studies, three independent reviewers (JPMO, SI, CT) examined the abstracts identified in the literature search using the previously defined inclusion criteria. Disagreement at any stage was resolved by consensus. The studies included in the review are summarized in Table 1, which also describes the sociodemographic characteristics of the samples in each study.

Statistical analyses were performed with STATA 10.1 (StataCorp, College Station, Texas) using the METAN command. For each study, odds ratios and 95% confidence intervals were calculated. We used a random effects model that weighted the studies according to their inverse variance and provided the odds ratio and the corresponding confidence interval.

The between-study variability among the population effect sizes, i.e. heterogeneity, was assessed formally by applying Cochran's q test for homogeneity²¹ and informally by assessing a sample size independent descriptive measure of inconsistency I^2 .²² The I^2 index describes the percentage of the total variability in a set of effect sizes due to true heterogeneity, that is, between-study variability.²³ For example, a meta-analysis with $I^2 = 0$ means that all variability in effect size estimates is due to sampling error within studies. On the other hand, a meta-analysis with $I^2 = 50$ means that half of the total variability among effect sizes is caused not by sampling errors, but by true heterogeneity between studies. Higgins *et al.*²² proposed a tentative classification of I^2 values with the purpose of helping to interpret magnitude. Thus, percentages of around 25% ($I^2 = 25$), 50% ($I^2 = 50$), and 75% ($I^2 = 75$) would indicate low, medium, and high heterogeneity, respectively.

Publication bias

It was used Egger's regression test, which is a formal method of assessing publication bias,²⁴ implemented with the STATA function METABIAS.

Meta-regression

The effects of mean duration of illness on total nitrite plasma levels were assessed in a random effects meta-regression model by using the METAREG²⁵ command in STATA. The default option using residual maximum likelihood (REML) was selected.

Sensitivity analysis

To test how robust the results were to variations in the meta-analysis methodology, we examined the effect of excluding the two studies which evaluated NO serum levels instead of NO plasma levels.^{17,26}

Results

The search yielded 15 matches, of which 10 fulfilled the inclusion criteria for this meta-analysis. One study was excluded due to the presence of subjects with less than six months of disease duration. Based on the diagnostic criteria of DSM-IV TR, at least six months of illness are required for schizophrenia to be diagnosed.²⁷ Four articles were excluded because they measured levels of individual NO metabolites rather than total nitrite levels.²⁸⁻³¹ Thus, 10 studies provided comparative data from patients versus controls (Table 1).

Among the 10 studies analyzed in this review, all investigated differences in total nitrite plasma/serum levels between schizophrenia patients and healthy volunteers. The levels of plasma/serum total nitrite ranged from $3.37 \pm 2.27 \mu\text{mol/L}$ ²⁰ to $69.2 \pm 13.2 \mu\text{mol/L}$ ³² in healthy volunteers and from $1.85 \pm 0.70 \mu\text{mol/L}$ ²⁰ to $102.8 \pm 34.7 \mu\text{mol/L}$ ³² in patients with schizophrenia.

As shown in Figure 1, no significant difference was found between patients and healthy controls regarding total

nitrite plasma/serum concentrations (effect size $g = 0.285$, 95%CI = -0.205 to 0.774 , $p = 0.254$). Between-study heterogeneity ($I^2 = 90.8\%$, $Q = 98.22$, $p < 0.001$) was found, but there was no evidence of publication bias ($p = 0.466$). The meta-regression analysis showed a significant moderating effect of mean duration of illness (7 studies; $r = 0.153$; $p = 0.005$).

When studies with drug-free patients were evaluated separately (Figure 2), no significant difference was found between patients and healthy controls regarding total nitrite plasma/serum concentrations (effect size $g = -0.109$, 95%CI = -0.856 to 0.637 , $p = 0.774$). There was between-study heterogeneity ($I^2 = 90.7\%$, $Q = 43.01$, $p < 0.001$), but no evidence of publication bias ($p = 0.066$). The meta-regression analysis showed no effect of duration of illness (4 studies; $r = 0.147$; $p = 0.057$).

However, when we examined only the studies with patients under treatment (Figure 3), there was a significant difference between patients and healthy volunteers (effect size $g = 0.663$, 95%CI = 0.365 to 0.961 , $p < 0.001$), showing that patients under antipsychotic drug treatment have higher levels of plasma/serum total nitrite than controls. A moderate between-study heterogeneity ($I^2 = 56.0\%$, $Q = 9.10$, $p = 0.059$) was found and there was no evidence of publication bias ($p = 0.819$). The meta-regression analyses showed no significant interactions.

All the results of this meta-analysis remained the same when we excluded the two studies which worked with NO serum levels:^{17,26} all studies (effect size $g = 0.209$, 95%CI = -0.377 to 0.795 , $p = 0.484$); drug-free studies (effect size $g = -0.378$, 95%CI = -1.071 to 0.316 , $p = 0.286$); and under-treatment studies (effect size $g = 0.765$, 95%CI = 0.482 to 1.048 , $p = 0.000$).

Table 1 - Studies included in the meta-analysis

Reference	Subjects	N (M/F)	Duration of illness (years)	Antipsychotics	Mean age \pm SD (years)	Age at onset \pm SD (years)
Atmaca <i>et al.</i> ¹⁸	SZ	21 (14/7)	ND	No	30.4 \pm 7.8	ND
	CL	21 (14/7)			29.2 \pm 6.7	
Taneli <i>et al.</i> ¹⁷	SZ	20 (4/16)	1.2 \pm 1.0	No	26.8 \pm 8.5	23.4 \pm 2.9
	CL	20 (13/7)			25.5 \pm 5.8	
Akyol <i>et al.</i> ³⁶	SZ	100 (68/32)	10.0 \pm 6.9	Yes	34.29 \pm 9.39	24.3 \pm 7.2
	CL	51 (35/16)			35.49 \pm 10.69	
Zoroglu <i>et al.</i> ³⁷	SZ	82 (59/23)	12.1 \pm 8.9	Yes	33.64 \pm 11.08	ND
	CL	21 (15/6)			33.53 \pm 10.92	
Nakano <i>et al.</i> ²⁰	SZ	30 (18/12)	1.9 \pm 0.7	No	38.0 \pm 15.0	ND
	CL	30 (18/12)			41.0 \pm 19.0	
Yilmaz <i>et al.</i> ²⁶	SZ	66 (66/0)	12.1 \pm 10.0	Yes	33.6 \pm 11.0	22 \pm 9
	CL	28 (28/0)			34.4 \pm 12.0	
Lee <i>et al.</i> ¹⁹	SZ	55 (24/31)	5.6 \pm 5.2	DN	33.6 \pm 9.9	27.5 \pm 9.5
	CL	55 (24/31)			33.5 \pm 9.9	
Yanik <i>et al.</i> ³⁸	SZ	46 (36/10)	ND	Yes	34.0 \pm 11.8	ND
	CL	32 (22/10)			32.9 \pm 13.1	
Kim <i>et al.</i> ³⁹	SZ	45 (45/0)	4.3 \pm 5.4	DN	30.3 \pm 8.5	26.5 \pm 8.4
	CL	45 (45/0)			30.5 \pm 8.2	
Djordjević <i>et al.</i> ³³	SZ	40 (24/16)	ND	Yes	30.2 \pm 7.9	ND
	CL	36 (22/14)			29.8 \pm 5.8	

CL: controls; DN: Drug Naïve; F: female; M: male; N: number of subjects; ND: not described; SZ: schizophrenics.

Discussion

The neurobiology of schizophrenia is characterized by abnormalities in neurotransmission pathways including glutamate, GABA, and dopamine.^{3,33} The activation of glutamatergic NMDA receptors results in calcium influx into the cell, which stimulates nNOS to produce NO, which in turn activates guanylate cyclase resulting in increased production of cyclic

GMP. Dysfunction in this “NMDA-NO-cyclicGMP” pathway has been implicated in schizophrenia.^{34,35}

Because the direction of abnormalities in this pathway is still under debate, in this meta-analysis we tried to better understand the role of NO in patients with schizophrenia by investigating whether there were differences in its plasma/serum concentrations (as reflected by total nitrite) between subjects with schizophrenia and healthy controls.

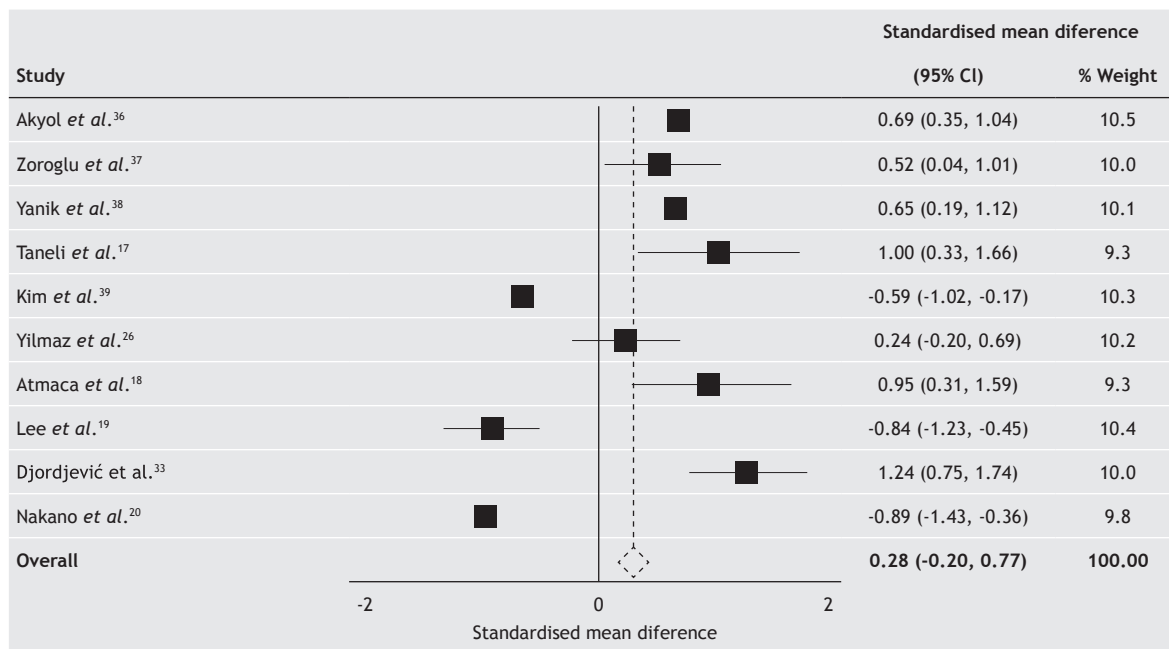


Figure 1 - Comparison of plasma/serum levels of total nitrite between schizophrenic patients and healthy controls in the 10 studies under investigation.

No significant difference was found between patients and healthy controls (effect size $g = 0.285$, 95%CI = -0.205 to 0.774, $p = 0.254$). Between-study heterogeneity was found ($I^2 = 90.8\%$, $Q = 98.22$, $p < 0.001$), but there was no evidence of publication bias ($p = 0.466$). The meta-regression analysis showed a significant moderating effect of mean duration of illness (7 studies; $r = 0.153$; $p = 0.005$).

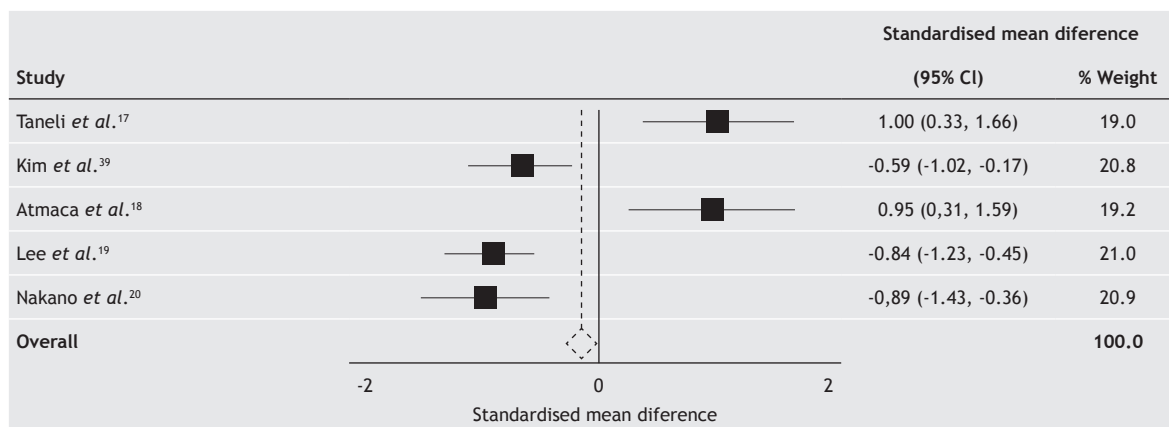


Figure 2 - Comparison of plasma/serum levels of total nitrite between drug-free schizophrenic patients and healthy controls. No significant difference was found between patients and healthy controls (effect size $g = -0.109$, 95% CI = -0.856 to 0.637, $p = 0.774$). Between-study heterogeneity was found ($I^2 = 90.7\%$, $Q = 43.01$, $p < 0.001$), but there was no evidence of publication bias ($p = 0.066$). The meta-regression analysis showed no effect of duration of illness (4 studies; $r = 0.147$; $p = 0.057$).

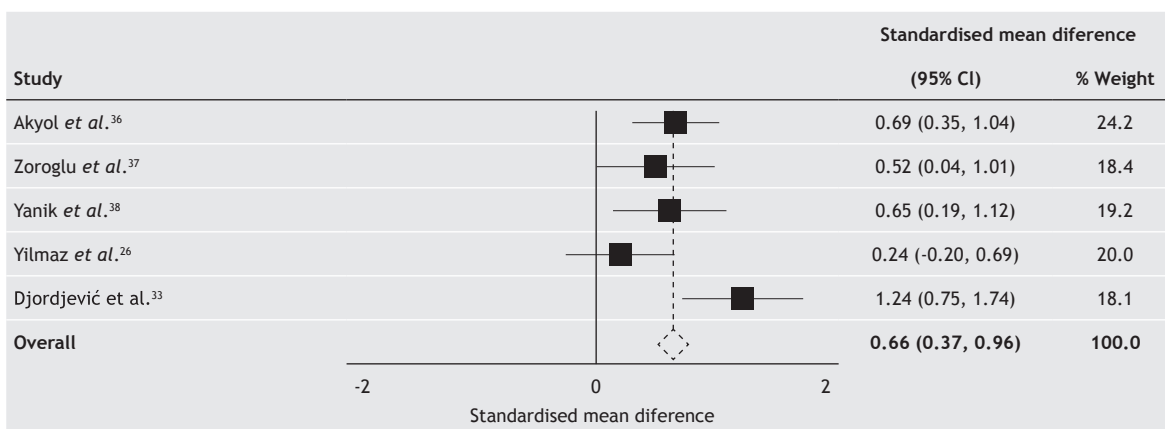


Figure 3 - Comparison of plasma/serum levels of total nitrite between schizophrenic patients receiving antipsychotics and healthy controls.

A significant difference between patients and healthy volunteers was found (effect size $g = 0.663$, 95%CI = 0.365 to 0.961, $p < 0.001$), showing that patients under medication treatment have higher levels of plasma NO than controls. A moderate between-study heterogeneity ($I^2 = 56.0\%$, $Q = 9.10$, $p = 0.059$) and no evidence of publication bias ($p = 0.819$) were found. The meta-regression analyses showed no significant interactions.

Among the 10 selected studies, there were no significant differences between patient groups and control groups regarding total nitrite plasma/serum levels. This finding may be explained by the presence of several studies with apparently contradictory results. Seven out of the 10 manuscripts found increased total nitrite levels in patients;^{17,18,26,32,36-38} while the remaining three found the opposite.^{1,9,20,39} Interestingly, all of these studies showed significant results. This is probably the reason why we detected between-study heterogeneity. Methodological variations across the studies may be the explanation for this discrepancy. For example, the duration of disease could be a relevant factor for the levels of NO, given the possible adaptive mechanisms related to the evolution of symptoms. Seven out of 10 studies made reference to the duration of disease in the patient group and the meta-regression analysis showed a significant moderating effect of mean duration of illness, showing a positive correlation between the latter and levels of NO. In this regard, there are two studies in the literature that measured NO metabolite levels during the first episode of schizophrenia. In 1996, Das *et al.* found low plasma nitrate levels in first-episode patients, and in 2004 Ramirez *et al.*⁴⁰ reported low concentrations of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid of first-episode patients.^{28,40} Studies with first-episode patients and a longitudinal design are likely to foster a greater understanding of the relationship between duration of illness and NO levels. For example, studies that measure NO serum levels could generate correlations between NO levels and different phases of schizophrenia.

The use of antipsychotics by patients may influence the results of these studies. When the five studies with drug-free patients were evaluated, no significant difference was found between patients and healthy controls regarding total nitrite plasma/serum concentrations. However, when we examined only the five studies with patients under antipsychotic treatment, a significant difference between patients and healthy

volunteers was found, showing that patients taking antipsychotics have higher levels of plasma/serum NO than controls. In 1996, Das *et al.* found decreased plasma nitrate levels in first-episode schizophrenic patients who were also drug naïve.²⁸ In addition, a study in which the patients spent a longer period without taking antipsychotic medication before the beginning of the trials (drug-free for at least four weeks) reported decreased total plasma nitrite levels in the patient group, and that six-week antipsychotic treatment with risperidone increased these levels in correlation with clinical response. Significant changes of nitrite plasma levels between baseline and the end of the treatment in the patient group were found and compared between the 37 responders to treatment ($\geq 30\%$ improvement in PANSS score) and the 18 non-responders to treatment. Among responders, total plasma nitrite levels after treatment significantly increased when compared to baseline. However, there were no significant changes among non-responders. The authors suggested that the improvement of psychiatric symptoms can lead to partial normalization of a deficiency in NO after treatment.¹⁹ Finally, three articles reported an increase in cerebrospinal fluid levels of cyclic GMP in patients with schizophrenia after treatment with antipsychotic drugs.⁴¹⁻⁴³ As observed previously, the mechanism of action of NO involves increases in cyclic GMP concentrations through the activation of soluble guanylate cyclase.

Although plasma and serum are not the same thing and the decision to analyze studies that quantified NO serum levels and NO plasma levels together could be regarded as generating a potential confounding factor in this study. Nonetheless, the sensitivity analyses indicated that this decision did not affect the main results of this meta-analysis. All the results of the meta-analysis remained the same when the two studies that evaluated NO serum levels were excluded.

It is essential that future studies be more careful in controlling for potential confounding factors that are known to be relevant in schizophrenia. In this regard, well-designed studies

must take into account variables such as disease duration and staging, schizophrenia subtype, tobacco use, and antipsychotic treatment.⁴⁴ Also, further studies should examine potential correlations between the intensity and quality of symptoms (as measured by scales like the PANSS), stage of disease, and plasma/serum levels of NO in schizophrenia patients.

Conclusion

High between-study heterogeneity was found and this could be responsible for the meta-analysis finding of no significant differences between the patient group and the control group regarding total nitrite plasma/serum levels. There were studies with apparently contradictory results and they could be divided into two groups: one group suggesting increased plasma/serum levels of total nitrites in patients when compared with healthy volunteers and another one supporting a possible decrease in such levels. It is thus likely that the results of one group were cancelled out by the results of the other.

One of the findings of this review was a positive correlation between the duration of disease and levels of NO. In other words, the longer the duration of the disease is, the greater the NO levels in patients. We speculate that this could be explained both by pathophysiological differences between the acute and chronic phases of schizophrenia as well as by the use of medications along the course of the disease.

Lastly, patients under antipsychotic treatment were found to have higher levels of NO metabolites than controls. This finding might be related to a possible stimulation of the nitric pathway by these drugs. It is believed that this pathway constitutes a fertile target for the development of new treatments for patients with schizophrenia.

Disclosures

João Paulo Maia-de-Oliveira

Employment: Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (National Institute for Science and Technology - INCT) Translational Medicine, Brazil; Department of Clinical Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil. **Other:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Clarissa Trzesniak

Employment: Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil; Department of Psychosis Studies, Institute of Psychiatry, King's College London, United Kingdom. **Other:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Irismar R. Oliveira

Employment: Affective Disorders Center, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador (BA), Brazil. **Other:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Matthew J. Kempton

Employment: Department of Psychosis Studies, Institute of Psychiatry, King's College London, United Kingdom.

Tatiana M. N. de Rezende

Employment: Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil. **Other:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Sandro Iego

Employment: Affective Disorders Center, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador (BA), Brazil.

Glen B. Baker

Employment: Department of Psychiatry, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Serdar M. Dursun

Employment: Department of Psychiatry, University of Alberta, Edmonton, Canada.

João Paulo Machado-de-Sousa

Employment: Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil.

Jaime E. C. Hallak

Employment: Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil. **Other:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

* Modest

** Significant

*** Significant. Amounts given to the author's institution or to a colleague for research in which the author has participation, not directly to the author.

References

- Peluso ET, Blay SL. Public stigma and schizophrenia in São Paulo city. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33(2):130-6.
- Meltzer HY, Stahl SM. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophrenia Bull.* 1976;12:19-76.
- Bressan RA, Pilowsky LS. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr.* 2003;25(3):177-83.
- Lindsley CW, Shipe WD, Wolkenberg SE *et al.* Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr Top Med Chem.* 2006;6:771-85.
- Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug-Sernyl. *Am Med Assoc Arch Neurol Psychiatry.* 1959;81:363-9.
- Al-Nuaimi S, Chaves C, Hallak JE, Baker GB, Dursun S. New perspectives and directions in schizophrenia therapeutics: advances related to non-dopaminergic systems. *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32:333-8.
- Toru M, Kuramaji A, Ishimaru M. Excitatory amino acids: implications for psychiatric disorders research. *Life Sci.* 1994;55:1683-99.
- Thornberg SA, Saklad SR. A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. *Pharmacotherapy.* 1996;16:82-93.
- Tuominen HJ, Tiihonen J, Wahlbeck K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res.* 2005;72:225-34.
- Nong Y, Huang YQ, Ju W, Kalia LV, Ahmadian G, Wang, YT *et al.* Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature.* 2003;422:302-7.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord.* 2008;111(2-3):135-44.
- Oliveira JP, Zuardi AW, Hallak JE. Role of nitric oxide in patients with schizophrenia - a systematic review of the literature. *Curr Psychiatry Rev.* 2008;4:219-27.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42.
- Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, Akyl O. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res.* 2000;28:360-3.
- Fiddler RM. Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. *J. AOAC (J Assoc Offic Anal Chem).* 1977;60:594.
- Saady JJ, Bloom VL, Narasimhachari N, Goldberg SC, Friedel RO. A comparison of plasma and serum levels of two tricyclic antidepressants: imipramine and desipramine. *Psychopharmacology (Berl).* 1981;75(2):173-4.
- Taneli F, Piridar S, Akdeniz F, Uyanik BS, Ari Z. Serum nitric oxide metabolite levels and the effect of antipsychotic therapy in schizophrenia. *Arch Med Res.* 2004;35:401-5.

18. Atmaca M, Tezcan E, Ustundag B. Plasma nitric oxide and leptin values in patients with olanzapine-induced weight gain. *J Psychiatr Res.* 2007;41(1-2):74-9.
19. Lee BH, Kim YK. Reduced plasma nitric oxide metabolites before and after antipsychotic treatment in patients with schizophrenia compared to controls. *Schizophr Res.* 2008;104:36-43.
20. Nakano Y, Yoshimura R, Nakano H, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Association between plasma nitric oxide metabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: a pilot study. *Hum Psychopharmacol Clin Exp.* 2010;25:139-44.
21. Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F. *Methods for meta-analysis in medical research.* New York: Wiley, 2000.
22. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ.* 2003;327:557-60.
23. Huedo-Medina TB, Sánchez-Meca J, Marín-Martínez F, Botella J. Assessing heterogeneity in meta-analysis: Q statistic or I² index? *Psychol Methods.* 2006;11(2):193-206.
24. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 1997;315(7109):629-34.
25. Sharp S. Metaanal regression. *Stata Tech Bull.* 1998;42:16-22.
26. Yilmaz N, Herken H, Cicek A, Celik A, Yurekli M, Akyol O. Increased levels of nitric oxide, cortisol and adrenomedullin in patients with chronic schizophrenia. *Med Princ Pract.* 2006;16(2):137-41.
27. Arinola OG, Idonije OB. Status of plasma nitric oxide and non-enzymatic antioxidants before and after antipsychotic treatment in Nigerian patients with schizophrenia. *J Res Med Sci.* 2009;14(1):37-42.
28. Das I, Khan NS, Puri BK, Hirsch SR. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neurosci Lett.* 1996;215(3):209-11.
29. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK *et al.* Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenic patients. *Psychopharmacology.* 2001;158:140-5.
30. Suzuki E, Nakaki T, Nakamura M, Miyaoka H. Plasma nitrate levels in deficit versus non-deficit forms of schizophrenia. *J Psychiatr Neurosci.* 2003;28:288-92.
31. Li HC, Chen QZ, Ma Y, Zhou JF. Imbalanced free radicals and antioxidant defense systems in schizophrenia: a comparative study. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(12):981-6.
32. Djordjević VV, Stojanović I, Stanković-Ferlez D, Ristić T, Lazarević D, Cosić V, Djordjević VB. Plasma nitrite/nitrate concentrations in patients with schizophrenia. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(1):89-94.
33. Thornberg SA, Saklad SR. A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. *Pharmacotherapy.* 1996;16:82-93.
34. Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophr Res.* 2005;78:69-86.
35. Oliveira JP, Lobão B, Machado-de-Sousa JP, Baker GB, Dursun S, Hallak JE. Targeting the NMDA receptor-nitric oxide-cyclic GMP pathway to develop non-dopaminergic antipsychotic medications for schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33:223-4.
36. Akyol O, Herken H, Uz E *et al.* The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002;26:995-1005.
37. Zoroglu SS, Herken H, Yurekli M *et al.* The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2002;36:309-15.
38. Yanik M, Vural H, Tutkun H *et al.* Is the arginine-nitric oxide pathway involved in the pathogenesis of schizophrenia? *Neuropsychobiology.* 2003;47:61-5.
39. Kim YK, Lee BH, Park SH. Decreased plasma nitric oxide metabolite levels in schizophrenia. *Psychiatry Invest.* 2006;3:57-62.
40. Ramirez J, Garnica R, Boll MC, Montes S, Rios C. Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study. *Schizophr Res.* 2004;68:357-61.
41. Ebstein RP, Biederman J, Rimon R, Zohar J, Belmaker RJ. Cyclic GMP in the CSF of patients with schizophrenia before and after neuroleptic treatment. *Psychopharmacology.* 1976;51:71-4.
42. Zimmer R, Teelken AW, Cramer H, Ackenheil M, Zandler KJ, Fischer H. Short - and long - term effects on GABA and dopamine neurons during treatment with sulphiride. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1980;24:537-9.
43. Gattaz WF, Carmer H, Beckmann H. Low CSF concentrations of cyclic GMP in schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 1983;142:288-91.
44. Pantelis C, Wood SJ, Velakoulis D, Testa R, Fontenelle LF, Yücel M. Should we redefine the concept of endophenotype in schizophrenia? *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32:106-7.



Revista Brasileira de Psiquiatria

RBP Psychiatry

Official Journal of the Brazilian Psychiatric Association
Volume 34 • Supplement 2 • October/2012



ARTIGO

Níveis plasmáticos/séricos do óxido nítrico em pacientes com esquizofrenia: uma revisão sistemática e metanálise

João Paulo Maia-de-Oliveira,^{1,5,6} Clarissa Trzesniak,^{1,2,6} Irismar R. Oliveira,^{3,6} Matthew J. Kempton,² Tatiana M. N. de Rezende,^{1,6} Sandro Igo,³ Glen B. Baker,⁴ Serdar M. Dursun,⁴ João Paulo Machado-de-Sousa,¹ Jaime E. C. Hallak^{1,6}

¹ Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Medicina Translacional, Brasil

² Departamento de Estudos sobre Psicose, Instituto de Psiquiatria, King's College, London, RU

³ Centro de Estudos e Tratamento dos Transtornos Afetivos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador (BA), Brasil

⁴ Departamento de Psiquiatria, University of Alberta, Edmonton, Canadá

⁵ Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brasil

⁶ Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Brasil

DESCRITORES:

Óxido nítrico;
Esquizofrenia;
Psicose;
Níveis plasmáticos;
Níveis séricos;
Metanálise;
Revisão sistemática.

Resumo

Durante os últimos 40 anos, a esquizofrenia foi considerada, principalmente, como o resultado de disfunções dopaminérgicas no cérebro. Esta revisão descreve e discute algumas descobertas sobre a neurotransmissão mediada pelo óxido nítrico na esquizofrenia. A busca foi feita nas bases PubMed, SciELO e LILACS usando-se os termos *schizophrenia* e *nitric oxide plasma levels* ou *nitric oxide serum levels*, sem limites de tempo. As listas de referências dos artigos selecionados foram examinadas em busca de outras publicações pertinentes. Dentre 15 artigos passíveis de serem incluídos, 10 preenchem os critérios estabelecidos para a revisão e metanálise. Esses estudos incluíram 505 pacientes com esquizofrenia e 339 voluntários saudáveis. Não foram encontradas diferenças significativas entre pacientes e voluntários saudáveis quanto aos níveis plasmáticos de nitrito total (*effect size* $g = 0,285$, IC 95% = $-0,205$ a $0,774$, $p = 0,254$). No entanto, o exame separado dos estudos envolvendo pacientes em tratamento antipsicótico apresentou diferenças significativas entre pacientes e voluntários saudáveis (*effect size* $g = 0,663$, IC 95% = $0,365$ to $0,961$, $p < 0,001$), demonstrando que pacientes em tratamento possuem níveis plasmáticos mais altos de óxido nítrico. Esses resultados sugerem que os antipsicóticos podem aumentar os níveis plasmáticos de óxido nítrico e que a via nitrérgica (e sua estimulação) constituiria um alvo propício para o desenvolvimento de novos tratamentos para pacientes com esquizofrenia.

Correspondência para: João Paulo Maia-de-Oliveira, Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Av. Tenente Catão Roxo, 2650, Ribeirão Preto, SP, Brasil. CEP: 14051-140. Telefone: (+55 16) 3602-4607. Fax: (+55 16) 3602-4605. E-mail: j.p@usp.br

1516-4446 - ©2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

doi:10.1016/j.rbp.2012.07.001

Introdução

A esquizofrenia é uma doença devastadora que atinge cerca de 1% da população ao longo da vida. Os indivíduos geralmente são afetados entre o fim da adolescência e o início da vida adulta e o curso da esquizofrenia é crônico e debilitante.¹

Pelos últimos 40 anos, a esquizofrenia vem sendo considerada, principalmente, o resultado de disfunções dopaminérgicas no cérebro.² No entanto, as drogas antipsicóticas que atuam como antagonistas dos receptores de dopamina tem se provado efetivas em tratar apenas alguns dos sintomas da esquizofrenia.

Pesquisas recentes sugerem que a hipoatividade de um subtipo do receptor glutamatérgico, o receptor N-metil-D-asparato (NMDA), pode estar envolvida na esquizofrenia.^{3,4} Uma das evidências em favor dessa hipótese advém da síndrome psicótica gerada pelos antagonistas do receptor NMDA. Esse modelo farmacológico é o que reproduz melhor os sintomas da esquizofrenia, uma vez que induz tanto sintomas positivos quanto negativos comumente observados na doença.⁵⁻⁸ No entanto, pesquisas sobre os agonistas do receptor NMDA para o tratamento da esquizofrenia tem produzido resultados inconsistentes,⁹ consequência do *down-regulation* dos receptores NMDA.¹⁰

Dessa forma, pesquisadores têm sugerido a possível implicação do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia da esquizofrenia e de outras doenças psiquiátricas, tais como o transtorno bipolar e a depressão.^{11,12}

O NO é um gás com uma química singular, que teve comprovada a influência sobre a liberação de neurotransmissores, a aprendizagem, a memória e o neurodesenvolvimento. Além disso, surgiram questionamentos a respeito da importância do papel NO na maturação de neurônios e na sinaptogênese. A ativação dos receptores NMDA pelo glutamato resulta em influxo do cálcio na célula, que se liga à calmodulina e estimula a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) a produzir NO no sistema nervoso. O NO ativa a guanilato ciclase, que eleva os níveis do segundo mensageiro, o GMP cíclico (monofosfato guanosina cíclico). Demonstrou-se que essa “via NMDA-NO-GMP cíclico” modula a liberação de neurotransmissores, tais como o glutamato e a dopamina. Embora a direção das anormalidades nessa via ainda esteja sendo debatida, ela tem sido repetidamente implicada na esquizofrenia e talvez o desenvolvimento de drogas que atuem mais adiante aos receptores NMDA - como no NO, por exemplo - possa evitar o problema de *down-regulation* desses receptores.¹²

Nesta revisão são descritos estudos empíricos disponíveis na literatura que analisaram o papel de NO na esquizofrenia ao examinar os níveis plasmáticos/séricos do NO em pacientes diagnosticados com esse transtorno.

Métodos

A busca foi feita nas bases PubMed, SciELO e LILACS usando-se os termos *schizophrenia* e *nitric oxide plasma levels* ou *nitric oxide serum levels*, sem limites de tempo. As listas de referências dos artigos selecionados também foram examinadas em busca de outras publicações pertinentes.

Para serem incluídos na análise, os estudos deveriam atender aos seguintes critérios: 1) ser publicado em qualquer língua; 2) incluir pacientes com esquizofrenia diagnosticada

de acordo com os critérios de DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - fourth edition, text revision); 3) apresentar um grupo comparativo de sujeitos saudáveis; 4) medir os níveis plasmáticos (ou séricos) de nitrito total para avaliar indiretamente os níveis plasmáticos de NO.

Como a molécula de NO é muito instável e tem a meia vida curta, a detecção de NO em sua forma nativa é extremamente difícil.¹³ Em solução aquosa, o NO reage com o oxigênio molecular e se acumula no plasma/soro como os íons nitrito (NO-2) e nitrato (NO-3). Esses íons podem ser medidos em fluidos biológicos e têm sido usados como correlatos dos níveis de NO.¹⁴ Na maioria dos estudos, os níveis plasmáticos/séricos de metabólitos de NO são representados como nitrito total (nitrito + nitrato) após a conversão de nitrato em nitrito.¹⁵

Dentre os estudos analisados nesta revisão, 80% investigaram a diferença nos níveis *plasmáticos* de nitrito total entre pacientes com esquizofrenia e voluntários saudáveis, enquanto os 20% restantes investigaram as diferenças dos níveis *séricos* de nitrito total entre os dois grupos. Dada a considerável concordância quanto à equivalência entre as concentrações séricas e plasmáticas de certas drogas, e supondo que o mesmo é verdadeiro para NO,¹⁶ decidimos analisar estudos usando plasma e soro como um único grupo.

Quatro estudos mediram os níveis de nitrito total dos pacientes em dois momentos - antes e depois do tratamento com antipsicóticos.¹⁷⁻²⁰ Nesses casos, optou-se por trabalhar com as medidas obtidas antes do tratamento com antipsicóticos, de modo a garantir a equivalência aos resultados dos outros estudos.

Para selecionar estudos potencialmente relevantes, três revisores independentes, (JPMO, SI e CT) examinaram os resumos identificados na busca feita na literatura usando os critérios de inclusão previamente definidos. Discordâncias em qualquer estágio eram resolvidas através de consenso. Os estudos incluídos na revisão estão resumidos na Tabela 1, que também descreve as características sociodemográficas das amostras em cada estudo.

As análises estatísticas foram feitas com STATA 10.1 (StataCorp, College Station, Texas) usando o comando METAN. Para cada estudo, *odds ratios* e intervalos de confiança de 95% foram calculados. Foi usado um modelo de efeitos randômicos que classificou os estudos de acordo com suas variâncias inversas e gerou o *odds ratio* e o intervalo de confiança correspondente.

A variabilidade entre os estudos dentre os tamanhos de efeito da variabilidade total da população, isto é, a heterogeneidade, foi avaliada formalmente, por meio da aplicação do teste q de Cochran para a homogeneidade²¹ e, informalmente, por meio da avaliação da medida descritiva de inconsistência independente de tamanho da amostra I².²² O índice I² mostra a porcentagem da variabilidade total em um conjunto de da variabilidade total devida à verdadeira heterogeneidade, ou seja, a variabilidade entre os estudos.²³ Por exemplo, uma metanálise com I² = 0 significa que toda a variabilidade das estimativas do tamanho de efeito é devida ao erro de amostragem nos estudos. Por outro lado, uma metanálise com I² = 50 significa que metade da variabilidade total entre os tamanhos de efeito é causada não por erros de amostragem, mas por heterogeneidade verdadeira entre os estudos. Higgins *et al.*²² propuseram uma classificação

experimental dos valores de I2 com o propósito de auxiliar a interpretar magnitude. Assim, as porcentagens de cerca de 25% (I2 = 25), 50% (I2 = 50) e 75% (I2 = 75) indicariam baixa, média e alta heterogeneidade, respectivamente.

Viés de publicação

Foi usado o teste de regressão de Egger, que é um método formal para avaliar o viés de publicação,²⁴ implementado com a função METABIAS do STATA.

Metarregressão

Os efeitos da duração média da doença sobre os níveis plasmáticos de nitrito total foram avaliados de acordo com um modelo de metarregressão de efeitos randomizados usando o comando METAREG²⁵ do STATA. A opção padrão usando a máxima probabilidade residual (REML) foi selecionada.

Análise de sensibilidade

Para testar o quão expressivos eram os resultados em relação às variações na metodologia de metanálise, examinou-se o efeito de exclusão dos dois estudos que avaliaram os níveis séricos de NO em vez dos níveis plasmáticos de NO.^{17,26}

Resultados

A busca gerou artigos, dos quais 10 atendiam aos critérios para esta metanálise. Um estudo foi excluído por causa da presença de sujeitos que apresentavam a doença havia menos de seis meses. Com base nos critérios de diagnóstico de DSM-IV-TR, são necessários pelo menos seis meses de sintomas da doença para se diagnosticar a esquizofrenia.²⁷ Quatro artigos foram excluídos porque mediam níveis de

metabólitos individuais de NO, em vez dos níveis de nitrito total.²⁸⁻³¹ Assim, 10 estudos forneceram dados comparativos dos pacientes *versus* controles (Tabela 1).

Dentre os 10 estudos analisados nesta revisão, todos investigaram as diferenças quanto aos níveis plasmáticos/séricos de nitrito total entre pacientes com esquizofrenia e voluntários saudáveis. Os níveis plasmáticos/séricos de nitrito total variaram de $3,37 \pm 2,27 \mu\text{mol/L}^{20}$ a $69,2 \pm 13,2 \mu\text{mol/L}^{32}$ em voluntários saudáveis e de $1,85 \pm 0,70 \mu\text{mol/L}^{20}$ a $102,8 \pm 34,7 \mu\text{mol/L}^{32}$ em pacientes com esquizofrenia.

Conforme mostrado na Figura 1, não foi encontrada diferença significativa entre pacientes e controles saudáveis quanto às concentrações plasmáticas/sélicas de nitrito total (*effect size* $g = 0,285$, IC 95% = -0,205 para 0,774, $p = 0,254$). Foi encontrada heterogeneidade entre os estudos (I2 = 90,8%, $Q = 98,22$, $p < 0,001$), mas não houve indícios de viés de publicação ($p = 0,466$). A análise de metarregressão mostrou um efeito moderado significativo da duração média da doença (sete estudos; $r = 0,153$; $p = 0,005$).

Quando os estudos com pacientes sem uso de medicação foram avaliados separadamente (Figura 2), não foi encontrada diferença significativa entre pacientes e controles saudáveis quanto às concentrações plasmáticas/sélicas de nitrito total (*effect size* $g = -0,109$, IC 95% = -0,856 para 0,637, $p = 0,774$). Houve heterogeneidade entre os estudos (I2 = 90,7%, $Q = 43,01$, $p < 0,001$), mas não houve indícios de viés de publicação ($p = 0,066$). A análise da metarregressão não mostrou efeito de duração da doença (quatro estudos; $r = 0,147$; $p = 0,057$).

No entanto, quando examinamos apenas os estudos com pacientes em tratamento (Figura 3), houve diferença significativa entre os pacientes e os voluntários saudáveis (*effect size* $g = 0,663$, IC 95% = 0,365 para 0,961, $p < 0,001$), mostrando que os pacientes em tratamento com antipsicóticos

Tabela 1 - Estudos incluídos na metanálise

Referência	Sujeitos	N (M/F)	Duração da doença (anos)	Antipsicóticos	Idade média \pm DP (anos)	Idade do início da doença \pm DP (anos)
Atmaca <i>et al.</i> ¹⁸	SZ	21 (14/7)	ND	No	30,4 \pm 7,8	ND
	CL	21 (14/7)			29,2 \pm 6,7	
Taneli <i>et al.</i> ¹⁷	SZ	20 (4/16)	1,2 \pm 1,0	No	26,8 \pm 8,5	23,4 \pm 2,9
	CL	20 (13/7)			25,5 \pm 5,8	
Akyol <i>et al.</i> ³⁶	SZ	100 (68/32)	10,0 \pm 6,9	Yes	34,29 \pm 9,39	24,3 \pm 7,2
	CL	51 (35/16)			35,49 \pm 10,69	
Zoroglu <i>et al.</i> ³⁷	SZ	82 (59/23)	12,1 \pm 8,9	Yes	33,64 \pm 11,08	ND
	CL	21 (15/6)			33,53 \pm 10,92	
Nakano <i>et al.</i> ²⁰	SZ	30 (18/12)	1,9 \pm 0,7	No	38,0 \pm 15,0	ND
	CL	30 (18/12)			41,0 \pm 19,0	
Yilmaz <i>et al.</i> ²⁶	SZ	66 (66/0)	12,1 \pm 10,0	Yes	33,6 \pm 11,0	22 \pm 9
	CL	28 (28/0)			34,4 \pm 12,0	
Lee <i>et al.</i> ¹⁹	SZ	55 (24/31)	5,6 \pm 5,2	DN	33,6 \pm 9,9	27,5 \pm 9,5
	CL	55 (24/31)			33,5 \pm 9,9	
Yanik <i>et al.</i> ³⁸	SZ	46 (36/10)	ND	Yes	34,0 \pm 11,8	ND
	CL	32 (22/10)			32,9 \pm 13,1	
Kim <i>et al.</i> ³⁹	SZ	45 (45/0)	4,3 \pm 5,4	DN	30,3 \pm 8,5	26,5 \pm 8,4
	CL	45 (45/0)			30,5 \pm 8,2	
Djordjević <i>et al.</i> ³³	SZ	40 (24/16)	ND	Yes	30,2 \pm 7,9	ND
	CL	36 (22/14)			29,8 \pm 5,8	

CL: controles; VT: virgem de tratamento; F: feminino; M: masculino; N: número de sujeitos; ND: não descrito; SZ: esquizofrênicos.

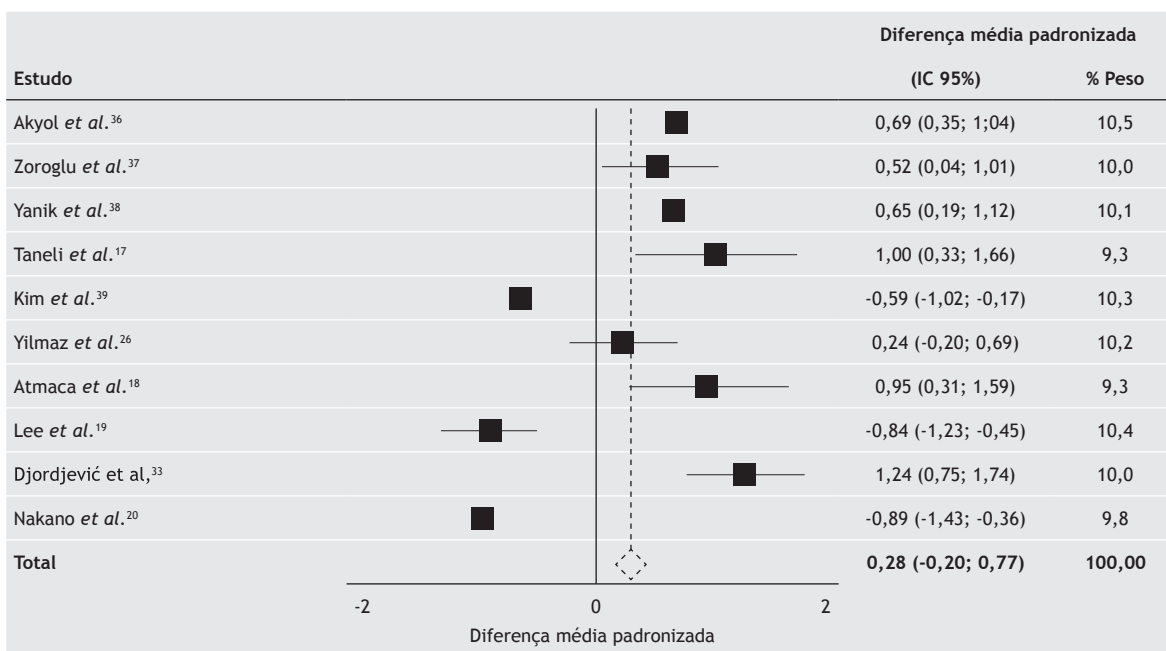


Figura 1 - Comparação dos níveis plasmáticos-séricos de nitrito total entre pacientes esquizofrênicos e controles saudáveis em 10 estudos sob investigação.

Não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes e os controles saudáveis (effect size $g = 0,285$, IC 95% = -0,205 para 0,774, $p = 0,254$). Foi verificada heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 90,8\%$, $Q = 98,22$, $p < 0,001$), mas não houve indícios de viés de publicação ($p = 0,466$). A análise de metarregressão mostrou um efeito moderado significativo da duração média da doença (sete estudos; $r = 0,153$; $p = 0,005$).

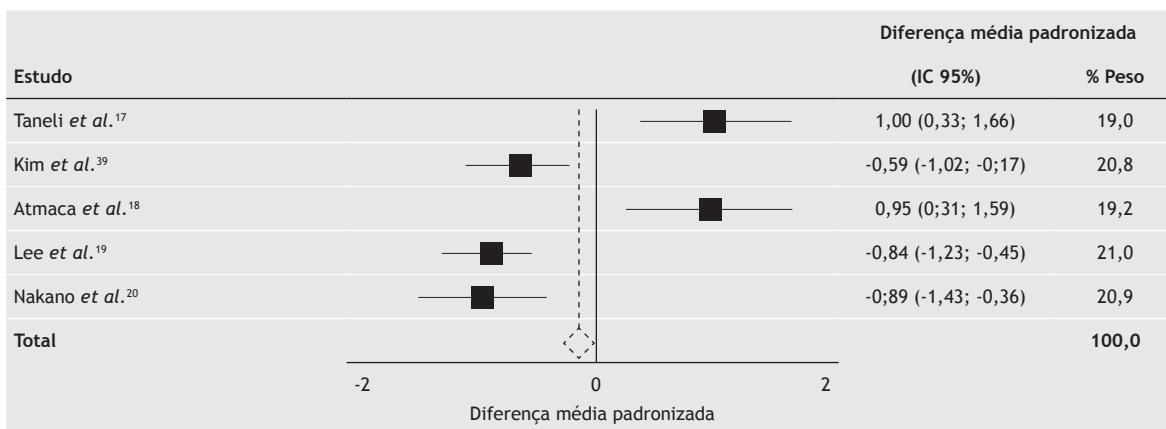


Figura 2 - Comparação dos níveis plasmáticos/séricos de nitrito total entre pacientes esquizofrênicos sem uso de medicação e controles saudáveis.

Não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes e os controles saudáveis (effect size $g = -0,109$, IC 95% = -0,856 para 0,637, $p = 0,774$). Foi verificada heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 90,7\%$, $Q = 43,01$, $p < 0,001$), mas não houve indício de viés de publicação ($p = 0,066$). A análise de metarregressão não mostrou efeito de duração da doença (quatro estudos $r = 0,147$; $p = 0,057$).

apresentam níveis plasmáticos/séricos de nitrito total mais altos do que os controles. Foi encontrada heterogeneidade moderada entre os estudos ($I^2 = 56,0\%$, $Q = 9,10$, $p = 0,059$) e não houve indício de viés de publicação ($p = 0,819$). As análises de metarregressão não mostraram interações significativas.

Todos os resultados desta metanálise permaneceram os mesmos quando foram excluídos os dois estudos que trabalharam com níveis séricos de NO:^{17,26} todos os estudos (effect size $g = 0,209$, IC 95% = -0,377 para 0,795, $p = 0,484$); estudos com indivíduos sem uso de medicação (effect size $g = -0,378$, IC 95% = -1,071 para 0,316, $p = 0,286$); e estudos

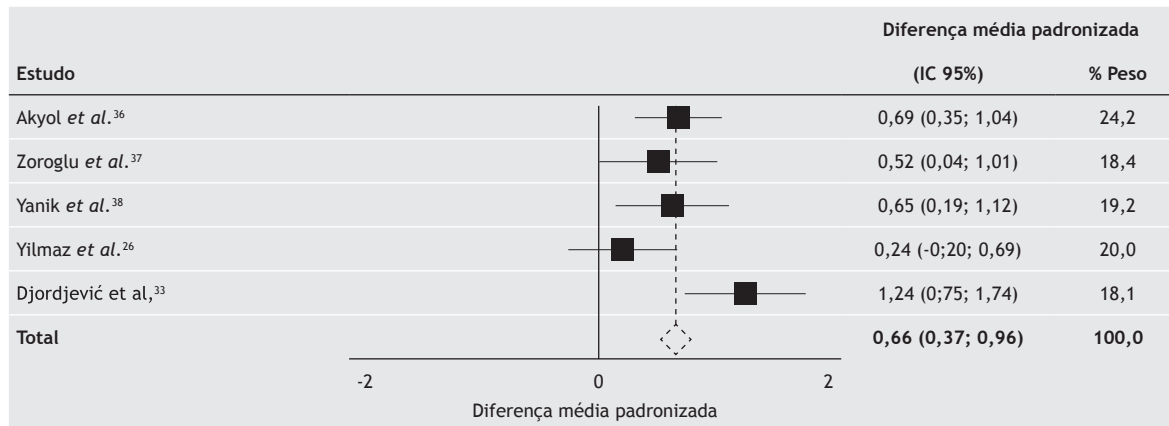


Figura 3 - Comparação dos níveis plasmáticos/séricos de nitrito total entre pacientes esquizofrênicos que recebem antipsicóticos e controles saudáveis.

Foi encontrada diferença significativa entre os pacientes e os voluntários saudáveis (effect size $g = 0,663$, (IC 95%) = 0,365 para 0,961, $p < 0,001$), o que mostra que pacientes em tratamento medicamentoso apresentam níveis plasmáticos mais altos de NO do que os controles. Foi verificada heterogeneidade moderada entre os estudos ($I^2 = 56,0\%$, $Q = 9,10$, $p = 0,059$) e não foi encontrado indício de viés de publicação ($p = 0.819$). As análises de metarregressão não mostraram interações significativas.

com indivíduos em tratamento (effect size $g = 0,765$, IC 95% = 0,482 para 1,048, $p = 0,000$).

Discussão

A neurobiologia da esquizofrenia é caracterizada por anormalidades em vias de neurotransmissão, incluindo o glutamato, GABA (ácido gama-aminobutírico) e dopamina.^{3,33} A ativação dos receptores NMDA resulta em influxo de cálcio na célula, que estimula a nNOS a produzir NO, que, por sua vez, ativa a guanilato ciclase, resultando em produção elevada de GMP cíclico. A disfunção na via “NMDA-NO-GMP cíclico” tem sido relacionada com a esquizofrenia.^{34,35}

Como a direção das anormalidades nessa via ainda está sendo debatida, nesta metanálise tentamos entender melhor o papel de NO em pacientes com esquizofrenia ao investigar se havia diferenças nas concentrações plasmáticas/séricas (como refletidas pelo nitrito total) entre indivíduos com esquizofrenia e controles saudáveis.

Dentre os 10 estudos selecionados, não houve diferenças significativas quanto aos níveis plasmáticos/séricos de nitrito total entre o grupo de pacientes e o grupo controle. Essa descoberta pode ser explicada pela presença de alguns estudos com resultados aparentemente contraditórios. Sete dos 10 manuscritos encontrados verificaram um aumento dos níveis de nitrito total em pacientes,^{17,18,26,32,36-38} enquanto os três restantes verificaram o oposto.^{1,9,20,39} É interessante observar que todos esses estudos mostraram resultados significativos. Provavelmente, esse é o motivo pelo qual foi detectada heterogeneidade entre os estudos. Variações metodológicas entre os estudos podem ser a explicação para essa discrepância. Por exemplo, a duração da doença poderia ser um fator relevante para os níveis de NO, dados os possíveis mecanismos adaptativos relacionados à evolução dos sintomas. Sete dos 10 estudos fizeram referência à duração da doença no grupo dos pacientes e a análise de metarregressão mostrou um efeito moderado significativo

da duração média da doença, apresentando uma correlação positiva entre essa e os níveis de NO. Sob esse aspecto, há dois estudos na literatura que mediram níveis metabólicos de NO durante o primeiro episódio de esquizofrenia. Em 1996 Das *et al.* verificaram baixos níveis plasmáticos de nitrato em pacientes em primeiro episódio, e em 2004 Ramirez *et al.*⁴⁰ relataram baixas concentrações de nitrito e nitrato no líquido cefalorraquidiano dos pacientes em primeiro episódio.^{28,40} Estudos com pacientes de primeiro episódio e com um delineamento longitudinal são propensos a favorecer um melhor entendimento da relação entre a duração da doença e os níveis de NO. Por exemplo, estudos que meçam os níveis séricos de NO poderiam gerar correlações entre os níveis de NO e as diferentes fases de esquizofrenia.

O uso de antipsicóticos por pacientes pode influenciar os resultados desses estudos. Quando os cinco estudos com pacientes sem uso de medicação foram avaliados, nenhuma diferença significativa quanto às concentrações plasmáticas/séricas de nitrito total foi encontrada entre os pacientes e os controles saudáveis. No entanto, quando examinamos apenas os cinco estudos com pacientes sob tratamento com antipsicóticos, foi encontrada uma diferença significativa entre os pacientes e os voluntários saudáveis, o que demonstra que pacientes que usam antipsicóticos têm níveis plasmáticos/séricos de NO mais altos do que os controles. Em 1996 Das *et al.* encontraram uma diminuição dos níveis plasmáticos de nitrato em pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia que também nunca haviam sido tratados.²⁸ Além disso, um estudo no qual os pacientes ficaram um período maior sem ingerir antipsicóticos antes do início dos testes (sem uso de medicamento por pelo menos quatro semanas) relatou uma diminuição dos níveis plasmáticos de nitrito total no grupo dos pacientes e que o tratamento com duração de seis semanas usando a risperidona como antipsicótico aumentou esses níveis com correlação na resposta clínica. Foram encontradas e comparadas alterações significativas dos níveis plasmáticos de nitrito entre o

período basal e o fim do tratamento no grupo de pacientes, entre 37 que responderam ao tratamento ($\geq 30\%$ de melhoria na pontuação da PANSS [*Positive and Negative Syndrome Scale*]) e os 18 que não responderam ao tratamento. Entre os que responderam, os níveis plasmáticos de nitrito total depois do tratamento aumentaram significativamente quando comparados à linha de base. No entanto, não houve alterações significativas entre os que não responderam. Os autores sugeriram que a melhora dos sintomas psiquiátricos pode ser devido à normalização parcial de uma deficiência de NO após o tratamento.¹⁹ Por fim, três artigos relataram um aumento dos níveis do líquido cefalorraquidiano do GMP cíclico em pacientes com esquizofrenia após o tratamento com antipsicóticos.⁴¹⁻⁴³ Conforme observado anteriormente, o mecanismo de ação de NO envolve o aumento das concentrações de GMP cíclico por meio da ativação de guanilato ciclase solúvel.

Como o plasma e o soro não são a mesma coisa, a decisão de analisar em conjunto os estudos que quantificaram os níveis séricos e plasmáticos de NO poderia gerar um fator de confusão neste estudo. Todavia, a análise de sensibilidade indicou que essa decisão não afetou os resultados principais desta metanálise. Todos os resultados da metanálise permaneceram os mesmos quando os dois estudos que avaliaram os níveis séricos de NO foram excluídos.

É fundamental que os futuros estudos sejam mais cuidadosos com o controle de possíveis fatores de confusão conhecidos por serem relevantes na esquizofrenia. Sob esse aspecto, estudos bem delineados devem levar em consideração variáveis como duração e estágio da doença, o sub-tipo de esquizofrenia, o uso de tabaco e o tratamento com antipsicóticos.⁴⁴ Ainda, novos estudos deveriam examinar possíveis correlações entre a intensidade e a qualidade dos sintomas (conforme medições em escalas como a PANSS), o estágio da doença e os níveis plasmáticos/séricos de NO em pacientes esquizofrênicos.

Conclusão

Foi encontrada elevada heterogeneidade entre os estudos, o que poderia ser responsável pela descoberta da metanálise de que não há diferenças significativas entre o grupo de pacientes e o grupo controle quanto aos níveis plasmáticos/séricos de nitrito total. Havia estudos que apresentavam resultados aparentemente contraditórios, que poderiam ser divididos em dois grupos: um sugerindo um aumento dos níveis plasmáticos/séricos de nitrito total em pacientes, quando comparados a voluntários saudáveis e um que apoia uma possível diminuição de tais níveis. É, portanto, provável que os resultados de um grupo tenham sido anulados pelos do outro.

Uma das descobertas desta revisão foi uma correlação positiva entre a duração da doença e os níveis de NO. Em outras palavras, quanto mais longa a doença, maiores são os níveis de NO nos pacientes. Especulamos que isso poderia ser explicado por diferenças fisiopatológicas entre as fases aguda e crônica da esquizofrenia, bem como pelo uso de medicações ao longo do curso da doença.

Finalmente, verificou-se que pacientes em tratamento com antipsicóticos apresentam níveis mais altos de metabólitos de NO do que os controles. Essa descoberta pode estar relacionada a um possível estímulo da via nitrérgica por essas

drogas. Acreditamos que essa via constitui um alvo propenso ao desenvolvimento de novos tratamentos para pacientes com esquizofrenia.

Declarações

João Paulo Maia-de-Oliveira

Local de trabalho: Departamento de Neurociências e Comportamento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Medicina Translacional, Brasil; Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brasil. **Outro:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Clarissa Trzesniak

Local de trabalho: Departamento de Neurociências e Comportamento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil; Departamento de Estudos sobre Psicose, Instituto de Psiquiatria, King's College, London, Reino Unido. **Outro:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Irismar R. Oliveira

Local de trabalho: Centro de Transtornos Afetivos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador (BA), Brasil. **Outro:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Matthew J. Kempton

Local de trabalho: Departamento de Estudos sobre Psicose, Instituto de Psiquiatria, King's College, London, Reino Unido.

Tatiana M. N. de Rezende

Local de trabalho: Departamento de Neurociências e Comportamento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil. **Outro:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Sandro Ilego

Local de trabalho: Centro de Transtornos Afetivos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador (BA), Brasil.

Glen B. Baker

Local de trabalho: Departamento de Psiquiatria, University of Alberta, Edmonton, Canadá.

Serdar M. Dursun

Local de trabalho: Departamento de Psiquiatria, University of Alberta, Edmonton, Canadá.

João Paulo Machado-de-Sousa

Local de trabalho: Departamento de Neurociências e Comportamento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Jaime E. C. Hallak

Local de trabalho: Departamento de Neurociências e Comportamento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil. **Outro:** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Neurociência Aplicada (NAPNA), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

* Modesta

** Significativa

*** Significativa. Montantes fornecidos à instituição do autor ou a colega para pesquisa na qual o autor tem participação, não diretamente ao autor.

Referências

1. Peluso ET, Blay SL. Public stigma and schizophrenia in São Paulo city. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33(2):130-6.
2. Meltzer HY, Stahl SM. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophrenia Bull.* 1976;12:19-76.
3. Bressan RA, Pilowsky LS. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr.* 2003;25(3):177-83.
4. Lindsley CW, Shipe WD, Wolkenberg SE *et al.* Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr Top Med Chem.* 2006;6:771-85.
5. Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug-Sernyl. *Am Med Assoc Arch Neurol Psychiatry.* 1959;81:363-9.
6. Al-Nuaimi S, Chaves C, Hallak JE, Baker GB, Dursun S. New perspectives and directions in schizophrenia therapeutics: advances related to non-dopaminergic systems. *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32:333-8.

7. Toru M, Kuramaji A, Ishimaru M. Excitatory amino acids: implications for psychiatric disorders research. *Life Sci.* 1994;55:1683-99.
8. Thornberg SA, Saklad SR. A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. *Pharmacotherapy.* 1996;16:82-93.
9. Tuominen HJ, Tiihonen J, Wahlbeck K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res.* 2005;72:225-34.
10. Nong Y, Huang YQ, Ju W, Kalia LV, Ahmadian G; Wang, YT *et al.* Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature.* 2003;422:302-7.
11. Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord.* 2008;111(2-3):135-44.
12. Oliveira JP, Zuairi AW, Hallak JE. Role of nitric oxide in patients with schizophrenia - a systematic review of the literature. *Curr Psychiatry Rev.* 2008;4:219-27.
13. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42.
14. Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, Akyol O. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res.* 2000;28:360-3.
15. Fiddler RM. Collaborative study of modified AOAC method of analysis for nitrite in meat and meat products. *J. AOAC (J Assoc Offic Anal Chem).* 1977;60:594.
16. Saady JJ, Bloom VL, Narasimhachari N, Goldberg SC, Friedel RO. A comparison of plasma and serum levels of two tricyclic antidepressants: imipramine and desipramine. *Psychopharmacology (Berl).* 1981;75(2):173-4.
17. Taneli F, Piridar S, Akdeniz F, Uyanik BS, Ari Z. Serum nitric oxide metabolite levels and the effect of antipsychotic therapy in schizophrenia. *Arch Med Res.* 2004;35:401-5.
18. Atmaca M, Tezcan E, Ustundag B. Plasma nitric oxide and leptin values in patients with olanzapine-induced weight gain. *J Psychiatr Res.* 2007;41(1-2):74-9.
19. Lee BH, Kim YK. Reduced plasma nitric oxide metabolites before and after antipsychotic treatment in patients with schizophrenia compared to controls. *Schizophr Res.* 2008;104:36-43.
20. Nakano Y, Yoshimura R, Nakano H, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Association between plasma nitric oxide metabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: a pilot study. *Hum Psychopharmacol Clin Exp.* 2010;25:139-44.
21. Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F. *Methods for meta-analysis in medical research.* New York: Wiley, 2000.
22. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ.* 2003;327:557-60.
23. Huedo-Medina TB, Sánchez-Meca J, Marín-Martínez F, Botella J. Assessing heterogeneity in meta-analysis: Q statistic or I² index? *Psychol Methods.* 2006;11(2):193-206.
24. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 1997;315(7109):629-34.
25. Sharp S. Meta-anal regression. *Stata Tech Bull.* 1998;42:16-22.
26. Yilmaz N, Herken H, Cicek A, Celik A, Yurekli M, Akyol O. Increased levels of nitric oxide, cortisol and adrenomedullin in patients with chronic schizophrenia. *Med Princ Pract.* 2006;16(2):137-41.
27. Arinola OG, Idonije OB. Status of plasma nitric oxide and non-enzymatic antioxidants before and after antipsychotic treatment in Nigerian patients with schizophrenia. *J Res Med Sci.* 2009;14(1):37-42.
28. Das I, Khan NS, Puri BK, Hirsch SR. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neurosci Lett.* 1996;215(3):209-11.
29. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK *et al.* Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenic patients. *Psychopharmacology.* 2001;158:140-5.
30. Suzuki E, Nakaki T, Nakamura M, Miyaoka H. Plasma nitrate levels in deficit versus non-deficit forms of schizophrenia. *J Psychiatr Neurosci.* 2003;28:288-92.
31. Li HC, Chen QZ, Ma Y, Zhou JF. Imbalanced free radicals and antioxidant defense systems in schizophrenia: a comparative study. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(12):981-6.
32. Djordjević VV, Stojanović I, Stanković-Ferlez D, Ristić T, Lazarević D, Cosić V, Djordjević VB. Plasma nitrite/nitrate concentrations in patients with schizophrenia. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(1):89-94.
33. Thornberg SA, Saklad SR. A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. *Pharmacotherapy.* 1996;16:82-93.
34. Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophr Res.* 2005;78:69-86.
35. Oliveira JP, Lobão B, Machado-de-Sousa JP, Baker GB, Dursun S, Hallak JE. Targeting the NMDA receptor-nitric oxide-cyclic GMP pathway to develop non-dopaminergic antipsychotic medications for schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33:223-4.
36. Akyol O, Herken H, Uz E *et al.* The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002;26:995-1005.
37. Zoroglu SS, Herken H, Yurekli M *et al.* The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2002;36:309-15.
38. Yanik M, Vural H, Tutkun H *et al.* Is the arginine-nitric oxide pathway involved in the pathogenesis of schizophrenia? *Neuropsychobiology.* 2003;47:61-5.
39. Kim YK, Lee BH, Park SH. Decreased plasma nitric oxide metabolite levels in schizophrenia. *Psychiatry Invest.* 2006;3:57-62.
40. Ramirez J, Garnica R, Boll MC, Montes S, Rios C. Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study. *Schizophr Res.* 2004;68:357-61.
41. Ebstein RP, Biederman J, Rimon R, Zohar J, Belmaker RJ. Cyclic GMP in the CSF of patients with schizophrenia before and after neuroleptic treatment. *Psychopharmacology.* 1976;51:71-4.
42. Zimmer R, Teelken AW, Cramer H, Ackenheil M, Zandler KJ, Fischer H. Short - and long - term effects on GABA and dopamine neurons during treatment with sulpiride. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1980;24:537-9.
43. Gattaz WF, Carmer H, Beckmann H. Low CSF concentrations of cyclic GMP in schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 1983;142:288-91.
44. Pantelis C, Wood SJ, Velakoulis D, Testa R, Fontenelle LF, Yücel M. Should we redefine the concept of endophenotype in schizophrenia? *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32:106-7.