

Respuesta inmunoinflamatoria sistémica en primeros episodios de psicosis



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA

Doctorando:

María Juncal Ruiz

Director:

Prof. Benedicto Crespo Facorro

Codirector:

Prof. Marcos López Hoyos

Santander, 2018

A MIS PADRES, JESÚS Y ENCARNI

A MIS HERMANAS, ANA Y ELENA

A MI TÍO, BABI

A MI PAREJA, ALBERTO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Benedicto Crespo Facorro y a Marcos López Hoyos porque, además de haberme guiado, supervisado y apoyado en este trabajo de tesis doctoral, me han transmitido su pasión y entrega por la investigación en medicina. Son dos ejemplos de cómo la ilusión por la investigación puede continuar creciendo con el paso de los años. Además, quiero agradecer especialmente a Benedicto la confianza y las oportunidades que me ha dado desde el principio, el tiempo que ha dedicado a que aprenda y crezca como investigadora y a la posibilidad que me ha brindado de ser parte de un excelente grupo de investigación como es PAFIP.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a Laura Riesco y al resto del equipo del Servicio de Inmunología, que se han encargado de procesar las muestras de sangre y de cuantificar los niveles séricos de citocinas/quimiocinas.

Me gustaría agradecer también al resto del equipo PAFIP y residentes de psiquiatría por su participación en estos estudios, tanto en tareas clínicas como en la recogida de muestras y de datos.

Asimismo, quiero agradecer a los pacientes y a sus familias su generosa participación en esta investigación, porque así nos permiten continuar avanzando en el estudio de los primeros episodios de psicosis.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, a mi pareja y a Yara, por su cariño, su inestimable apoyo en este camino, por entenderme, creer en mí y darme fuerzas aún en los momentos más difíciles. Sin vosotros esto no hubiera sido posible.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción:

1.1. La esquizofrenia

- 1.1.1. Aspectos clínicos y epidemiológicos pág. 1
- 1.1.2. Etiopatogenia y tratamiento pág. 3

1.2. Relación entre el sistema inmune y la esquizofrenia

- 1.2.1. Implicación del sistema inmune en la etiopatogenia de la esquizofrenia pág. 10
- 1.2.2. Estrés y sistema inmune pág. 15
- 1.2.3. Efecto antiinflamatorio de los fármacos antipsicóticos pág. 19

2. Justificación de la investigación

- 2.1. Limitaciones de estudios previos pág. 21

3. Objetivos e hipótesis

- 3.1. Objetivos pág. 25
- 3.2. Hipótesis pág. 26

4. Material y métodos

- 4.1. Ámbito del estudio pág. 27
- 4.2. Muestra del estudio pág. 28
- 4.3. Diseño de la tesis doctoral pág. 29
- 4.4. Evaluación clínica pág. 32
- 4.5. Cuantificación de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas pág. 33
- 4.6. Análisis estadístico pág. 34

5. Resultados

- 5.1. Primer estudio pág. 37
- 5.2. Segundo estudio pág. 40

6. Publicaciones	pág. 43
7. Discusión	pág. 63
8. Limitaciones	pág. 71
9. Conclusiones	pág. 73
10. Bibliografía	pág. 75
11. Línea de investigación actual	pág. 87

LISTADO DE ABREVIATURAS

AMPA: Receptor glutamatérgico α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

BPRS: Brief Psychiatric Rating Scale.

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica.

COX: Ciclooxygenasa.

CPZeq: Equivalentes de clorpromazina.

DAMPS: Patrones moleculares asociados a células propias dañadas.

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition.

GR: Receptor de glucocorticoides.

IMC: Índice de masa corporal.

IQR: Rango intercuartil.

mRNA: messenger Ribonucleic acid.

NMDA: Receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAFIP: Programa de Atención de las fases iniciales de psicosis.

PAMPS: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PEP: Primer episodio de psicosis.

PPRs: Pattern-recognition receptors.

SANS: Scale for the Assessment of Negative Symptoms.

SAPS: Scale for the Assessment of Positive Symptoms.

SCID-I: Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders.

SNC: Sistema nervioso central.

TLRs: Toll-like receptors.

WHO: World Health Organization.

SUMMARY

In recent years, evidence about the involvement of the immune system in the development and evolution of psychosis has grown. It is known that some genes involved in schizophrenia match several genes involved in the defense against pathogens. The production of pro-inflammatory cytokines/chemokines and free radicals of oxygen and nitrogen, as well as the sustained activation of microglia during the first stages of life, lead to changes in both structure and brain function, such as the reduction in glutamatergic neurons in some brain areas, similar to the glutamatergic hypofunction found in patients with schizophrenia. In fact, the pro-inflammatory response found in at least a subgroup of patients, has been related to brain volume loss in both schizophrenia and first-episode psychosis (FEP) individuals. Impaired immune response, along with biological, genetic and environmental factors may lead to FEP later in life.

However, cytokines may be also altered by other causes such as stress, cannabis consumption, cardiovascular diseases, excess weight and metabolic syndrome, conditions highly prevalent in patients with FEP and chronic schizophrenia. The inflammatory state that accompanies excess weight shows a peculiar presentation, as it is not accompanied by infection or sign of autoimmunity and no massive tissue injury seems to occur. In fact, it is often called “low-grade” chronic inflammation. Several studies have found that overweight individuals (body mass index (BMI) ≥ 25) have higher plasma levels of some pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , and IL-1 β than normal-weight individuals.

The selection of an antipsychotic at the first episode of the illness is an important decision, influencing the course and the outcome of the disease. Risperidone and aripiprazole are among the most used second-generation antipsychotic in clinical practice for psychosis. Several studies have compared them in terms of efficacy and safety. Nevertheless, no previous research has compared their anti-inflammatory effect.

In this thesis, we have compared the anti-inflammatory effect of risperidone and aripiprazole on a large array of serum cytokines/chemokines at three months following the onset of treatment. We have also investigated if there is any difference in the serum cytokine/chemokine levels between healthy volunteers and patients at baseline and whether serum concentrations have changed from baseline to 3 months after the initiation of medication. In addition, we have analyzed the effect of BMI on the basal serum

cytokine/chemokine levels in FEP patients and healthy volunteers, separating the total sample into two groups: normal-weight and overweight individuals.

As far as we know, these are the first studies that have compared the anti-inflammatory effect of both risperidone and aripiprazole and that has studied the additive effect of both the “low-grade” systemic inflammation related to excess weight and the neuroinflammation related to psychosis on a large array of serum cytokine/chemokine levels.

Our findings support the immunological hypothesis of schizophrenia. We have found several cytokines/chemokines elevated in the the FEP group that normalized with antipsychotic treatment. Although the anti-inflammatory effect of risperidone and aripiprazole was similar, aripiprazole seemed to have a greater effect size on some cytokines/chemokines. Moreover, our results also support the hypothesis that excess weight can alter the homeostasis of the immune system (first-hit) and therefore may have an additive pro-inflammatory effect on the one produced by neuroinflammation (second-hit) in peripheral blood.

IL-8, that has been a chemokine poorly studied in previous researches in FEP samples, was the chemokine that showed the most significant and stable differences in all of analyses carried out in this thesis. It might be considered as a state marker of psychosis, as it was increased at baseline and normalized with antipsychotic treatment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La esquizofrenia

1.1.1. Aspectos clínicos y epidemiológicos

La esquizofrenia es un trastorno mental grave que se encuentra dentro del grupo de los trastornos psicóticos y cuya expresión clínica es muy heterogénea. De hecho, aunque se habla del primer episodio de psicosis (PEP) como si fueran una sola enfermedad, conviene destacar que en más del 90% de los casos hablamos de un grupo de trastornos que cubren el llamado “espectro de la esquizofrenia” y que engloban varios trastornos como la esquizofrenia, el trastorno esquizofreniforme, el trastorno por ideas delirantes, el trastorno esquizoafectivo, el trastorno psicótico breve, y el trastorno esquizotípico de la personalidad. El escaso porcentaje restante obedece principalmente a trastornos afectivos, además de otras formas de psicosis breves y/o atípicas (Segarra, 2013; Sadock y Sadock, 2015; Crespo-Facorro et al., 2017).

Los signos y síntomas de la esquizofrenia son variables e incluyen cambios en la percepción, la emoción, la cognición, el pensamiento y la conducta, así como disfunción social. La presentación clínica, respuesta a tratamiento y evolución de la enfermedad son distintos en cada sujeto, atendiendo a razones biológicas y ambientales. El diagnóstico se basa en la exploración clínica, observación de la conducta e información aportada por personas allegadas, sin disponer en el momento actual de pruebas de imagen o parámetros biológicos que apoyen la sospecha clínica inicial, o que aporten información sobre la evolución y el pronóstico a corto, medio y largo plazo (Sadock y Sadock, 2015; Gogos et al., 2015).

El riesgo de presentar esquizofrenia a lo largo de la vida es del 0,9% (McGrath et al., 2008). Los estudios más recientes sitúan la mediana de incidencia en 15,2 por 100.000 habitantes (siendo el percentil 10 de 7,7 por 100.000 habitantes y el percentil 90 de 43,0 por 100.000 habitantes) (McGrath et al., 2004, 2008; Kirkbride et al., 2012). Esta importante variabilidad se debe a la amplia heterogeneidad de los trastornos psicóticos y a la propia variabilidad metodológica

de los estudios y disminuye si los criterios diagnósticos son más estrictos, por ejemplo, si se tienen sólo en cuenta los PEP no afectiva (Baldwin et al., 2005). Los varones tienen una mayor probabilidad de desarrollar esquizofrenia a lo largo de la vida, con un riesgo relativo de 1,4 (IC 95%: 0,9-2,4) frente a las mujeres (Aleman et al., 2003; McGrath et al., 2008), hecho que también fue confirmado por nosotros en Cantabria donde se encontró un riesgo relativo del 1,6 (IC 95%: 1,19-2,19) (Pelayo-Terán et al., 2008). Asimismo, se ha descrito una asociación significativa entre una serie de variables sociales como la emigración, la residencia en zonas urbanas, la época de nacimiento o la latitud. Estas variables parecen estar potencialmente vinculadas a factores psicológicos, sociales y biológicos generadores de estrés y desintegración social, lo que podría aumentar el riesgo de desarrollar esquizofrenia (Cantor-Graae y Selten, 2005; McGrath et al., 2004; Van Os et al., 2010).

Los primeros síntomas del trastorno suelen aparecer al final de la adolescencia o al comienzo de la edad adulta. El inicio del PEP coincide con el momento en el que se produce la denominada “poda sináptica”, es decir, la eliminación de las sinapsis neuronales dañadas o que han sido poco utilizadas durante la primera infancia e inicio de la adolescencia (Sadok y Sadock, 2015; Sekar et al., 2016). Asimismo, varios estudios han concluido que en los varones el PEP aparece entre 3 y 5 años antes que en las mujeres (Pelayo-Terán et al., 2008; McGrath et al., 2008), hecho que parece asociarse a un mejor ajuste social y familiar, así como a un curso evolutivo más favorable en el sexo femenino (Aleman et al., 2003; Atalay y Atalay, 2006). Sin embargo, a diferencia de los hombres, las mujeres muestran una distribución bimodal de la edad, con un segundo pico de incidencia después de los 40 años, probablemente en relación con los cambios estrogénicos perimenopáusicos (Gogos et al., 2015).

Clásicamente los trastornos psicóticos y de manera especial la esquizofrenia, han sido descritas como trastornos caracterizados por un curso crónico, en el que eran frecuentes las recaídas y la tendencia a desarrollar resistencia al tratamiento y notables déficits en el funcionamiento tanto psíquico como social. Sin embargo, un metaanálisis realizado por Menezes y colaboradores (2006) sobre población con PEP no afectiva, evidenció que la presencia de un curso evolutivo malo se daba en tan solo el 27,1% de los pacientes, presentando por el contrario el 42,2% de ellos una buena

evolución. A pesar de esta visión más optimista, la afectación en el funcionamiento psicosocial es una de las consecuencias más devastadoras de esta enfermedad. De hecho, la esquizofrenia causa un alto grado de discapacidad, encontrándose en la actualidad entre las diez causas de discapacidad a largo plazo más frecuentes del mundo (Mueser y Jeste, 2011) y una de las más importantes según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Por este motivo, es una de las enfermedades mentales que supone un mayor gasto económico (WHO World Health Report, 2001). Aunque es una enfermedad que se asocia con altas tasas de hospitalización y a una prevalencia más elevada de otras enfermedades, como la diabetes, hipertensión arterial y obesidad (Evensen et al., 2016), los costes mayoritarios se deben a la pérdida de productividad (Ritsner, 2011; Mayoral-van Son et al., 2018). Además, los individuos con esquizofrenia, tienen una probabilidad 13 veces superior de morir por suicidio que sujetos de la población general (Saha et al., 2007) y su esperanza de vida total es entre 10 y 25 años menor que en los sujetos sin esquizofrenia, incluso después de controlar los análisis por la tasa de suicidio (Lambert y Newcomer, 2009). Asimismo, se sabe que la esquizofrenia supone una importante carga psicológica para los familiares o cuidadores (Schulze y Rössler, 2005).

Atendiendo a su condición de síndrome, la esquizofrenia probablemente constituye la vía final común de expresión de un grupo de trastornos de diversas etiologías, sustratos fisiopatológicos, formas de presentación clínica, cursos y pronósticos (Segarra, 2013). Ello explica en parte su gran variabilidad fenotípica y justifica la necesidad de identificar subgrupos de pacientes (endofenotipos) en base a diversos criterios etiopatogénicos, fisiopatológicos y fenomenológicos, para conseguir un diagnóstico, pronóstico y enfoque terapéutico apropiado para cada caso particular (Segarra et al., 2010).

1.1.2. Etiopatogenia y tratamiento

Los PEP son el resultado de procesos patológicos cuyo origen o etiología radica en la compleja interacción entre múltiples genes y factores ambientales. Tal es la complejidad, que se puede concluir que no existen dos pacientes con el mismo

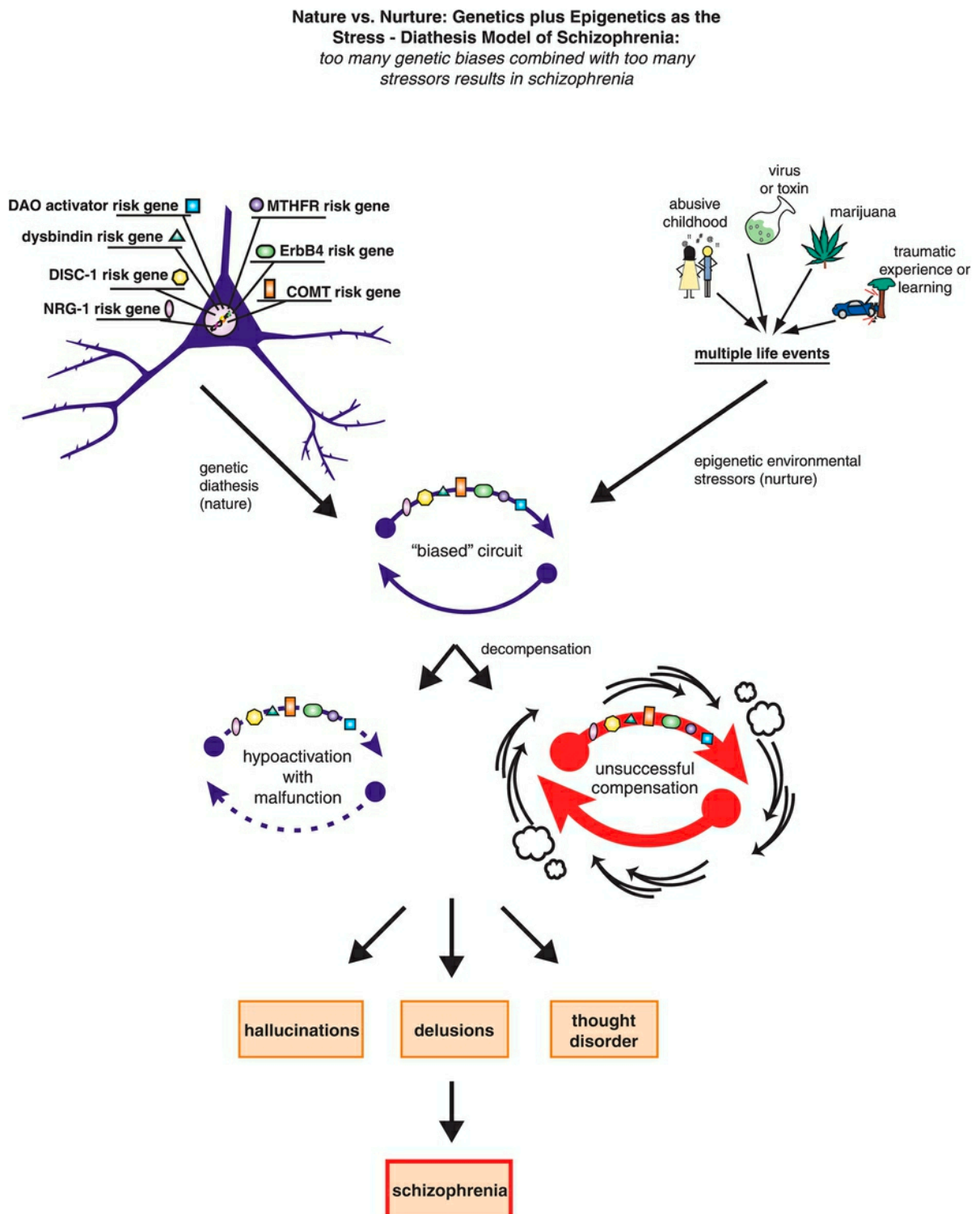
riesgo de desarrollar un PEP, ni siquiera en el caso de gemelos univitelinos (Fatemi et al., 2009; Gratten et al., 2014).

El modelo etiopatogénico más aceptado hoy en día es el de diátesis-estrés, que sugiere que la esquizofrenia aparece por la interacción de factores heredados (genética) y ambientales (epigenética) (Harrison y Weinberger, 2005; Howes y Murray, 2014), tal y como se describe gráficamente en la *Figura 1*.

Según este modelo, en un individuo con una vulnerabilidad genética, que se expone a uno o más factores de riesgo ambientales (como alteraciones en el neurodesarrollo temprano, situaciones de estrés importante en la primera infancia o principios de la adolescencia, o el consumo de cannabis), se pueden producir cambios epigenéticos que aumentarían la probabilidad de desarrollar un PEP. Sin embargo, es importante destacar que el modelo diátesis-estrés no precisa de una alteración genética inicial, sino que genes sanos que en condiciones normales producirían proteínas normofuncionantes, pueden ser silenciados o hiperactivados por la acción de factores de riesgo ambientales en distintas etapas del neurodesarrollo, dando lugar a un mal funcionamiento de distintos circuitos cerebrales, que en última instancia aumentarían el riesgo de psicosis (Stahl, 2013). Por ejemplo, se ha descrito que el consumo frecuente de cannabis en sujetos con genotipos específicos para el receptor cannabinoide 1, produciría una alteración del sistema endocannabinoide, así como una reducción de la sustancia blanca cerebral y un peor rendimiento cognitivo, aumentando el riesgo de desarrollar un PEP (Leweke et al., 2007; Ho et al., 2011).

La mejor evidencia de que los factores ambientales juegan un papel importante en la fisiopatología de la esquizofrenia es que sólo la mitad de los gemelos univitelinos de pacientes con esquizofrenia tienen también la enfermedad (Stahl, 2013; Howes y Murray, 2014). Por lo tanto, tener los mismos genes no es suficiente para el desarrollo de la esquizofrenia, sino que también es necesaria la exposición a diversos factores ambientales.

Figura 1. Interacción de factores genéticos y ambientales en el riesgo de esquizofrenia



* Reproducida de Stahl, 2013.

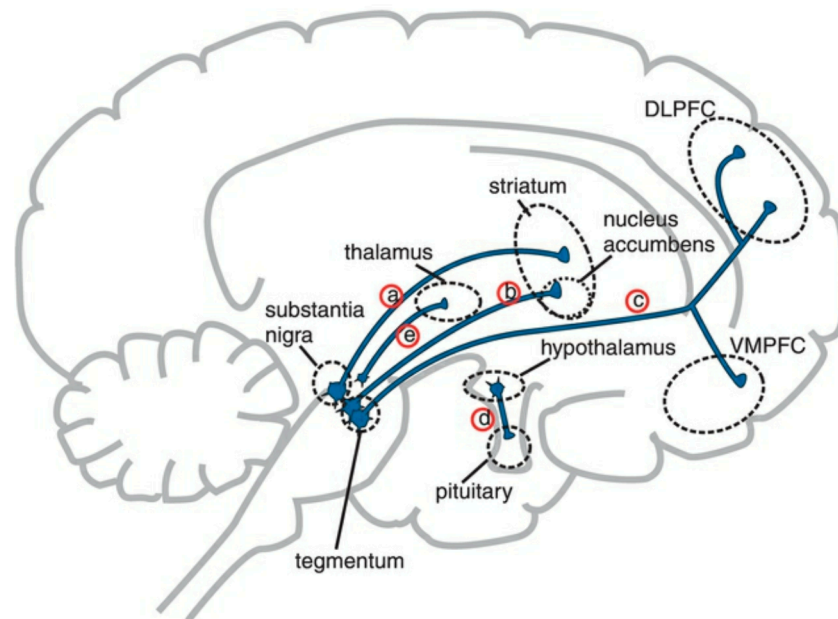
En relación con las alteraciones del neurodesarrollo, Murray y Lewis describieron en 1987 una asociación significativa entre las alteraciones del neurodesarrollo temprano y el desarrollo posterior de esquizofrenia. Esta asociación se apoya en tres puntos fundamentales: en primer lugar, se ha descrito una asociación entre la presencia de alteraciones en el periodo prenatal y peri/postnatal y el desarrollo posterior de un PEP (Howes y Murray, 2014); en segundo lugar, en aquellos niños que posteriormente iban a desarrollar esquizofrenia, se ha descrito una alteración en la adquisición de hitos del neurodesarrollo, así como marcadores de afectación neuromotora, déficits físicos, alteraciones cognitivas y deterioro en la sociabilidad (Avila et al., 2003 y Comptom et al., 2007). De hecho, el primer síntoma psicótico evidenciable no supone necesariamente la primera manifestación clínica del trastorno. La mayoría de los pacientes con un PEP han presentado desde su primera infancia síntomas neurológicos menores (Barkus et al., 2006) y pueden mostrar un coeficiente intelectual inferior de manera precoz, que se mantiene en el tiempo (Woodberry et al., 2008; Ayesa-Arriola et al., 2017); y finalmente, los estudios de neuroimagen muestran que al inicio de la enfermedad ya se pueden evidenciar alteraciones estructurales cerebrales como el aumento de los ventrículos laterales, la disminución del volumen cerebral, la disminución de sustancia gris, la disminución del volumen de los lóbulos frontales, temporales y del hipocampo, así como una reducción de la asimetría cerebral (Boss et al., 2007; Arango et al., 2012; Tordesillas-Gutierrez et al., 2015).

Por lo tanto, en los sujetos con psicosis existe una compleja combinación entre alteraciones genéticas y factores ambientales, que darían lugar a la silenciación o hiperactivación de distintos genes en el sistema nervioso central (SNC). Se ha descrito que estas alteraciones podrían producir desequilibrios en varias vías cerebrales (Sadock y Sadock, 2015), que explicarían las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La más conocida es la hipótesis dopaminérgica, que tiene su origen en el descubrimiento de los efectos antipsicóticos de la clorpromacina, fármaco inicialmente sintetizado como antihistamínico que se utilizaba en la preanestesia (Sadock y Sadock, 2015). De hecho, se han implicado varios genes como la *neuroregulina*, la *disbindina*, el *CF4*, el *mir137*, el *neuroxin 1*, el *ErbB4*, el *DAOA* y de manera especial el *DISC1* (Stahl, 2013; Howes y Murray, 2014) en la alteración del sistema dopaminérgico y glutamatérgico (ver *Figura 1*).

La hipótesis dopaminérgica sostiene que una hipofunción inicial de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) de las neuronas gabaérgicas de la corteza prefrontal y del hipocampo, provocaría una hiperactivación glutamatérgica que en última instancia produciría un aumento de dopamina en la vía mesolímbica y una disminución de dopamina en el área mesocortical, dando lugar tanto a los síntomas positivos de la esquizofrenia, como a los negativos y cognitivos respectivamente (ver *Figura 2*) (Stahl, 2013). El receptor dopaminérgico que más se ha relacionado con los síntomas positivos es el D2. Por el contrario, una hipofunción del receptor dopaminérgico D1 en el área cortical se ha relacionado con la aparición de los síntomas negativos, cognitivos y afectivos (Bernardo y Bioque, 2015).

La hipofunción de los receptores NMDA en la corteza prefrontal e hipocampo debilitan las sinapsis entre las células gabaérgicas y glutamatérgicas porque disminuyen tanto la potenciación a largo plazo de la sinapsis, como el número de receptores glutamatérgicos α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), que participan en la estabilización y mediación de la neurotransmisión glutamatérgica. Estas sinapsis debilitadas son susceptibles a ser eliminadas en la “poda sináptica” competitiva que se produce en la adolescencia, dando lugar a un mayor desequilibrio de la dopamina en la vía mesolímbica y mesocortical. Este es uno de los motivos de por qué los síntomas nucleares de la esquizofrenia suelen aparecer a partir de la adolescencia, aunque, como se ha descrito con anterioridad, pueden observarse síntomas prodrómicos a edades más tempranas (Stahl, 2013; Sadock y Sadok, 2015).

Figura 2. Vías dopaminérgicas en el SNC



* reproducida de Stahl, 2013.

- a) **Vía nigroestriada:** desde la sustancia negra del mesencéfalo hasta los ganglios de la base. Forma parte del sistema extrapiramidal y controla la función motora y el movimiento. No está alterada en la esquizofrenia.
- b) **Vía mesolímbica:** desde el área tegmental ventral del mesencéfalo hasta el núcleo accumbens. Forma parte del circuito de la recompensa. Se relaciona con las sensaciones placenteras y el sentimiento de euforia que sigue al consumo de drogas de abuso. El aumento de dopamina en esta vía se relaciona con la aparición de síntomas positivos.
- c) **Vía mesocortical:** desde el área tegmental ventral del mesencéfalo hasta las regiones dorsolateral y ventromedial de la corteza prefrontal. Participa en las funciones cognitivas y en la regulación de la afectividad. La disminución de la dopamina en esta vía se asocia con síntomas cognitivos y negativos (en la región más dorsolateral) y/o afectivos y negativos (en la región más ventromedial).
- d) **Vía tuberoinfundibular:** desde el hipotálamo hasta la región anterior de la hipófisis. La dopamina inhibe la secreción de prolactina. No está alterada en la esquizofrenia.
- e) **Otras vías dopaminérgicas** que proyectan al tálamo y cuya función no se conoce bien en el momento actual.

Los fármacos antipsicóticos típicos bloqueaban de forma inespecífica los D2 en todas las vías dopaminérgicas cerebrales, dando lugar por lo tanto a una disminución de los síntomas positivos pero a un empeoramiento de los síntomas cognitivos y negativos, ya que disminuían aún más la dopamina en la corteza prefrontal, donde ya estaba disminuida por la propia alteración neurobiológica de la enfermedad. Además, producían un bloqueo dopaminérgico en otras áreas cerebrales no afectadas por la esquizofrenia, como en la vía nigroestriada, dando lugar a síntomas extrapiramidales y/o acatisia y en la vía tuberoinfundibular, aumentando la prolactina (Stahl, 2013; Sadock y Sadock, 2015).

Los fármacos antipsicóticos atípicos, añadían al bloqueo de los receptores D2, un bloqueo específico de los receptores serotoninérgicos 5HT-2A. En teoría, el bloqueo 5HT-2A aumentaría la dopamina tanto en el área cortical prefrontal, mejorando así los síntomas negativos y cognitivos, como en las otras vías dopaminérgicas no afectadas por la esquizofrenia (la vía tuberoinfundibular y la vía nigroestriada), disminuyendo así la incidencia de efectos indeseables. Además, en los últimos años se han desarrollado fármacos con otros mecanismos de acción, como los agonistas parciales de los receptores D2, que teóricamente tienen un efecto de agonismo o antagonismo dependiendo de la disponibilidad de dopamina en la hendidura sináptica: si hay un exceso de dopamina producirían un bloqueo dopaminérgico, mejorando así los síntomas positivos; si hay una disminución de dopamina funcionarían como agonistas de los receptores D2, mejorando así los síntomas negativos y cognitivos; y si la dopamina no está alterada, como en las vías nigroestriada y tuberoinfundibular, no realizarían ninguna acción sobre los receptores (Stahl, 2013; Sadock y Sadock, 2015).

La realidad es que, aunque se han intentado diseñar fármacos antipsicóticos más específicos con el objetivo de tratar los síntomas nucleares produciendo los menores efectos secundarios posibles, se ha logrado mejorar los síntomas positivos pero la efectividad sobre los síntomas negativos y cognitivos es aún muy escasa y los efectos indeseables, como los síntomas extrapiramidales, acatisia o, aumento de peso e hiperprolactinemia, aparecen con una frecuencia mayor de la esperada, incluso con los agonistas parciales (Stahl, 2013; Sadock y Sadock, 2015). Además, hoy en día todavía se desconoce si la efectividad de los antipsicóticos puede deberse a su acción sobre otros receptores además de los D2 o 5HT-2A. De hecho, todos los antipsicóticos atípicos y algunos de los típicos, actúan sobre otros receptores además

de los dopaminérgicos y serotoninérgicos, como noradrenérgicos, muscarínicos o histamitérgicos (Stahl, 2013). Se sabe que su acción sobre estos receptores aumenta la incidencia de efectos secundarios, como acatisia, sialorrea, cansancio, somnolencia o síndrome metabólico. Un ejemplo claro es la clozapina que, a pesar de ser el antipsicótico con menor afinidad por los receptores D2, es en la actualidad el más eficaz y el que se utiliza en casos de psicosis refractaria, pero también uno de los peor tolerados por la alta tasa de efectos secundarios que produce, sobre todo a nivel metabólico (Stahl, 2013; Sadock y Sadock, 2015).

Con el conocimiento actual sobre la fisiopatología de la psicosis y el mecanismo de acción de los antipsicóticos, es probable que se esté actuando sobre dianas poco específicas, pagando un alto precio para lograr una mejoría de los síntomas positivos, con numerosos efectos adversos y escasa efectividad sobre los síntomas negativos y cognitivos.

1.2. Relación entre el sistema inmune y la esquizofrenia

1.2.1. Implicación del sistema inmune en la etiopatogenia de la esquizofrenia

Con lo expuesto en el apartado anterior, se evidencia la necesidad de profundizar en el estudio etiopatogenico de la esquizofrenia para diseñar dianas terapéuticas más específicas y efectivas. Además, en la actualidad no se dispone de ninguna prueba que ayude a diagnosticar o a predecir la evolución o el pronóstico de un paciente con un PEP. Sabemos que disminuir el estrés, evitar el consumo de tóxicos y la buena adherencia al tratamiento reducen el riesgo de recaída y mejoran el pronóstico, pero entre los pacientes que cumplen con estas recomendaciones no podemos predecir cuáles van a tener una peor evolución a largo plazo y por tanto se beneficiarían de abordajes intensivos desde fases tempranas (Sadock y Sadock, 2015).

El sistema inmune innato está formado por varias células inmunes (como monocitos, leucocitos, células dendríticas o microglía) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) o patrones moleculares asociados a

células propias dañadas (DAMPs) a través de un sistema receptorial denominado en inglés “Pattern-Recognition Receptors” (PRRs), localizado en la superficie celular o en el citoplasma (Kawai y Akira, 2010). Los Toll-like receptors (TLRs) son una de las familias más importantes de los PRRs. Son proteínas transmembrana que tienen un dominio extracelular que se une a los ligandos y otro intracelular que contacta con otros complejos proteicos para iniciar vías de transducción intracelular y producir distintas proteínas, como las citocinas, que son moléculas que actúan como mediadores de la regulación entre el SNC y el sistema inmune (Miller et al., 2011). Las quimiocinas, como IL-8, MIP-1 β o Fractalkine, son un subtipo de citocinas inflamatorias de tipo “quimioatrayentes”, que reclutan leucocitos, monocitos y neutrófilos desde la sangre periférica a los lugares donde hay una infección o daño celular, incluido el SNC (White et al., 2007; Nomiyama et al., 2010). Por lo tanto, el aumento en sangre de citocinas/quimiocinas proinflamatorias en sujetos con una descompensación psicótica, podría reflejar el estado hiperinflamatorio que estaría teniendo lugar en el SNC (Šumanović-Glamuzina et al., 2017).

De los 11 TLRs que se conocen, el más estudiado en la esquizofrenia ha sido el TLR-4 (Müller et al., 2012; García-Bueno et al., 2016). Múltiples estudios han objetivado que los TLRs se expresan durante el neurodesarrollo en etapas tempranas de la vida y que también tienen un papel importante en el neurodesarrollo y plasticidad neuronal durante la edad adulta (Akira et al., 2001; Bsibsi et al., 2002; Larsen et al., 2007; Kaul et al., 2012).

La microglía son células fagocíticas localizadas en el SNC, que expresan distintos tipos de TLRs en su superficie. Su papel como células reguladoras del SNC lo realizan a través de vías de señalización intracelular que inician los TLRs. Dependiendo de las rutas de señalización activadas, la microglía realiza funciones distintas: participa positivamente en la respuesta inmunitaria, en el neurodesarrollo, en la plasticidad neuronal y en la sinaptogénesis (Hanisch et al., 2008; Ketternamn et al., 2011.), o por el contrario a través de la producción de citocinas/quimiocinas proinflamatorias y radicales libres de oxígeno y nitrógeno favorece tanto la neuroinflamación como la neurotoxicidad cerebral (Liu y Hong, 2003; Li et al., 2005; Monji et al., 2009).

Una de las vías proinflamatorias más importantes es la que se desencadena por la activación del factor de transcripción nuclear κB (NF κB) (Perkins, 2007).

Estímulos de distinta naturaleza, como por ejemplo una infección por diversos patógenos o la acción mantenida del estrés, van a activar diversos TLRs y poner en marcha una serie de rutas multienzimáticas que, en última instancia, van a producir una alteración en la secreción de citocinas/quimiocinas pro/antiinflamatorias, así como una acumulación de mediadores oxidativos y nitrosativos, causando daño celular (Madrigal et al., 2002; García-Bueno et al., 2008).

En las últimas décadas se ha descrito una alteración del sistema inmune y un estado proinflamatorio a nivel periférico y en el SNC en las psicosis (Muller y Schwarz, 2008; Insel, 2010; Meyer et al., 2011). Además, se ha comprobado que algunos de los genes implicados en la esquizofrenia coinciden con los genes implicados en la defensa contra la invasión de patógenos (Carter, 2009; Shi et al., 2009). La mayor parte de la evidencia que apoya la hipótesis inflamatoria de la esquizofrenia se basa en que se ha encontrado un aumento de citocinas proinflamatorias (sobre todo de IL-1 β , IL-6 y TNF- α) o un descenso de citocinas antiinflamatorias (como IL-4, IL-10 e IL-17) en el plasma de sujetos con un PEP (Miller et al., 2011; Meyer, 2011; Fraguas et al., 2018; Frydecka et al., 2018). Además, recientemente se ha descrito una alteración de la vía de señalización intracelular de NF κ B, y consiguientemente un aumento del estrés oxidativo en sujetos con un PEP (García-Bueno et al., 2013). En esta misma línea, un metaanálisis publicado este mismo año ha descrito una elevación de dos citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α), así como una disminución de la capacidad oxidativa en sujetos con PEP en comparación con voluntarios sanos (Fraguas et al., 2018). También se ha demostrado una activación de la microglía en cerebros postmortem y en estudios que han utilizado la tomografía por exposición de positrones (van Berckel et al. 2008), así como un aumento en la expresión de genes proinflamatorios en el tejido cerebral de sujetos con esquizofrenia (Saetre et al., 2007; Steiner et al., 2008; Drexhage, et al., 2010; Rao et al., 2013). Más concretamente, se ha descrito un aumento en la activación de la vía del TLR-4 en cerebros postmortem de sujetos con esquizofrenia (García-Bueno et al., 2016). Por otro lado, se han descrito niveles plasmáticos elevados de un mediador inflamatorio, la prostaglandina E2, que es el principal producto de la isoforma 2 de la enzima ciclooxigenasa (COX-2,) así como una mayor actividad de la propia COX-2 (García-Bueno et al., 2013). Estos datos apoyan los

resultados de un metaanálisis publicado en los últimos años por Sommer y colaboradores (2011), que ha encontrado una mayor respuesta clínica tanto para los síntomas positivos como para los síntomas negativos de la esquizofrenia en sujetos tratados con fármacos antiinflamatorios no esteroideos de forma coadyuvante al tratamiento convencional con antipsicóticos, respecto a aquellos sujetos que sólo se trataban con antipsicóticos.

Asimismo, varios estudios epidemiológicos han descrito una probable asociación entre varias enfermedades autoinmunes y/o enfermedades inflamatorias crónicas y la esquizofrenia (Ludvigsson et al., 2007), siendo el estrés uno de los factores desencadenantes más importantes en el desarrollo de ambas patologías (Benros et al., 2011).

Estudios epidemiológicos y experimentales más actuales llevados a cabo tanto en modelos animales como en humanos, sugieren que infecciones por virus, bacterias y protozoos en la fase prenatal (sobre todo en el primer trimestre) suponen un factor de riesgo importante para que se produzcan inflamaciones prenatales, anormalidades en el neurodesarrollo, complicaciones obstétricas y cambios conductuales similares a los observados en pacientes con esquizofrenia (Boska, 2010; Hagberg et al., 2012; Brown et al., 2012; Miller et al., 2013). Las infecciones prenatales que se han asociado con la esquizofrenia son la gripe (virus influenza), la rubeola y la toxoplasmosis (Brown et al., 2006). Es probable que la infección prenatal sólo aumente el riesgo de desarrollar esquizofrenia en subgrupos de individuos más vulnerables, es decir, aquellos genéticamente marcados o expuestos a otros factores de riesgo ambientales (Leza et al., 2015).

La teoría del “doble impacto”, desarrollada por Knudson en 1971 para explicar el origen de una enfermedad multifactorial como el cáncer y el papel de los supresores tumorales, tiene especial aplicación para integrar en una explicación etiológica el modelo del neurodesarrollo con la alteración temprana del sistema inmune, por ejemplo por una infección materna durante la gestación o por la exposición prolongada al estrés durante la gestación. En dicha teoría, las alteraciones tempranas que se dan a nivel biológico por las alteraciones del sistema inmune, catalogadas como *first-hit*, producirían cambios en la morfogénesis y diferenciación del cerebro, así como en las rutas de señalización celular, generando una alteración en el desarrollo temprano del sistema nervioso. Dichas alteraciones tempranas

producirían una especial vulnerabilidad a largo plazo para el *second-hit* que, dándose en la adolescencia, coincidiendo con un periodo crítico del desarrollo cerebral, actuaría como factor precipitante de los síntomas psicóticos (Maynard et al., 2001; Schmitt et al., 2014). Los mecanismos a través de los que este *second-hit* interfiere con la estructura cerebral tiene que ver con un incremento patológico de la “poda sináptica”, con eliminación excesiva de sinapsis, así como con una pérdida de plasticidad neuronal. Algunos de los factores que podrían actuar como *second-hit* podrían ser el consumo de cannabis, la exposición prolongada a estrés, o un estado proinflamatorio causado por una infección o por una enfermedad autoinmune (Miller et al., 2013; Schmitt et al., 2014).

La activación disfuncional de los TLRs puede provocar daño neuronal en el feto mediante el aumento en la producción de citocinas/quimiocinas proinflamatorias y/o factores antimicrobiales, la menor activación de rutas antiinflamatorias y produciendo una activación mantenida de la microglía (Rothermundt et al., 2007; Monji et al., 2009; Juckel et al., 2011). De hecho, se ha visto un aumento de la quimiocina IL-8 durante el segundo trimestre de embarazo en las madres de pacientes que posteriormente desarrollarían esquizofrenia (Brown et al., 2005). Tanto el aumento de citocinas/quimiocinas proinflamatorias y factores antimicrobiales, el descenso de citocinas antiinflamatorias, así como la activación mantenida de la microglía, van a provocar la acumulación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, dando lugar a procesos de neurodegeneración, necrosis y/o apoptosis, que van a producir cambios tanto en la estructura y funcionalidad cerebral, como en el proceso normal del neurodesarrollo del feto (García-Bueno et al., 2008). Además, se ha descrito que la activación excesiva de la microglía puede dar lugar a una hipofunción glutamatérgica en algunas áreas cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo y los ganglios basales, similar a la hipofunción glutamatérgica que se encuentra en cerebros de pacientes con esquizofrenia (Chew et al., 2013; Kahn et al., 2015).

Sin embargo y pese a los numerosos estudios que apoyan la implicación del sistema inmune en el desarrollo de la esquizofrenia, hay que tener en cuenta que las citocinas/quimiocinas proinflamatorias también pueden aumentar por otras causas que son muy prevalentes en los sujetos con esquizofrenia, como la obesidad, el

síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares, el consumo de cannabis o el estrés (Beumer et al., 2012; Suárez-Pinilla et al., 2014).

La relación entre la obesidad y la esquizofrenia es elevada: hasta el 50% de los individuos con esquizofrenia están obesos, es decir, tienen un índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m² (Beumer et al., 2012; Annamalai et al., 2017). El estado proinflamatorio sistémico que acompaña al sobrepeso no se da en el contexto de una infección por un patógeno, sino por la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de los adipocitos que se sitúan fundamentalmente en la grasa abdominal y en el hígado. Por eso, a la inflamación asociada a la obesidad también se le conoce con el nombre de inflamación crónica de “bajo grado” (Monteiro y Azevedo, 2010). Varios estudios han encontrado que los sujetos sin enfermedad mental pero con sobrepeso (IMC) ≥ 25 kg/m² tienen niveles más altos de varias citocinas proinflamatorias respecto a los sujetos con normopeso, especialmente de IL-6, IL-8, TNF- α y de IL-1 β (Medzhitov, 2008; Schmidt et al., 2015).

1.2.2. Estrés y sistema inmune

Como se ha descrito en el apartado de etiopatogenia, el estrés es uno de los factores de riesgo ambientales más relacionado con la esquizofrenia (Beards et al., 2013; Niwa et al., 2013). Con frecuencia se reportan fases de estrés agudo durante los PEP y durante las recaídas posteriores. De hecho, la hipercortisolemia se ha descrito tanto en los PEP como en las fases agudas de las psicosis (Gallagher et al., 2007).

La exposición mantenida al estrés tiene un efecto sobre el equilibrio del sistema inmune: aumentado las vías de señalización con efecto proinflamatorio y disminuyendo las vías de señalización con efecto antiinflamatorio (Leza et al., 2015). Explicado más en detalle, la exposición crónica al estrés produce una elevación mantenida de glucocorticoides, dando lugar a largo plazo a una disminución de la expresión del receptor de glucocorticoides (GR) por un mecanismo de *downregulation*. De hecho, se ha observado una desregulación del GR y otras moléculas de señalización de glucocorticoides en los cerebros de pacientes con esquizofrenia (Webster et al., 2002; Perlman et al., 2004; Rivest et al., 2009; Sinclair

et al., 2011; Schwarz et al., 2011). Aunque las vías de señalización del estrés se han considerado como independientes de los cambios que ocurren en el sistema inmune en el SNC, el GR y el sistema inmune están conectados, siendo los glucocorticoides uno de los supresores más potentes de la secreción de moléculas proinflamatorias (Steiner et al., 2011). Esto sugiere que las alteraciones tanto del sistema inmune como de la vía de señalización de los glucocorticoides, así como las interacciones entre estos dos sistemas, pueden contribuir a la fisiopatología común que se encuentra en la esquizofrenia. Sin embargo, no se sabe si las alteraciones en las vías de señalización del estrés y del sistema inmune que se encuentran en los sujetos con psicosis ocurren simultáneamente, secuencialmente, o se encuentran en subconjuntos distintos de individuos. Tampoco se sabe la influencia que tiene en estos dos sistemas la propia evolución de la enfermedad o el uso de antipsicóticos (Chiba et al., 2012).

En humanos, el glucocorticoide endógeno, cortisol, se une tanto al receptor de mineralocorticoides (durante los períodos de secreción de cortisol basal) como a los GR (durante períodos de cortisol elevado, como el estrés agudo o crónico). El GR unido a cortisol tiene varias acciones inmediatas y sostenidas, que incluyen funcionar como un factor de transcripción para modular la expresión de una variedad de genes, incluida la represión de la transcripción de muchos genes implicados en la señalización inmune/inflamatoria, como el gen de IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Nadeau et al., 2003; Waterman et al., 2006; Verhoog et al., 2011). Curiosamente, los niveles elevados de estas y otras citocinas/quimiocinas desencadenan una mayor secreción de cortisol (van der Meer et al., 1996; Páth et al., 1997; Turnbull et al., 1999), que a su vez reprime cíclicamente la expresión de los genes que codifican para distintas citocinas/quimiocinas mediante un circuito de *feedback negativo*. En teoría, una interrupción en cualquier parte de este circuito, podría conducir a una inflamación desenfrenada en la periferia o en el SNC y por lo tanto a un daño celular. Es posible que la desregulación de la expresión del mRNA de las citocinas/quimiocinas en la psicosis no sea independiente de las alteraciones del mRNA del GR, sino que ambas ocurran en los mismos individuos, aumentando así el riesgo de alteración de la homeostasis neuronal e inmune en la esquizofrenia (Fillman et al., 2008).

El funcionamiento normal de las redes neuronales en el cerebro depende de un número mínimo y adecuado de sinapsis. La regresión o estabilización de la columna sináptica depende de la actividad de los receptores NMDA, que se encargan

de mantener estables las sinapsis mediante la potenciación a largo plazo. Las neuronas y astrocitos tienen receptores GR en su superficie (Bennett, 2013). La unión de glucocorticoides a estos receptores aumenta la secreción de glutamato al espacio extracelular en distintas áreas cerebrales, como la corteza prefrontal y el hipocampo. Esta liberación de glutamato, aumenta el reclutamiento de la microglía, que a su vez libera TNF- α al espacio extracelular. Esta liberación de TNF- α , que es “glutamato-dependiente”, aumenta aún más la activación de la microglía y la liberación de glutamato al espacio extracelular, produciendo un estado de neuroinflamación y neurotoxicidad, que si se mantiene en el tiempo por la exposición crónica al estrés, puede alterar el funcionamiento de los receptores NMDA, a través de un mecanismo adaptativo de *downregulation* y por tanto debilitar las sinapsis neuronales (Cebers et al., 2001). Estas sinapsis debilitadas serán susceptibles a ser eliminadas en distintos periodos del neurodesarrollo, sobre todo en el periodo crítico de poda sináptica que ocurre en la adolescencia (Bennett, 2013).

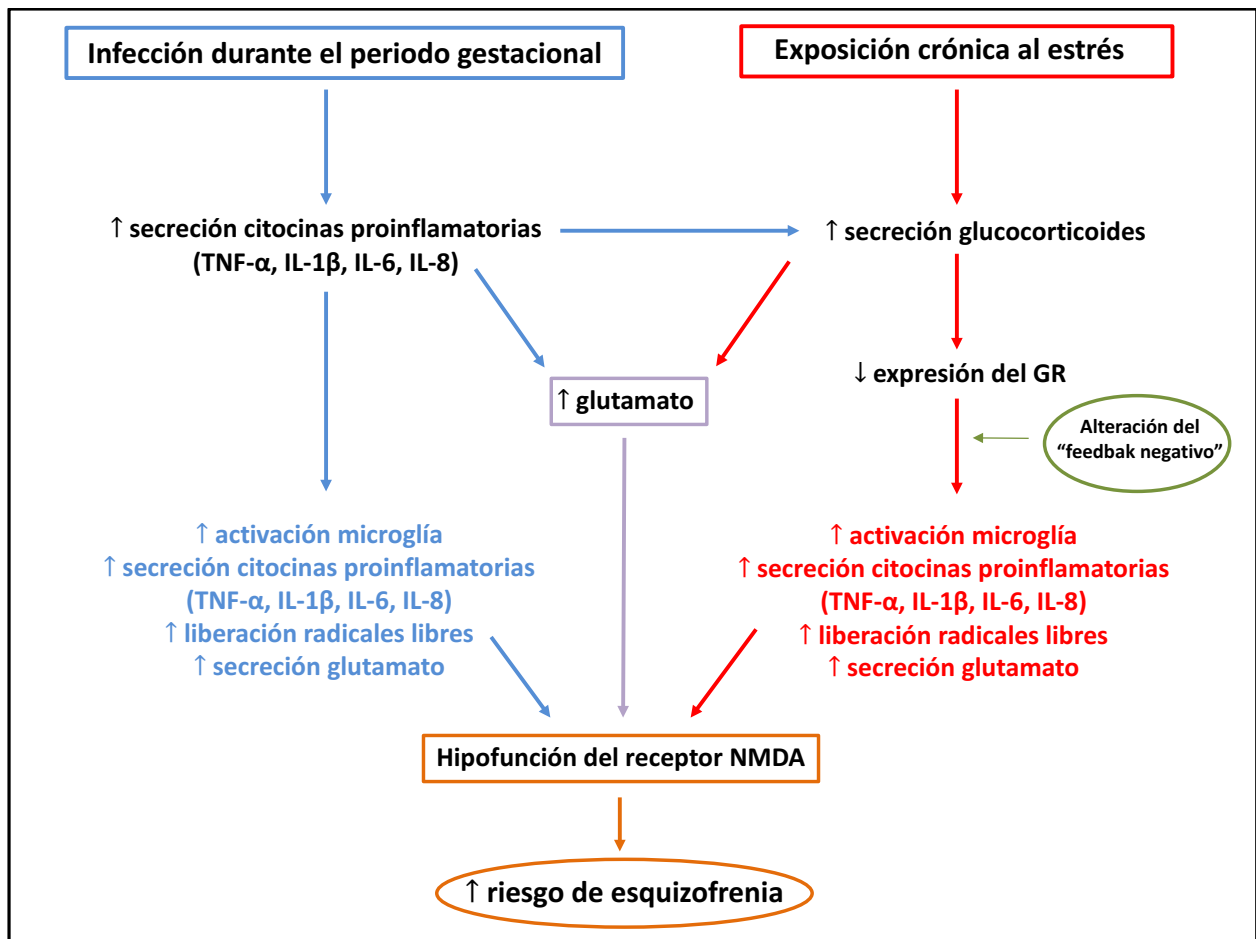
De esta manera, se observa que existe una interrelación entre las vías que regulan el estrés y el sistema inmune (ver *Figura 3*).

Así, alteraciones en el sistema inmune en fases tempranas, por ejemplo por una infección durante el periodo gestacional, producirían un aumento en la secreción de citocinas/quimiocinas proinflamatorias. Este aumento, por un lado produciría una activación continua de la microglía, lo que a su vez aumentaría la liberación de citocinas/quimiocinas proinflamatorias, así como la liberación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno y de glutamato, desencadenando un estado de neuroinflamación y neurotoxicidad (Ling et al., 2013). Y por otro lado, daría lugar a un incremento en la secreción de glucocorticoides, ya que estos participan en el circuito de *feedback negativo* que suprime la secreción de moléculas proinflamatorias. El aumento mantenido de glucocorticoides, daría lugar a una *downregulation* de los GR, lo que alteraría el circuito de *feedback*, que en última instancia produciría una secreción descontrolada de citocinas/quimiocinas proinflamatorias (Fillman et al., 2008).

Por otro lado, un aumento en la secreción de glucocorticoides por exposición crónica al estrés, alteraría el funcionamiento en las vías de señalización del estrés, dando lugar por la alteración de las mismas vías que se han descrito anteriormente, a un aumento de citocinas/quimiocinas proinflamatorias (Fillman et al., 2008).

En ambos casos, por el aumento en la activación de la microglía y de la liberación tanto de citocinas/quimiocinas proinflamatorias (como el TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) como de radicales libres y glutamato, se produciría una alteración en el funcionamiento normal de los receptores NMDA, debilitándose las sinapsis y haciéndose más susceptibles a ser eliminadas en periodos críticos del neurodesarrollo (Bennett, 2013). La eliminación de sinapsis entre neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas en la corteza prefrontal y el hipocampo es la base etiopatogénica que sostiene la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia.

Figura 3. Relación entre las vías de señalización del sistema inmune y del estrés



En relación con lo anterior, un estudio reciente ha descrito una disregulación del sistema endocanabinoide en sujetos con un PEP, que es un sistema endógeno que tiene entre sus funciones principales la regulación del sistema inmune, sobre todo cuando su alteración se ha producido como respuesta al estrés (Bioque et al., 2013).

En definitiva, en sujetos con un PEP se ha descrito una alteración de varios sistemas endógenos, como el de los glucocorticoides o el sistema endocanabinoide, que se encargan de recuperar el equilibrio del sistema inmune ante situaciones mantenidas de estrés. Esto explicaría la mayor vulnerabilidad de los pacientes con esquizofrenia al estrés, y por qué esta exposición mantenida daría lugar a un estado proinflamatorio que se detecta en sangre periférica.

1.2.3. Efecto antiinflamatorio de los fármacos antipsicóticos

Varios estudios realizados *in vitro* o en roedores (Kato et al., 2007; MacDowell et al., 2013, 2014), en sujetos con un PEP (Crespo-Facorro et al., 2008; Di Nicola et al., 2013; Noto et al., 2014; Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Petrikis et al., 2017), en pacientes con esquizofrenia crónica (Sirota et al., 2005; Borovcanin et al., 2013; Sobiś et al., 2015; García-Bueno et al., 2016) y varias revisiones y metaanálisis (Kato et al., 2011; Miller et al., 2011; Tourjman et al., 2013; Upthegrove et al., 2014; Capuzzi et al., 2017; Miller y Goldsmith, 2017; Fraguas et al., 2018) han demostrado que los antipsicóticos tienen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. En estos estudios se ha observado una reducción de varias citocinas proinflamatorias, fundamentalmente de IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α , así como un aumento de algunas citocinas antiinflamatorias, como IL-4, IL-10 e IL-17 en sangre periférica tras el tratamiento antipsicótico. Esta recuperación del balance o equilibrio del sistema inmune en el SNC, es decir, la disminución de moléculas proinflamatorias y el aumento de moléculas antiinflamatorias en sangre periférica, podría estar relacionado con su eficacia clínica (Meyer, 2011).

Asimismo, en una revisión reciente publicada por Pacheco y colaboradores (2014), se ha descrito una interconexión entre células del sistema inmune y el sistema dopaminérgico en el SNC. En concreto, se ha visto que varias células inmunitarias,

entre las que se encuentran la microglía, linfocitos B y T, macrófagos y células dendríticas, pueden sintetizar, almacenar y liberar dopamina al espacio extracelular. Además, estas células del sistema inmune tienen receptores dopaminérgicos en su superficie (Franco et al., 2007). Sobre estos receptores podría actuar la dopamina que ellas mismas liberan (regulación autocrina) o la dopamina liberada por neuronas dopaminérgicas vecinas (regulación paracrina), modificando la transcripción de genes y la expresión de citocinas/quimiocinas proinflamatorias. De esta manera, la dopamina participaría en la regulación del sistema inmune en el SNC. Por lo tanto, aquellos fármacos que modulan el sistema dopaminérgico, también podrían tener un efecto regulador sobre el sistema inmune (Ferrari et al., 2004; Franco et al., 2007).

Paralelamente, varios estudios llevados a cabo *in vitro* y en modelos animales, han encontrado que algunos tipos de neuronas, como las glutamatérgicas y colinérgicas (Jüttler et al., 2002), tienen en su superficie receptores para algunas citocinas proinflamatorias, como la IL-6 (Erta et al., 2012) o la IL-13 (Morrison et al., 2012). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que ambos sistemas, neuronal e inmune, podrían estar conectados y que desequilibrios en el sistema dopaminérgico podrían producir cambios en la expresión de moléculas inflamatorias, al mismo tiempo que el aumento en la expresión de citocinas/quimiocinas proinflamatorias podría producir cambios en el funcionamiento de varios sistemas neuronales. En concreto, tal y como se ha descrito más arriba, alteraciones en el sistema glutamatérgico podrían producir desequilibrios en las vías dopaminérgicas, dando lugar a los síntomas nucleares de la esquizofrenia.

Por lo tanto, si aceptamos que en las psicosis hay un estado proinflamatorio, el hecho de que tras el tratamiento con antipsicóticos se recupere el equilibrio del sistema inmune, sugiere que probablemente su efectividad no solo se deba a su acción sobre los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos de las neuronas (hipótesis clásica) sino también a un efecto inmunomodulador a distintos niveles. Sin embargo, las vías a través de las cuales los antipsicóticos pueden funcionar como agentes antiinflamatorios aún no se han estudiado (García-Bueno et al., 2016; Capuzzi et al., 2017) ni se ha determinado qué antipsicóticos tienen mayor efecto antiinflamatorio (Petrikis et al., 2017; Capuzzi et al., 2017).

2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Limitaciones de estudios previos

En los últimos años se han publicado varios estudios y metaanálisis que apoyan la implicación del sistema inmune en la etiopatogenia de un subgrupo de pacientes con un PEP. Sin embargo, las limitaciones metodológicas encontradas en algunos de estos estudios apoyan la realización de nuevos estudios en los que se analicen un número mayor de citocinas/quimiocinas en una misma población de individuos con un PEP *drug-naïve*.

Algunas de las limitaciones metodológicas encontradas en estudios previos son:

1. **Escaso tamaño muestral:** Sirota et al., 2005; Di Nicola et al., 2013; Petrikis et al., 2015. 2017.
2. **Estudios transversales** (Di Nicola et al., 2013; Petrikis et al., 2015) **o con poco tiempo de seguimiento** (Sirota et al., 2005; Crespo-Facorro et al., 2008; Borovcanin et al., 2013; Song et al., 2014; Ding et al., 2014; Noto et al., 2014; Petrikis et al., 2017).
3. **Investigaciones en sujetos con antecedentes de toma de antipsicóticos:** Miller et al., 2011; Di Nicola et al., 2013; Tourjman et al., 2013. La fortaleza de estudiar a sujetos con un PEP *drug-naïve* radica en que se excluye el sesgo de posibles variables de confusión como el efecto del tratamiento antipsicótico, la cronicidad o la comorbilidad (Kahn et al., 2008; Bernardo et al., 2013).
4. **Reducido número de citocinas estudiadas en sangre periférica:** en las últimas dos décadas la mayoría de los estudios y metaanálisis se han centrado en estudiar las concentraciones plasmáticas de citocinas proinflamatorias secretadas por macrófagos (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y en menor medida otras citocinas antiinflamatorias o reguladoras como IL-2,

IL-17, IL-4, IL-10 e IFN- γ (Sirota et al., 2005; Crespo-Facorro et al., 2008; Miller et al., 2011; Tourjman et al., 2013; Borovcanin et al., 2013; Di Nicola et al., 2013; Noto et al., 2014; Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Upthegrove et al., 2014; Capuzzi et al., 2017; Petrikis et al., 2015, 2017).

Sin embargo, el papel de las quimiocinas (como IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , ITAC y Fractalkine) y de otras citocinas “Th-1”, “Th-2” y “Th-17”, de muy reciente descripción, apenas se han estudiado.

5. Ausencia de comparación con un grupo control, formado por voluntarios sanos: Petrikis et al., 2017.

6. Falta de control de potenciales variables de confusión o modificadoras del efecto. El consumo de cannabis no se ha tenido en cuenta en el diseño de los siguientes estudios: Sirota et al., 2005; Miller et al., 2011; Tourjman et al., 2013; Ding et al., 2014; Noto et al., 2014; Song et al., 2014; Upthegrove et al., 2014; Capuzzi et al., 2017. Además, varios de los estudios y metaanálisis que han analizado hasta el momento actual la concentración sérica de citocinas/quimiocinas en los PEP, o no han tenido en cuenta el IMC ni en el diseño del estudio ni en los análisis (Sirota et al., 2005; Miller et al., 2011; Tourjman et al., 2013; Noto et al., 2014; Upthegrove et al., 2014; Capuzzi et al., 2017) o directamente han excluído a los sujetos con sobrepeso (Di Nicola et al., 2013; Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Petrikis et al., 2015, 2017).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, ninguna investigación previa ha estudiado los niveles séricos de citocinas/quimiocinas estratificando los análisis por el IMC. Considerando la alta prevalencia de sobrepeso/obesidad en la esquizofrenia, sería interesante comprobar si las citocinas/quimiocinas podrían utilizarse como biomarcadores de sangre periférica en los PEP, con independencia del IMC de los sujetos.

7. Análisis conjunto de sujetos con PEP y esquizofrenia crónica: Miller et al., 2011; Borovcanin et al., 2013, Tourjman et al., 2013.

8. **Ausencia de estudios que comparen el efecto antiinflamatorio de los antipsicóticos.** La selección del antipsicótico en el PEP es una decisión importante que influye en el curso y el pronóstico de la enfermedad (Crespo-Facorro et al., 2016). El aripiprazol y la risperidona se encuentran entre los antipsicóticos de segunda generación más utilizados en la práctica clínica. Varios estudios los han comparado en términos de eficacia y seguridad (Crespo-Facorro et al., 2016; Robinson et al., 2015). Sin embargo, ninguna investigación previa ha comparado su efecto antiinflamatorio.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivos

Primer estudio:

- A. Comparar los niveles séricos de 21 citocinas/quimiocinas entre voluntarios sanos e individuos con un PEP *drug-naïve*.
- B. Comparar el efecto antiinflamatorio de aripiprazol y risperidona tras 3 meses de tratamiento.
- C. Estudiar si existe una correlación entre el estado clínico e inflamatorio después de 3 meses de tratamiento antipsicótico.

Segundo estudio:

- A. Estudiar la influencia del sobrepeso en la detección en sangre periférica de la neuroinflamación que está presente en los PEP:
 - Comparar los niveles séricos de 21 citocinas/quimiocinas entre voluntarios sanos e individuos con un PEP *drug-naïve*, estratificando los análisis por IMC.
 - Comparar los niveles séricos 21 citocinas/quimiocinas entre voluntarios sanos con normopeso y voluntarios sanos con sobrepeso.
 - Comparar los niveles séricos de 21 citocinas/quimiocinas entre pacientes *drug-naïve* con normopeso y pacientes *drug-naïve* con sobrepeso.

3.2. Hipótesis

Los pacientes con un PEP *drug-naïve* presentarán una alteración en la homeostasis del sistema inmune, bien por un aumento de citocinas/quimiocinas proinflamatorias, o bien por una disminución de citocinas antiinflamatorias. Esta alteración de la homeostasis del sistema inmune se corregirá, al menos parcialmente, con el tratamiento antipsicótico. Teniendo en cuenta la interconexión que se ha descrito entre células del sistema inmune en el SNC y neuronas dopaminérgicas, postulamos que el aripiprazol, que es un agonista parcial de los receptores dopaminérgicos D2, y por tanto su efecto sobre estos receptores depende de los niveles extracelulares de dopamina, podría producir una mejor regulación del sistema inmune que la risperidona, que es un antagonista de los receptores dopaminérgicos D2 cuyo efecto antagonista se produce en todas las vías dopaminérgicas del SNC, con independencia de los niveles extracelulares de dopamina. Asimismo, considerando el efecto antiinflamatorio de los antipsicóticos, esperamos encontrar una correlación significativa entre la mejoría clínica y la disminución de la inflamación medida en sangre periférica tras 3 meses de tratamiento.

Teniendo en cuenta que vamos a estudiar la neuroinflamación asociada al PEP de forma indirecta, mediante el estudio de citocinas/quimiocinas en suero, es probable que los resultados que obtengamos infraestimen la neuroinflamación real. Como se ha descrito, el exceso de peso se asocia a una inflamación sistémica de “bajo grado” que podría actuar como un *first-hit*, alterando la homeostasis del sistema inmune en sangre periférica y permitiendo que se detecte mejor la neuroinflamación asociada al PEP, que sería el *second-hit*. Es decir, sobre una alteración previa de la homeostasis del sistema inmune en sangre periférica producida por el exceso de peso, sería más sencillo detectar en sangre periférica la neuroinflamación asociada al PEP. Por lo tanto, en los análisis llevados a cabo, esperaríamos encontrar mayores diferencias entre los pacientes *drug-naïve* con sobrepeso y los voluntarios sanos con sobrepeso, que entre los pacientes con normopeso y los voluntarios sanos con normopeso. Además, esperaríamos encontrar mayores diferencias en los niveles séricos de citocinas/quimiocinas entre los pacientes con sobrepeso y los pacientes con normopeso que entre los voluntarios sanos con sobrepeso y los voluntarios sanos con normopeso, porque en estos últimos no estaría presente el *second-hit*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. **Ámbito del estudio**

Los datos de los estudios que constituyen esta tesis doctoral se han obtenido de una cohorte de pacientes que han sido tratados en un programa longitudinal de intervención denominado Programa de Atención a las Fases Iniciales de Psicosis (PAFIP) en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). Se trata de un programa de intervención clínica y de investigación, que abarca a la población con un PEP de Cantabria (Crespo-Facorro et al., 2005).

En lo referente a la clínica, el programa incorpora estrategias de identificación de personas de riesgo, así como de diagnóstico e intervención precoz. Su objetivo es la atención clínica intensiva, multidisciplinar y personalizada de los sujetos con un PEP durante los 3 años siguientes al inicio de la psicosis, considerando este como el periodo crítico de la enfermedad. Para ello incorpora una fase de intervención aguda intensiva precoz, que se extiende durante los 3 primeros meses y en la que el énfasis se hace sobre el tratamiento farmacológico y una fase de seguimiento a medio plazo que se prolonga durante los tres años siguientes e incorpora además estrategias de intervención psicológica y social, con el objetivo de lograr una remisión psicopatológica precoz, una recuperación funcional, prevenir recaídas, realizar psicoeducación sobre factores de riesgo y factores protectores, prevenir tanto la discapacidad como el estigma y favorecer la reintegración social y laboral.

A nivel de investigación, el programa incorpora líneas de investigación clínica, farmacológica, inmunológica, neurocognitiva, de imagen cerebral, de metabolismo y genética. Su objetivo es profundizar en el conocimiento del origen de la enfermedad y en los factores que condicionan su curso evolutivo y recuperación psicopatológica y funcional, investigando también la efectividad, aceptabilidad y relación coste-efectividad de las intervenciones y estructuras asistenciales que son utilizadas para su tratamiento.

Los estudios y proyectos de investigación del programa PAFIP, incluidos los que forman parte de esta tesis, se han llevado a cabo de acuerdo con los estándares internacionales de ética en investigación clínica y fueron aprobados por el Comité

Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Cantabria. Tanto los pacientes como sus familiares dieron su consentimiento por escrito para participar en las diversas áreas de investigación del programa.

4.2. Muestra del estudio

➤ Criterios de inclusión para los pacientes

- Edad entre 15 y 50 años en el momento de inclusión al programa PAFIP.
- Residencia habitual en Cantabria.
- Presentar un PEP. Definimos como PEP a aquellos sujetos con sintomatología psicótica no afectiva, independientemente del tiempo de evolución de los síntomas psicóticos, que contactan por primera vez con un equipo especializado de salud mental.
- Ausencia de tratamiento previo con antipsicóticos, a cualquier dosis o durante cualquier tiempo. Es decir, sólo se incluyen a los individuos *drug-naïve*.
- Ausencia de antecedentes de enfermedades autoinmunes o uso reciente de glucocorticoides. Esta información se obtuvo de la anamnesis y/o revisando la historia clínica de los pacientes.
- Diagnóstico en el momento de la inclusión de alguno de las siguientes patologías: trastorno psicótico breve, trastorno esquizofreniforme, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo o trastorno psicótico no especificado, que será confirmado 6 meses después de la inclusión al programa por un psiquiatra con experiencia, utilizando la Entrevista Clínica Estructurada para el DSM-IV (SCID-I).

➤ **Criterios de exclusión para los pacientes**

- Cumplir criterios diagnósticos del DSM-IV para el trastorno por dependencia de sustancias o discapacidad intelectual.
- Antecedentes de daño cerebral o enfermedad neurológica.

➤ **Criterios de selección de los voluntarios sanos**

Mediante una versión abreviada de la escala CASH (Comprehensive Assessment of Symptoms and History) (Andreasen et al., 1992), se constató que ningún voluntario sano presentaba antecedentes de enfermedad psiquiátrica o neurológica, dependencia de sustancias y/o traumatismo craneoencefálico con pérdida de consciencia. Asimismo, se confirmó en todos los casos la ausencia de familiares de primer grado con diagnóstico de psicosis.

4.3. Diseño de la tesis doctoral

Se trata de un estudio experimental, randomizado, prospectivo y abierto. Del total de pacientes que fueron incluidos en el programa PAFIP desde junio de 2011 hasta mayo de 2016, se seleccionó una muestra de 75 pacientes teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión antes descritos. Asimismo, se han seleccionado 75 voluntarios sanos mediante anuncios a la comunidad, de edades entre 18 y 50 años, con características sociodemográficas (sexo, edad, IMC, consumo de tabaco y de cannabis) similares a los pacientes.

En el momento de inclusión en el programa y antes de iniciar la medicación, se realizaron los siguientes procedimientos: analítica de sangre en ayunas, recogida de medidas antropométricas (peso y talla) y evaluación psicopatológica mediante la utilización de tres escalas clínicas (BPRS, SANS y SAPS) y una entrevista estructurada, que se describirán en detalle en el siguiente apartado. Posteriormente, por un método de randomización generado por un ordenador y controlado por un estadístico, se aleatorizó a los pacientes a dos posibles líneas de tratamiento:

risperidona y aripiprazol. Tras 3 meses de tratamiento se repitió la analítica de sangre en ayunas y se volvieron a obtener las medidas antropométricas.

La dosis media de antipsicótico expresada como equivalentes de clorpromazina (CPZeq) (Wood, 2003) utilizada durante el tiempo de seguimiento (3 meses) fueron las siguientes: risperidona 1–6 mg/day (50–300 mg/day CPZeq) y aripiprazol 5–30 mg/day (66.7–400 mg/day CPZeq). Durante el periodo de seguimiento, la dosis y el tipo de antipsicótico pudieron modificarse a criterio del psiquiatra encargado del seguimiento por razones de eficacia clínica y de tolerancia a los efectos adversos. Asimismo, se pudo utilizar otra medicación concomitante como anticolinérgicos, benzodiazepinas, hipnóticos, antidepresivos o estabilizadores del humor si eran clínicamente necesarios. Se analizó la posibilidad de que el uso de esta medicación concomitante pudiese actuar como posible factor de confusión, sesgando los resultados en alguno de los dos brazos de tratamiento. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el uso de medicación concomitante entre los pacientes asignados a risperidona o a aripiprazol, ni se encontró una relación estadísticamente significativa entre alguna medicación concomitante y los niveles séricos de las 21 citocinas/quimiocinas estudiadas.

Además, en cada uno de los estudios se analizó la probabilidad de que el resto de variables sociodemográficas (sexo, edad, IMC, consumo de tabaco y consumo de cannabis) pudiesen actuar como potenciales factores de confusión o variables modificadoras del efecto.

Para confirmar la hipótesis de esta tesis doctoral, se han llevado a cabo dos estudios que, aunque se han basado en la misma muestra de pacientes y voluntarios sanos, cada uno se ha diseñado para poder dar respuesta a los distintos objetivos de este trabajo de investigación.

Primer estudio

Para evaluar la actividad inflamatoria inicial de los pacientes y comparar el efecto antiinflamatorio de la risperidona y del aripiprazol, se ha realizado una comparación basal de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas entre los voluntarios sanos y los dos grupos de pacientes (los que van a tomar risperidona y los que van a tomar aripiprazol). Dado que se observó que los voluntarios sanos

presentaban de forma estadísticamente significativa un IMC mayor que los dos grupos de pacientes (IMC = 25,1 kg/m² en el grupo de voluntarios sanos; IMC = 23,2 kg/m² en el grupo que va a tomar risperidona; IMC = 21,8 kg/m² en el grupo que va a tomar aripiprazol), este análisis se realizó utilizando el IMC como covariable. Posteriormente, se compararon los niveles séricos de citocinas/quimiocinas dentro de cada grupo de tratamiento después de los 3 meses de seguimiento, con los niveles séricos de citocinas/quimiocinas de los voluntarios sanos. Para comparar el efecto antiinflamatorio de ambos fármacos se utilizaron tanto el porcentaje de cambio del nivel sérico de citocinas/quimiocinas, como un coeficiente de correlación como medida del tamaño del efecto. Finalmente, se analizó la posible correlación entre el porcentaje de cambio de las escalas clínicas utilizadas (BPRS, SANS y SAPS) y el porcentaje de cambio de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas.

Segundo estudio

Para responder a la hipótesis de que el sobrepeso puede actuar como un *first-hit* que ayude a detectar en sangre periférica el estado neuroinflamatorio que está presente en los PEP (*second-hit*), se ha estratificado la muestra de pacientes y de voluntarios sanos en dos grupos de acuerdo a su IMC: sujetos con normopeso (IMC < 25kg/m²) y sujetos con sobrepeso (IMC ≥ 25kg/m²). Los niveles séricos basales de las 21 citocinas/quimiocinas se han analizado en cuatro comparaciones: (1) entre voluntarios sanos con normopeso y pacientes con normopeso; (2) entre voluntarios sanos con sobrepeso y pacientes con sobrepeso; (3) entre voluntarios sanos con normopeso y voluntarios sanos con sobrepeso; y (4) entre pacientes con normopeso y pacientes con sobrepeso. Aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas en algunas variables sociodemográficas entre los voluntarios sanos y los pacientes, por ejemplo para el IMC en el grupo de normopeso (los voluntarios sanos tenían mayor IMC que los pacientes (t = -4,06; p = 0,000), aunque dentro de la categoría de “normopeso”) y para la edad y el consumo de cannabis en el grupo de sobrepeso (los pacientes tenían más edad (t = 2,49; p = 0,017) y consumían menos cannabis (X² = 10,97; p = 0,001) que los voluntarios sanos), la valoración clínica y estadística de estas variables no recomendó utilizarlas como covariables en el análisis estadístico. Sin embargo, se realizaron análisis complementarios para la correcta

interpretación de los resultados, que se describirán detalladamente en el apartado de Discusión de esta tesis doctoral.

4.4. Evaluación clínica

La evaluación psicopatológica se ha realizado a través de las siguientes escalas y entrevistas clínicas:

- Versión española del Brief Psychiatric Rating Scale –BPRS– (Overall & Gorham, 1964). La escala BPRS hace una evaluación de las características de los principales síntomas psiquiátricos. La versión utilizada consta de 24 ítems, cada uno de los cuales se puntúa en una escala del 1 al 7, donde la puntuación 1 es equivalente a “ausencia del síntoma”, 2 “muy leve”, 3 “leve”, 4 “moderado”, 5 “moderadamente grave”, 6 “grave” y 7 “extremadamente grave”.
- Versión española de la Scale for the Assessment of Negative Symptoms –SANS– (Andreasen, 1983). Dicha escala consta de cinco ítems que están relacionados con los síntomas de alogia, apatía, asociabilidad, aplanamiento afectivo y atención.
- Versión española de la Scale for the Assessment of Positive Symptoms –SAPS– (Andreasen, 1984). Dicha escala consta de cinco ítems que están relacionados con delirios, alucinaciones, conducta extravagante, trastornos formales del pensamiento y afecto inapropiado.
- Versión española de la entrevista psiquiátrica SCID-I (The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders). Se trata de una entrevista psiquiátrica estructurada que permite diagnosticar los trastornos psiquiátricos incluidos en el Eje I del DSM-IV.

La evaluación clínica y la aplicación de todas las escalas fueron realizadas por el mismo psiquiatra, previamente entrenado en la utilización de los instrumentos

de evaluación, tanto en el primer contacto de los pacientes con el programa como después de 3 meses de tratamiento. El mismo psiquiatra confirmó el diagnóstico a los 6 meses del primer contacto a través de una entrevista psiquiátrica estructurada, la SCID-I (The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders).

4.5. Cuantificación de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas

Los niveles séricos de citocinas/quimiocinas se han medido utilizando el protocolo del kit “Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel”, Milliplex® Map Kit” (nº de catálogo HSTCMAG28SPMX21, EMD Millipore, Billerica, MA 01821, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Profundizando en el procedimiento llevado a cabo, las placas de ensayo se lavaron con un tampón de lavado, se sellaron y se mezclaron en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el tampón de lavado y se añadieron en los pocillos apropiados 50 µL de los patrones diluidos, controles de calidad y muestras de suero. Después de la adición de las muestras o controles, las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C en un agitador de placas con “microbeads” recubiertas con un anticuerpo de captura de marcas fluorescentes para detectar las siguientes citocinas/quimiocinas: Fractalkine, GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17α, IL-21, IL-23, ITAC, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α y TNF-α. Después de una noche de incubación con anticuerpos de captura se lavó con un imán de mano. A continuación, se añadieron 50 µL de anticuerpos de detección biotinilados en cada pocillo y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente mientras se agitaba. Posteriormente, sin eliminar el contenido del pocillo, se añadieron 50 µL de estreptavidina-ficoeritrina en cada pocillo. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las muestras se lavaron usando un imán de mano y se resuspendieron en un fluido envolvente. Finalmente, las muestras se corrieron en Luminex 100/200 y los datos se recolectaron usando el software Luminex xPONENT® (v. 3.1). El citómetro de flujo Luminex, es un citómetro de flujo automatizado con una tecnología abierta que permite realizar diversos ensayos para cuantificar distintos parámetros biológicos, reduciendo tiempos, manipulación y sobrecostos respecto a métodos más tradicionales como el Western Blot, ELISA o los *arrays* de proteínas tradicionales. El análisis de la

intensidad media de fluorescencia de citocinas/quimioquinas (MFI) se realizó con el software MasterPlex® QT (v1.1). Los coeficientes de variación intra e interensayo para todas las citocinas/quimioquinas analizadas fueron <5 y <15-20%, respectivamente.

Los parámetros a analizar, así como la concentración mínima detectable en el kit *EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel* son los indicados en la *Tabla 1*. Se trata de un kit especialmente desarrollado para obtener la mayor sensibilidad posible.

Tabla 1. EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel:

Analyte	Overnight Protocol (n = 7 Assays)	
	MinDC (pg/mL)	MinDC+2SD (pg/mL)
ITAC	1.25	1.98
GM-CSF	0.35	0.60
Fractalkine	8.17	12.53
IFN γ	0.48	0.94
IL-10	0.56	0.93
MIP-3 α	0.83	1.39
IL-12 (p70)	0.15	0.27
IL-13	0.23	0.34
IL-17A	0.33	0.52
IL-1 β	0.14	0.24
IL-2	0.19	0.30
IL-21	0.14	0.20
IL-4	1.12	1.84
IL-23	3.25	5.11
IL-5	0.12	0.22
IL-6	0.11	0.17
IL-7	0.42	0.60
IL-8	0.13	0.25
MIP-1 α	0.94	1.28
MIP-1 β	0.67	0.98
TNF α	0.16	0.21

4.6. Análisis estadístico

Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para examinar la normalidad de los datos y el test de Levene para analizar la homogeneidad de varianzas. La distribución tanto de las 21 citocinas/quimioquinas, como de las tres escalas clínicas

(BPRS, SANS, SAPS) no sigue una ley normal, por lo que se han utilizado tests no paramétricos para su análisis. Asimismo, para comparar la edad entre los grupos se ha corregido la heterogeneidad de las varianzas.

Los datos sociodemográficos y las puntuaciones totales de las escalas clínicas se analizaron mediante el test T-Student, el test de suma de rangos W-Wilcoxon, el test Chi-Cuadrado, o el test exacto de Fisher según fuera necesario.

Para describir las muestras, se utilizaron las medias y desviaciones estándar o las medianas y rangos intercuartiles (IQR) en el caso de variables cuantitativas, dependiendo de si las variables seguían o no una distribución normal. En el caso de variables cualitativas, se utilizó el número total de observaciones y los porcentajes. Las medianas de las concentraciones séricas de citocinas/quimiocinas y los IQR fueron representadas por Box Plots después de realizar una transformación logarítmica con el objetivo de poder representar en una misma figura citocinas/quimiocinas con concentraciones séricas dispares.

Primer estudio

Para comparar los niveles séricos basales de las 21 citocinas/quimiocinas entre los dos grupos de antipsicóticos y el grupo de voluntarios sanos se utilizó una regresión múltiple no paramétrica covariando por el IMC. Asimismo, se utilizaron tests no paramétricos para comparar el cambio en las concentraciones séricas de citocinas desde el inicio hasta los 3 meses posteriores al inicio del tratamiento dentro de los grupos de risperidona y aripiprazol (W-Wilcoxon Singed-Rank test para datos dependientes), así como para comparar el porcentaje de cambio de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas entre los dos fármacos (W-Wilcoxon Singed-Rank para datos independientes). Para analizar el tamaño del efecto de las variaciones de citocinas/quimiocinas dentro de cada grupo antipsicótico durante el período de seguimiento, se calculó el coeficiente de correlación (r) dividiendo el valor Z del test W-Wilcoxon para datos dependientes entre la raíz cuadrada de N (número total de observaciones, considerando los dos momentos de seguimiento), tal y como describieron Fritz y colegas (2012). El coeficiente r es una medida estandarizada de la fuerza y dirección de la relación lineal entre dos variables que va desde -1 para una relación negativa perfecta y 1 para una relación positiva perfecta. Se han considerado los siguientes umbrales para interpretar los resultados (Cohen, 1992): $r = <0.1$ (nulo

o trivial); $r=0.1-0.2$ (pequeño); $r = 0.3-0.4$ (medio); $r =$ de 0.5 en adelante (grande). Cuando se comparan dos coeficientes r , se considera una diferencia significativa si se produce un cambio de umbral, por ejemplo, de pequeño a medio o de medio a grande. Finalmente, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para analizar la correlación entre el porcentaje de cambio de la puntuación total de las escalas clínicas y el porcentaje de cambio de los 21 niveles séricos de citocinas/quimiocinas.

Se realizó un análisis por protocolo para comparar el efecto inmunomodulador de ambos antipsicóticos. Hemos elegido este método porque nuestro objetivo es estudiar el efecto antiinflamatorio de aripiprazol y risperidona tras 3 meses de tratamiento. Por lo tanto, para este propósito, solo hemos considerado aquellos pacientes que alcanzaron el final del período de seguimiento sin cambiar de antipsicótico.

Teniendo en cuenta que en este estudio se contrastan múltiples hipótesis en la misma muestra, y eso puede producir un aumento del error tipo I, y por ende de falsos positivos, y considerando nuestra investigación como exploratoria, decidimos utilizar un umbral de significación estadística más conservador ($\alpha = 0,01$), en lugar de aplicar una corrección de Bonferroni, ya que esta corrección es demasiado conservadora cuando se realizan múltiples comparaciones, tendiendo a aumentar el error de tipo II, y por lo tanto los falsos negativos (Rothman, 2014).

Segundo estudio

Para dar respuesta a la hipótesis de que la inflamación sistémica asociada al exceso de peso ayuda a detectar en sangre periférica la neuroinflamación presente en los PEP, se utilizó el W-Wilcoxon Signed-Rank test para datos independientes, estratificando los análisis por IMC. Se ha utilizado un IMC de 25 kg/m² como punto de corte para diferenciar a los individuos con normopeso de los individuos con sobrepeso (Consenso SEEDO, 2007).

En este estudio, con el mismo objetivo de minimizar el error tipo I, se disminuyó el umbral de significación estadística a $\alpha = 0,01$.

El análisis estadístico de los datos se ha realizado con STATA 15.0. Las pruebas estadísticas realizadas fueron bilaterales, con un intervalo de confianza del 99%.

5. RESULTADOS

5.1. Primer estudio

Comparison of the anti-inflammatory effect of aripiprazole and risperidone in 75 drug-naïve first episode psychosis individuals: A 3 months randomized study.

Juncal-Ruiz M, Riesco-Dávila L, Ortiz-García de la Foz V, Martínez-García O, Ramírez-Bonilla M, Ocejo-Viñals JG, Leza JC, López-Hoyos M, Crespo-Facorro B.

Schizophr Res. 2018 Jun 22 (*article in press*). doi: 10.1016/j.schres.2018.06.039.

IF (2017): 3.958; Q1.

A continuación se enumeran los hallazgos encontrados en este estudio:

- La gravedad psicopatológica en el momento basal, evaluada por las escalas clínicas BPRS, SANS y SAPS, fue similar entre los dos grupos de pacientes.
- Los pacientes asignados a risperidona tenían unos niveles séricos basales más elevados de dos quimiocinas, IL-8 y MIP-1 β , respecto al grupo de voluntarios sanos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas entre los pacientes asignados a aripiprazol y los voluntarios sanos ni entre los dos grupos de tratamiento (ver *Figuras 1 y 2*).
- Tras 3 meses de tratamiento, se objetivó una disminución estadísticamente significativa en la gravedad psicopatológica medida por las escalas BPRS, SANS y SAPS en los dos grupos de antipsicóticos, sin encontrar diferencias entre ellos.
- Después de 3 meses de tratamiento, en los dos grupos de antipsicóticos se encontró una disminución estadísticamente significativa o una tendencia hacia la significación estadística para varias citocinas/quimiocinas, tal y

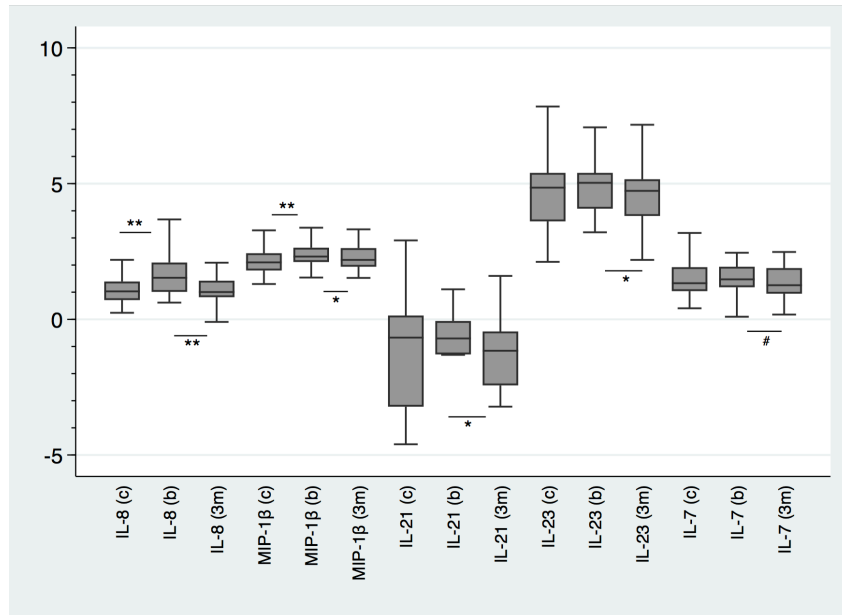
como se muestra en las *Figuras 1 y 2*: IL-8, MIP-1 β , IL-21, IL-23, IL-7 en el grupo de risperidona y TNF- α , IL-8, Fractalkine, IL-21, IL-17 α e IL-13 en el grupo de aripiprazol.

- No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de citocinas/quimiocinas tras 3 meses de tratamiento entre los dos grupos de antipsicóticos y los voluntarios sanos.
- No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de cambio entre los dos tratamientos.
- Se observó un mayor tamaño del efecto de aripiprazol sobre risperidona en IL-6, TNF- α , IL-17 α , IL-13 y Fractalkine. Risperidona mostró un mayor tamaño del efecto que aripiprazol en MIP-1 β .
- No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la disminución de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas y la disminución de la puntuación total de las escalas clínicas (BPRS, SANS y SAPS) tras 3 meses de tratamiento.

Por lo tanto, este estudio apoya la existencia de un estado proinflamatorio en los PEP, que revierte tras el tratamiento antipsicótico. Asimismo, subraya el papel que pueden tener las quimiocinas en la neuroinflamación asociada al PEP, sobre todo la IL-8 y MIP-1 β .

Aunque el efecto antiinflamatorio es similar entre los dos antipsicóticos, se ha encontrado que el aripiprazol tiene un mayor tamaño del efecto que la risperidona sobre algunas citocinas/quimiocinas.

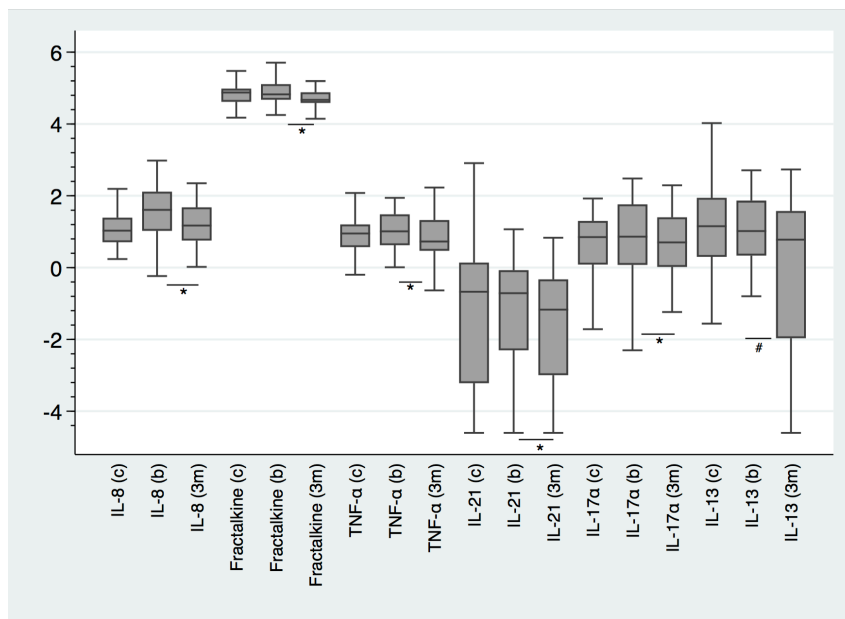
Figura 1: Citocinas/quimiocinas con significación estadística en la comparación entre los voluntarios sanos y el grupo de risperidona en el momento basal y después de 3 meses de tratamiento



Datos en escala logarítmica. * ($p < 0,01$); ** ($p < 0,001$); # ($p = 0,013$)

c: grupo control o de voluntarios sanos
 b: niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas en el grupo de risperidona
 3m: niveles séricos de citocinas/quimiocinas tras 3 meses de tratamiento con risperidona

Figura 2: Citocinas/quimiocinas con significación estadística en la comparación entre los voluntarios sanos y el grupo de aripiprazol en el momento basal y después de 3 meses de tratamiento



Datos en escala logarítmica. * ($p < 0,01$); ** ($p < 0,001$); # ($p = 0,011$)

c: grupo control o de voluntarios sanos
 b: niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas en el grupo de aripiprazol
 3m: niveles séricos de citocinas/quimiocinas tras 3 meses de tratamiento con aripiprazol

5.2. Segundo estudio

The effect of excess weight on circulating inflammatory cytokines in drug-naïve first-episode psychosis individuals.

Juncal-Ruiz M, Riesco-Dávila L, Ortiz-García de la Foz V, Ramírez-Bonilla M, Martínez-García O, Irure-Ventura J, Leza JC, López-Hoyos M, Crespo-Facorro B.

J Neuroinflammation. 2018 Feb 28;15(1):63. doi: 10.1186/s12974-018-1096-6.

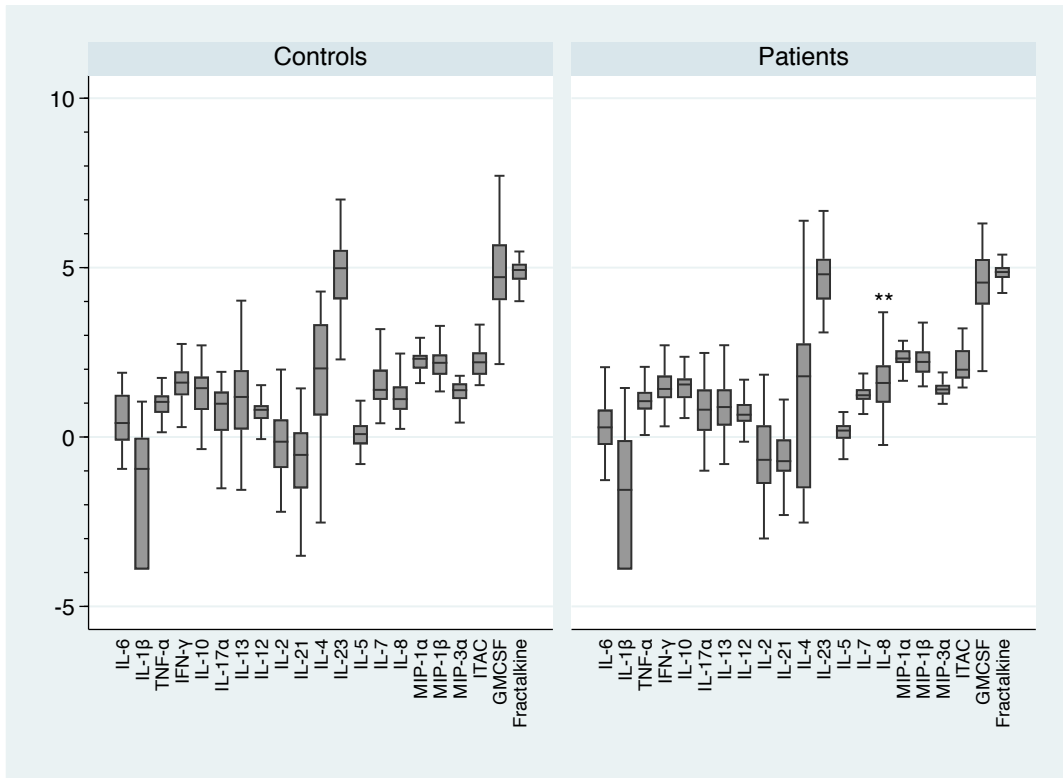
IF (2017): 5.193; Q1.

A continuación, se enumeran los hallazgos encontrados en el segundo estudio:

- En el grupo con normopeso, sólo se detectó un aumento estadísticamente significativo de la IL-8 en los pacientes respecto a los voluntarios sanos (ver *Figura 1*).
- En el grupo con sobrepeso, los pacientes presentaron un aumento estadísticamente significativo de las siguientes citocinas/quimiocinas respecto a los voluntarios sanos: IL-6, IL-1 β , IL-13, IL-12, IL-2, IL-23, IL-7, IL-8 y MIP-1 β . (ver *Figura 2*).
- No se encontraron diferencias significativas entre los voluntarios sanos con normopeso y con sobrepeso (ver *Figura 3*).
- Los pacientes con sobrepeso presentaron una elevación estadísticamente significativa de las siguientes citocinas/quimiocinas respecto a los pacientes con normopeso: IL-6, IL-13, IL-2, IL-7 y MIP-1 β (ver *Figura 4*).

Este estudio apoya la hipótesis inicial de que la inflamación sistémica de “bajo grado” asociada al exceso de peso, actuaría como *first-hit* facilitando la detección en sangre periférica de la neuroinflamación que está presente en el PEP.

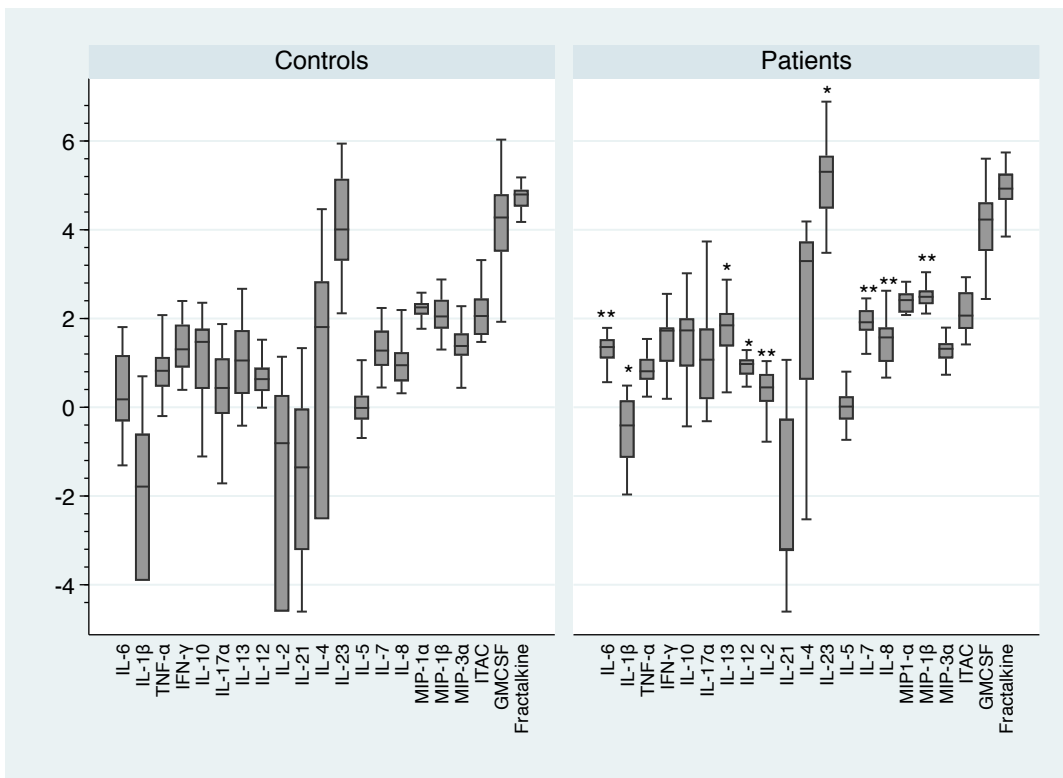
Figura 1. Niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas en los grupos de pacientes y voluntarios sanos con normopeso (IMC < 25)



Datos en escala logarítmica

* ($p < 0,01$); ** ($p < 0,001$)

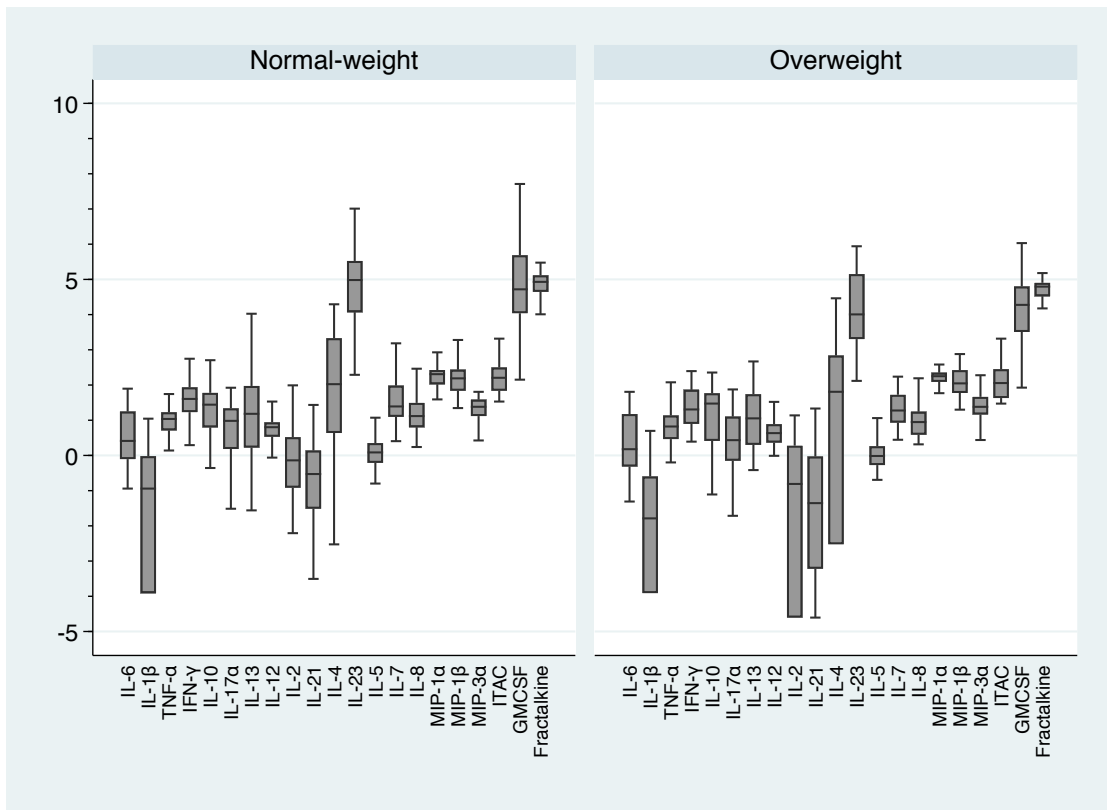
Figura 2. Niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas en los grupos de pacientes y voluntarios sanos con sobrepeso (IMC ≥ 25)



Datos en escala logarítmica

* ($p < 0,01$); ** ($p < 0,001$)

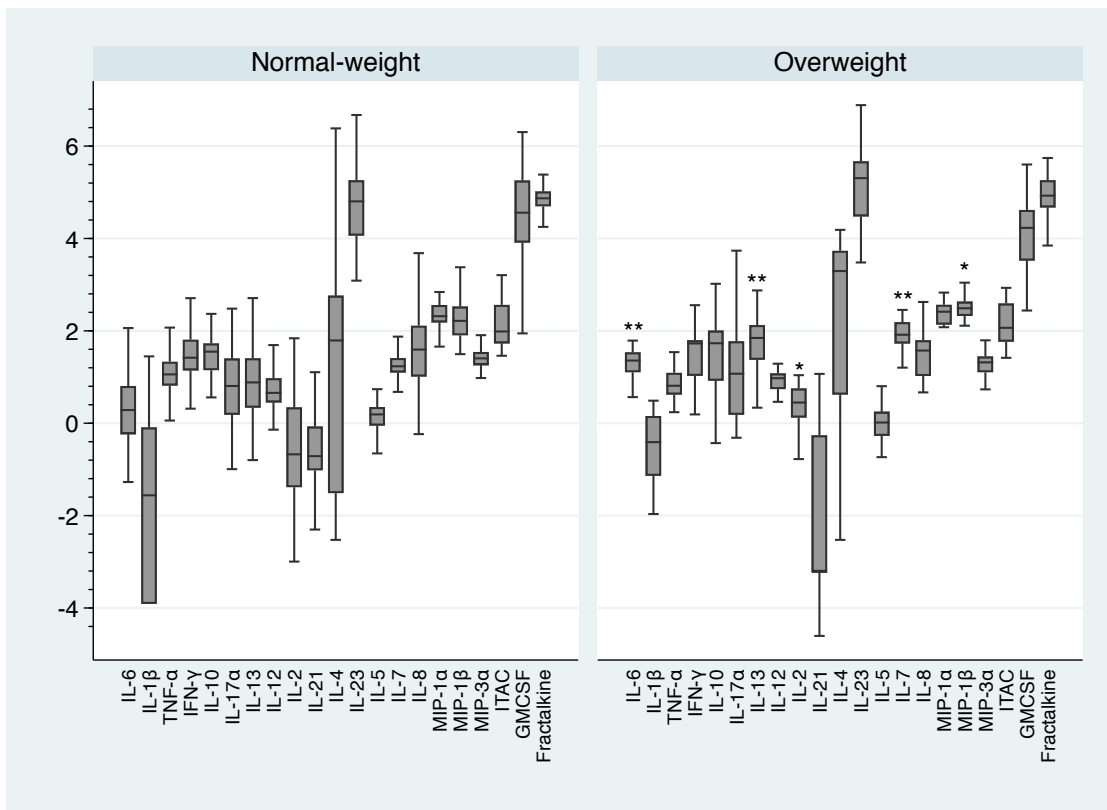
Figura 3. Niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas en el grupo de voluntarios sanos



Datos en escala logarítmica

* ($p < 0,01$); ** ($p < 0,001$)

Figura 4. Niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas en el grupo de pacientes



Datos en escala logarítmica

* ($p < 0,01$); ** ($p < 0,001$)

6. PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

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

Comparison of the anti-inflammatory effect of aripiprazole and risperidone in 75 drug-naïve first episode psychosis individuals: A 3 months randomized study

María Juncal-Ruiz ^{a,*}, Laura Riesco-Dávila ^c, Víctor Ortiz-García de la Foz ^b, Obdulia Martínez-García ^b, Mariluz Ramírez-Bonilla ^b, Javier Gonzalo Ocejo-Viñals ^c, Juan Carlos Leza ^{e,f,g}, Marcos López-Hoyos ^c, Benedicto Crespo-Facorro ^{b,d,**}

^a Department of Psychiatry, Sierrallana Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Torrelavega, Spain

^b Department of Psychiatry, Marqués de Valdecilla University Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

^c Department of Immunology, Marqués de Valdecilla University Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

^d Centro de investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Santander, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Complutense University, Madrid, Spain

^f Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

^g Instituto de Investigación Sanitaria (IIS), Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2018

Received in revised form 3 June 2018

Accepted 13 June 2018

Available online xxxxx

Keywords:

Psychosis
Antipsychotic
Inflammatory
Cytokines
Chemokines

ABSTRACT

Introduction: Evidence about the anti-inflammatory properties of antipsychotics has grown. However, no previous studies have compared the immunomodulatory effect of risperidone and aripiprazole.

Objectives: The main aim of the present work is to compare the anti-inflammatory effect of risperidone and aripiprazole on a large array of serum cytokines at 3 months following the onset of treatment.

Methods: This is a prospective, randomized, open-label study. Patients were randomly assigned to risperidone or aripiprazole. From this randomization, 75 patients and 75 healthy volunteers that matched with the selected patients were picked for entry in this study. Serum concentrations of 21 cytokines/chemokines were measured at baseline and 3 months following the initiation of antipsychotic medication.

Results: Those patients who were randomly assigned to risperidone had higher levels of IL-8 ($p = 0.000$) and MIP-1 β ($p = 0.007$) than healthy volunteers at baseline, whereas no differences were found between patients initially assigned to aripiprazole and healthy volunteers. Three months following the onset of medication several cytokines decreased significantly: IL-8, MIP-1 β , Fractalkine, TNF- α , IL-7, IL-13, IL-17 α , IL-23, IL-21 (all $ps < 0.01$). No differences were found in the percentages of change between both treatments. The effect size of the two antipsychotics was similar, except for TNF- α , IL-13, IL-17 α and Fractalkine, in which aripiprazole seems to have a greater effect size than risperidone, whereas risperidone seems to have a greater effect size than aripiprazole on MIP-1 β .

Conclusions: This is the first study that has compared the immunomodulatory effect of risperidone and aripiprazole, finding that the anti-inflammatory effect of both treatments was similar.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, evidence about the involvement of the immune system in the development and evolution of psychosis has grown (Bergink

et al., 2014; Hartwig et al., 2017). It is known that some genes involved in schizophrenia match several genes involved in the defense against pathogens (Carter, 2009). The production of pro-inflammatory cytokines and free radicals of oxygen and nitrogen, as well as the sustained activation of microglia during the first stages of life, lead to changes in both structure and brain function, such as the reduction in glutamatergic neurons in some brain areas (Li et al., 2005; Larsen et al., 2007; Rothermundt et al., 2007; Monji et al., 2009), similar to the glutamatergic hypofunction found in patients with schizophrenia (Chew et al., 2013; Kahn and Sommer, 2015). In fact, the pro-inflammatory response found in at least a subgroup of patients, has been related to brain

* Correspondence to: M.J. Ruiz, Department of Psychiatry, Sierrallana Hospital, Torrelavega, Spain

** Correspondence to: B.C. Facorro, Department of Psychiatry, Marqués de Valdecilla University Hospital, School of Medicine, University of Cantabria, Avda, Vadelcilla s/n, 39008 Santander, Spain.

E-mail addresses: mjuncal11@gmail.com (M. Juncal-Ruiz), bcfacorro@humv.es (B. Crespo-Facorro).

volume loss in both schizophrenia and first-episode psychosis (FEP) individuals (Leza et al., 2015). Impaired immune response, along with biological, genetic and environmental factors leads to FEP later in life (Kinney et al., 2010). However, cytokines may be also altered by other causes such as stress, cannabis consumption, cardiovascular diseases, obesity and metabolic syndrome, conditions highly prevalent in patients with FEP and chronic schizophrenia (Beumer et al., 2012; Suárez-Pinilla et al., 2014). The effect of stress on cytokines has been also replicated on rodents (García-Bueno et al., 2008).

Several original studies (Crespo-Facorro et al., 2008; Di Nicola et al., 2013; Noto et al., 2014; Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Petrikis et al., 2017) and three meta-analysis (Miller et al., 2011; Upthergrove et al., 2014; Capuzzi et al., 2017) have studied the association between FEP and inflammatory cytokines in humans. Growing evidence has accumulated on the role of IL-1 β , IL-6 and TNF- α as the main altered pro-inflammatory cytokines in FEP (Miller et al., 2011; Di Nicola et al., 2013; Capuzzi et al., 2017). However, several limitations may be present in these studies: (1) small sample sizes (2) reduced number of cytokines studied; (3) limited period of follow-up; (4) uncontrolled confounding variables; (5) lack of control group; and (6) joint analysis of patients with chronic schizophrenia and FEP.

Along these lines, several experimental studies (Kato et al., 2007; MacDowell et al., 2013, 2014; O'Sullivan et al., 2014), two studies carried out on chronic schizophrenia (Sirota et al., 2005; García-Bueno et al., 2016) and several reviews (Kato et al., 2011; Tourjman et al., 2013; Miller and Goldsmith, 2017) have shown anti-inflammatory and antioxidant properties of antipsychotics, suggesting that their effectiveness is not only due to their action on dopaminergic and serotonergic receptors in neurons (classical theory) but also due to a modulating effect on the immune system. There is evidence that antipsychotic medications reduce pro-inflammatory markers such as IL-1 β , IL-2, IL-6, and TNF- α (Müller et al., 1997; Kowalski et al., 2001) and these immune changes may be related to their clinical efficacy (Meyer, 2011). In this line, recent evidence suggests that the immune system may contribute to antipsychotic-induced weight gain via antipsychotic-mediated alterations of cytokine levels (Fonseka et al., 2016). Nevertheless, the pathways through which antipsychotics may function as anti-inflammatory agents have not yet been studied (García-Bueno et al., 2016; Capuzzi et al., 2017) nor has it been ascertained which antipsychotic has the most robust anti-inflammatory effect (Petrikis et al., 2017; Capuzzi et al., 2017).

The selection of an antipsychotic at the first episode of the illness is an important decision, influencing the course and the outcome of the illness (Crespo-Facorro et al., 2016). Aripiprazole and risperidone are among the most used second-generation antipsychotics (SGAs) in clinical practice for psychosis. Several studies have compared them in terms of efficacy and safety (Crespo-Facorro et al., 2016; Robinson et al., 2015). Nevertheless, no previous research has compared their anti-inflammatory effect.

The main aim of the present work is to compare the anti-inflammatory effect of risperidone and aripiprazole on a large array of serum cytokines at three months following the onset of treatment. In addition, we also investigate if there is any difference in the serum cytokine levels between healthy volunteers and patients at baseline and whether serum concentrations change from baseline to 3 months after the initiation of medication.

2. Materials and methods

2.1. Study setting

Data for the present study were obtained from a large epidemiological cohort of patients who have been treated in a longitudinal intervention program of FEP called PAFIP (Programa de Atención a Fases Iniciales de Psicosis) conducted at the University Hospital Marqués de Valdecilla in Cantabria, Spain. Referrals to the PAFIP came from the inpatient unit and the accident and emergency department at the University Hospital

Marqués de Valdecilla, from mental health units, and from other health-care workers throughout the entire region of Cantabria. PAFIP includes inpatient and outpatient care and provides specific and personalized clinical attention from the onset of the illness up to 3 years. The program was approved by the local institutional review board and informed consent was attained from patients and their families prior to inclusion.

2.2. Study design

This is a prospective, randomized, flexible dose, open-label study. We used a simple randomization procedure to select the antipsychotic used between aripiprazole and risperidone. A computer-generated randomization list was drawn up by a statistician. From this randomization, 75 patients were selected to entry in this study considered both inclusion and exclusion criteria which will be explained below. At inclusion, all patients were antipsychotic naïve. Mean antipsychotic dose expressed as chlorpromazine equivalent (CPZeq; mg/day) (Wood, 2003) were as follows: aripiprazole 5–30 mg/day (66.7–400 mg/day of chlorpromazine) and risperidone 1–6 mg/day (50–300 mg/day of chlorpromazine). At the treating physician's discretion, the dose and type of antipsychotic medication could be changed based on clinical efficacy and the profile of side effects during the follow-up period. Antimuscarinic medication, lorazepam, clonazepam, antidepressants and mood stabilizers were permitted if clinically needed.

Fasting venous blood samples were collected at baseline and three months following the onset of treatment.

The use of other concomitant medication, such as antimuscarinic agents, antidepressants, benzodiazepines or mood stabilizers were considered as possible confounding factors in this analysis.

2.3. Subjects

In Jun 2016, 75 patients with FEP, who were previously included in PAFIP from Jun 2011 to May 2016 and were randomized to risperidone or aripiprazole, were selected to entry in this study according to the following criteria: (1) age between 15 and 50, (2) residency in the catchment area, (3) experiencing their first episode of psychosis, (4) no prior treatment with antipsychotic medication, (5) no history of autoimmune diseases or recent use of glucocorticoids and (6) DSM-IV criteria for brief psychotic disorder, schizophreniform disorder, schizophrenia, schizoaffective disorder, or psychotic disorder not otherwise specified. Patients were excluded if they met any of the following criteria: (1) DSM-IV criteria for drug dependence, (2) DSM-IV criteria for mental retardation and (3) history of neurological disorder or brain injury. The diagnoses were confirmed by an experienced psychiatrist, applying the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I) 6 months following the baseline visit.

We selected 75 healthy volunteers with similar characteristics to patients according to the following variables: sex, age, cannabis and tobacco consumption. It was not possible matching by the body mass index (BMI). In a recent work carried out for our research team, we concluded that the BMI has an important effect on the cytokine levels (Juncal-Ruiz et al., 2018). Thus, analyses of serum cytokines levels between healthy volunteers and patients were controlled for BMI.

2.4. Assessments

Clinical psychopathology was assessed using the Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS), the Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS) and the Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) before and after treatment.

Serum cytokine/chemokine concentrations and different profiles were measured using the Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel protocol from the Milliplex® Map Kit (Cat. No. HSTCMAG28SPMX21, EMD Millipore, Billerica, MA 01821, USA), following the manufacturer's instructions. Briefly, assay plates were washed

with wash buffer, sealed, and mixed on a plate shaker for 10 min at room temperature. The wash buffer was decanted and 50 μL of the diluted standards, quality controls and serum samples were added into the appropriate wells. After the addition of the samples or controls, the plates were incubated overnight at 4 °C on a plate shaker with fluorescently-labeled capture antibody-coated beads. After overnight incubation with capture antibodies to detect IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN γ , IL-10, IL-17 α , IL-13, IL-12, IL-2, IL-21, IL-4, IL-23, IL-5, IL-7, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , ITAC, GM-CSF and Fractalkine, well content was removed and washed using a handheld magnet. Then, 50 μL of biotinylated detection antibodies were added into each well and incubated for 1 h at room temperature while shaking. Following, without removing well content, 50 μL of streptavidin-phycoerythrin were added into each well. After incubation for 30 min at room temperature, samples were washed using a handheld magnet and resuspended in sheath fluid. Finally, samples were run on the Luminex 100/200 and data were collected using the Luminex xPONENT® software (v. 3.1). Analysis of the cytokine/chemokine median fluorescence intensity (MFI) was performed using the MasterPlex® QT software (v1.1). The intra and inter-assay coefficients of variation for all cytokines tested were <5% and <15–20%, respectively.

2.5. Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to examine the normality of data. Demographics and clinical measures were analyzed using T-Student test, W-Wilcoxon rank-sum test or Chi-Square test as necessary. A non-parametric multiple regression test controlling for BMI was used to compare the basal levels of the 21 cytokines between the two antipsychotic groups and the healthy volunteers group. Non-parametric univariate tests were performed to compare the change in the serum cytokine concentrations from baseline to 3 months following the onset of treatment within risperidone and aripiprazole groups (Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank test), as well as for comparing the percentage of change in the serum cytokine levels between the two medications (Wilcoxon Signed-Rank test for independent data). For analyzing the effect size of the cytokine variations within each antipsychotic group during the follow-up period, the correlation coefficient (r) was calculated dividing the Z value of the W-Wilcoxon signed-rank test by the square root of N (the number of observations over the two-time points), as it is described elsewhere (Fritz et al., 2012). r is a standardized measure of the strength and direction of linear relationship between two variables ranging from -1 for a perfect negative relationship and 1 for a perfect positive relationship. The follow cut-offs of the r coefficient are considered by Cohen (1988): $r = 0.1$ (small); $r = 0.3$ (medium); $r = 0.5$ (large). Finally, the Spearman's Rank Correlation Coefficients test was used to analyze the correlation between the percentage of change of the total-score of clinical scales and the percentage of change of the 21 serum cytokine levels. As many tests are being conducted, the probability of a type I error (false positive) is increased. Keeping this in mind and considering our research as exploratory, we decided to use a more conservative statistical significance threshold of 0.01 instead of applying a Bonferroni correction in order to avoid type II error (false negative).

For describing the samples, means and standard deviations or medians and interquartile ranges (IQR) were used in the case of continuous variables as necessary, whereas the total number of observations and percentages were used for qualitative variables. Median serum cytokine concentrations and IQR were represented by Box Plots after performing a natural logarithmic transformation.

A per protocol analysis has been performed to compare the immunomodulatory effect of both antipsychotics. We have chosen this method because our aim is to study the anti-inflammatory effect of aripiprazole and risperidone along three months of follow-up. For that purpose, we have only considered to those patients who reach the end of the follow-up period without switching the initial antipsychotic.

STATA 15.0 was used for statistical analysis. Statistical tests were two-tailed with a 99% confidence interval.

3. Results

3.1. Differences in sociodemographic and clinical variables among groups

As shown in Table 1, patients were divided into two groups according to the antipsychotic assigned at baseline. No statistically significant differences were found in the demographic variables (all p s > 0.05) between healthy volunteers and patients at baseline, except for BMI ($p = 0.001$ for aripiprazole group and $p = 0.041$ for risperidone group). Thus, analysis between healthy volunteers and patient groups were performed controlling for BMI.

No statistically significant differences were found in BMI between both treatment groups at 3 months ($t = -0.99$, $p = 0.326$) nor between both measurements (baseline and 3 months) within each antipsychotic group along the follow-up period ($t = 1.49$, $p = 0.140$ for risperidone; $t = 1.92$, $p = 0.061$ for aripiprazole).

Out of 75 patients, 57 (76%) required hospital admission at intake, without finding differences between both treatments ($X^2 = 0.06$; $p = 0.809$) as shown in Table 1. None of the patients required more hospitalizations during the rest of the follow-up period. 21 of these 57 individuals (36.8%) were cannabis users and most of them stopped its use after hospitalization, whereas most of tobacco users continued smoking after hospitalization.

No differences were found between both treatment groups regarding the type of schizophrenia spectrum diagnosis at intake ($X^2 = 0.70$; $p = 0.704$).

In addition, Table 1 shows that risperidone and aripiprazole groups were similar in terms of the total-score of clinical scales at baseline (all p s > 0.1). Three months following the initiation of treatment, the total-score of clinical scales decreased significantly in both groups with respect to initial measurements ($p = 0.000$), without finding differences between the two medications (all p s > 0.1).

3.2. Comparison of cytokine serum levels between healthy volunteers and patient groups at baseline after controlling for BMI

Figs. 1 and 2 show the statistically significant differences in the comparison among healthy volunteers and both patient groups at baseline and 3 months following the onset of treatment. Whereas there are no differences between patients initially assigned to aripiprazole and healthy volunteers (all p s > 0.025), those patients who were randomly assigned to risperidone had higher levels of IL-8 ($p = 0.000$) and MIP-1 β ($p = 0.007$) than the healthy volunteers group. However, if the two patient groups are pooled, the difference between healthy volunteers and the patient group would continue to be statistically significant for both chemokines ($p = 0.001$ for IL-8 and $p = 0.009$ for MIP-1 β).

No differences were found in the basal serum levels of the 21 cytokines between the two antipsychotics (all p s > 0.1).

In addition, Supplementary Figs. 1 and 2 show the full comparison between the control group and the two patient groups on the 21 cytokines.

3.3. Comparison of cytokine serum levels within risperidone and aripiprazole groups after 3 months of treatment and comparison of the effect size between both antipsychotics

Out of 75 patients, 44 were randomly assigned to risperidone and 31 to aripiprazole ($z = -1.50$; $p = 0.133$). Three months after starting medication, 35 patients continued taking risperidone and 22 patients continued taking aripiprazole, whereas 16 patients had to switch the initial treatment because of clinical reasons. Therefore, the comparison of the two antipsychotics at 3 months was performed on 57 patients.

Table 1
Demographic and clinical variables among healthy volunteers, risperidone group and aripiprazole group.

	Healthy volunteers group n = 75 n (%)	Risperidone group n = 44 n (%)	Aripiprazole group n = 31 n (%)	Statistics
Sex (female) (n = 150)	36 (48.0)	24 (54.6)	16 (51.6)	$\chi^2 = 0.48$; p = 0.491 ^a $\chi^2 = 0.11$; p = 0.735 ^b $\chi^2 = 0.06$; p = 0.802 ^c
Cannabis users (n = 150)	26 (34.7)	12 (27.3)	13 (41.9)	$\chi^2 = 0.70$; p = 0.404 ^a $\chi^2 = 0.50$; p = 0.480 ^b $\chi^2 = 1.76$; p = 0.185 ^c
Tobacco smokers (n = 148)	41 (54.7)	20 (47.6)	15 (48.4)	$\chi^2 = 0.54$; p = 0.464 ^a $\chi^2 = 0.35$; p = 0.556 ^b $\chi^2 = 0.00$; p = 0.948 ^c
Hospitalized at intake (n = 75)		33 (75.0)	24 (77.4)	$\chi^2 = 0.06$; p = 0.809 ^c
Diagnoses at intake (n = 75)				
Schizophrenia		16 (36.4)	14 (45.2)	$\chi^2 = 0.70$; p = 0.704 ^c
Brief psychotic disorder		15 (34.1)	10 (32.3)	
Schizophreniform disorder		13 (29.5)	7 (22.5)	
	Mean (sd)	Mean (sd)	Mean (sd)	Statistics
Age at onset (years) (n = 150)	28.7 (6.27)	30.4 (7.79)	28.8 (8.22)	t = 1.26; p = 0.209 ^a t = 0.03; p = 0.976 ^b t = -0.86; p = 0.394 ^c
BMI at baseline (kg/m ²) (n = 150)	25.1 (4.63)	23.2 (4.62)	21.8 (3.58)	t = -2.06; p = 0.041 ^a t = -3.50; p = 0.001 ^b t = -1.45; p = 0.150 ^c
BMI at 3 months (kg/m ²) (n = 57) [*]		24.8 (4.87)	23.7 (3.51)	t = -0.99; p = 0.326 ^d
				Statistics
SAPS at baseline (n = 75)		p50 (IQR) 15 (9) Mean (sd) 14.7 (4.57)	p50 (IQR) 15 (9) Mean (sd) 14.5 (5.20)	z = 0.15; p = 0.883 ^c
SAPS at 3 months (n = 57) [*]		p50 (IQR) 0 (0) Mean (sd) 0.3 (1.07)	p50 (IQR) 0 (0) Mean (sd) 0.4 (1.23)	z = -0.03; p = 0.973 ^d
SANS at baseline (n = 75)		p50 (IQR) 4 (11) Mean (sd) 6.4 (6.97)	p50 (IQR) 4.5 (10) Mean (sd) 5.9 (6.52)	z = 0.39; p = 0.697 ^c
SANS at 3 months (n = 57) [*]		p50 (IQR) 0 (0) Mean (sd) 2.2 (5.94)	p50 (IQR) 0 (0) Mean (sd) 0.7 (1.77)	z = 1.11; p = 0.265 ^d
BPRS at baseline (n = 75)		p50 (IQR) 67.5 (21.5) Mean (sd) 69.5 (15.46)	p50 (IQR) 64 (32) Mean (sd) 66.1 (19.79)	z = 0.95; p = 0.341 ^c
BPRS at 3 months (n = 57) [*]		p50 (IQR) 25 (0) Mean (sd) 27.9 (6.86)	p50 (IQR) 25 (0) Mean (sd) 26.6 (6.33)	z = 0.42; p = 0.676 ^d

sd: standard deviation; IQR: interquartile range.

^a Comparison between healthy volunteers and risperidone group at baseline.^b Comparison between healthy volunteers and aripiprazole group at baseline.^c Comparison between risperidone and aripiprazole group at baseline.^d Comparison between risperidone and aripiprazole group at 3 months.^{*} Per protocol analysis.

Chlorpromazine equivalent doses were similar among the two antipsychotics ($t = 0.35$; $p = 0.731$). Additional analyses were performed to assess if concomitant medication may act as possible confounding variables, finding no statistically significant differences between the two antipsychotics (all $ps > 0.1$).

Figs. 1 and 2 also show the statistically significant differences in the comparison between the basal and the 3 months cytokine levels within each antipsychotic group. No significant differences were found between both patient groups at 3 months and the healthy volunteers group (all $ps > 0.1$).

Basal and 3 months measurements, as well as matched-pair analyses and effect sizes (r) for the 21 cytokines within each antipsychotic group are shown in Table 2. Within the risperidone group, there is a significant decrease of two chemokines (IL-8; $p = 0.000$ and MIP-1 β ; $p = 0.002$), one regulatory-cytokine (IL-21; $p = 0.004$), one Type-3 cytokine (IL-23; $p = 0.010$) and a trend to statistically significant decrease of one Th1-Th2 cytokine (IL-7; $p = 0.013$). Within the aripiprazole group, several cytokines significantly decreased after treatment: one pro-inflammatory cytokine (TNF- α ; $p = 0.007$), two chemokines (IL-8; $p = 0.003$ and Fractalkine; $p = 0.006$), one regulatory-cytokine (IL-21; $p =$

Please cite this article as: Juncal-Ruiz, M., et al., Comparison of the anti-inflammatory effect of aripiprazole and risperidone in 75 drug-naïve first episode psychosis individuals: A..., Schizophr. Res. (2018), <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.06.039>

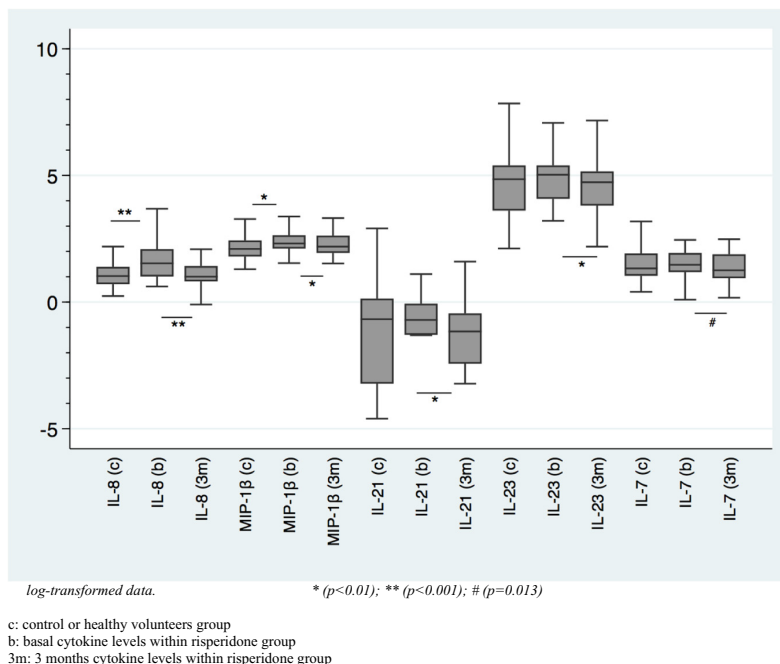


Fig. 1. Significant cytokines in the comparison between healthy volunteers, basal risperidone group and 3 months risperidone group.

0.007) one Type-3 cytokine (IL-17 α ; $p = 0.006$) and a trend to statistically significant decrease of one Th1-Th2 cytokine (IL-13; $p = 0.011$) was observed. No statistically significant differences were found in the percentages of change of the serum cytokine levels between risperidone and aripiprazole (all p s > 0.01) after the follow-up period. The effect size of the two antipsychotics was also similar on the panel of 21 cytokines except for some cytokines in which aripiprazole showed a greater effect

size than risperidone (TNF- α : $r = 0.41$ aripiprazole, $r = 0.27$ risperidone; IL-17 α : $r = 0.42$ aripiprazole, $r = 0.23$ risperidone; IL-13: $r = 0.38$ aripiprazole, $r = 0.11$ risperidone; Fractalkine: $r = 0.42$ aripiprazole, $r = 0.23$ risperidone) and for one chemokine in which risperidone showed a greater effect size than aripiprazole (MIP-1 β : $r = 0.37$ risperidone, $r = 0.24$ aripiprazole). In all cases, these comparisons suppose an effect size change from small to medium.

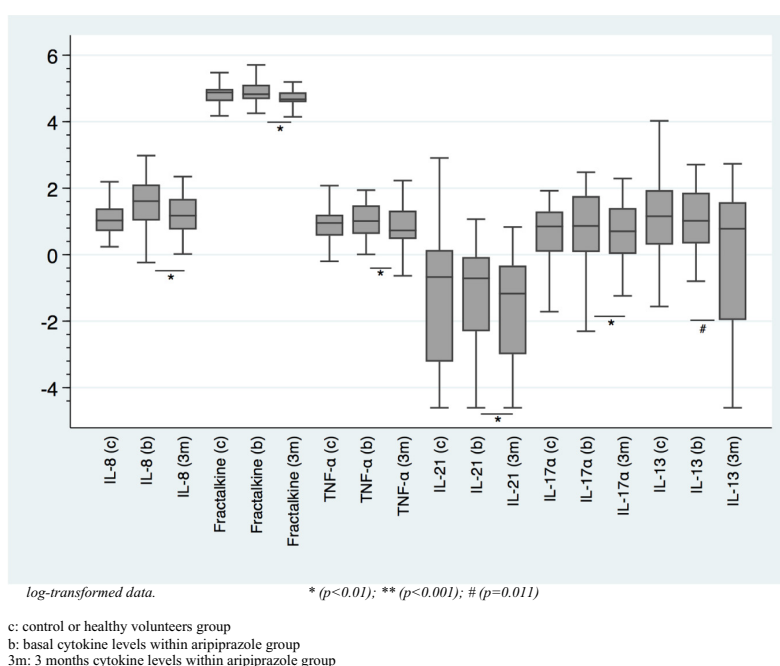


Fig. 2. Significant cytokines in the comparison between healthy volunteers, basal aripiprazole group and 3 months aripiprazole group.

Please cite this article as: Juncal-Ruiz, M., et al., Comparison of the anti-inflammatory effect of aripiprazole and risperidone in 75 drug-naïve first episode psychosis individuals: A..., Schizophr. Res. (2018), <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.06.039>

Table 2
Basal and 3 months measurements, matched-pair analyses and effect sizes (r) for the 21 cytokines:

Cytokine	Risperidone group				Aripiprazole group				
		p50 (IQR)	Mean (sd)	z; p-value	r	p50 (IQR)	Mean (sd)	z; p-value	r
IL-6 (pg/ml)	Basal:	2.05 (2.74)	2.45 (1.58)	1.7; p = 0.093	0.20	1.45 (2.49)	2.21 (1.89)	2.2; p = 0.022	0.35
	3 months:	1.36 (3.16)	2.15 (1.70)			0.96 (2.79)	1.98 (2.06)		
IL-1 β (pg/ml)	Basal:	0.5 (0.88)	0.55 (0.47)	2.2; p = 0.026	0.27	0.21 (0.98)	0.68 (0.95)	0.5; p = 0.613	0.08
	3 months:	0.26 (0.56)	0.46 (0.54)			0.24 (0.59)	0.55 (0.81)		
TNF- α (pg/ml)	Basal:	2.75 (1.60)	3.80 (4.97)	2.3; p = 0.022	0.27	2.75 (2.54)	3.04 (1.55)	2.7; p = 0.007	0.41
	3 months:	2.25 (1.00)	2.64 (1.40)			1.94 (1.54)	2.39 (1.37)		
IFN- γ (pg/ml)	Basal:	4.16 (3.22)	5.32 (2.98)	0.8; p = 0.437	0.09	4.3 (3.07)	5.27 (4.07)	1.5; p = 0.123	0.23
	3 months:	3.46 (2.99)	4.89 (3.46)			4.10 (3.08)	4.68 (3.70)		
IL-10 (pg/ml)	Basal:	5.22 (3.12)	5.47 (3.41)	1.9; p = 0.052	0.23	4 (4.3)	4.69 (2.82)	1.5; p = 0.144	0.22
	3 months:	4.08 (3.49)	4.24 (2.61)			3.88 (4.57)	2.01 (3.86)		
IL-17 α (pg/ml)	Basal:	2.27 (3.20)	4.29 (7.28)	1.9; p = 0.054	0.23	2.37 (4.75)	3.80 (3.76)	2.8; p = 0.006	0.42
	3 months:	1.60 (2.74)	3.06 (4.14)			2.11 (3.35)	2.84 (2.68)		
IL-13 (pg/ml)	Basal:	3.06 (4.25)	8.29 (25.30)	1.0; p = 0.334	0.11	2.77 (5.05)	4.09 (3.79)	2.6; p = 0.011	0.38
	3 months:	2.68 (3.78)	8.75 (30.79)			2.44 (5.23)	3.69 (3.94)		
IL-12 (pg/ml)	Basal:	2.19 (0.91)	2.33 (0.79)	1.3; p = 0.179	0.16	1.93 (1.51)	2.30 (1.20)	1.2; p = 0.249	0.17
	3 months:	2.03 (0.81)	2.23 (0.89)			1.70 (1.26)	2.13 (1.24)		
IL-2 (pg/ml)	Basal:	1.08 (1.40)	1.29 (1.31)	1.6; p = 0.120	0.19	0.55 (1.32)	1.06 (1.15)	1.6; p = 0.107	0.24
	3 months:	0.84 (1.23)	1.12 (1.26)			0.43 (0.87)	0.91 (1.16)		
IL-21 (pg/ml)	Basal:	0.50 (0.67)	0.83 (1.14)	2.9; p = 0.004	0.34	0.49 (0.83)	0.80 (0.90)	2.7; p = 0.007	0.40
	3 months:	0.36 (0.59)	0.64 (0.95)			0.35 (0.82)	0.61 (0.69)		
IL-4 (pg/ml)	Basal:	8.37 (25.61)	30.24 (89.27)	-0.7; p = 0.458	-0.09	6.78 (25.68)	22.43 (35.75)	1.1; p = 0.281	0.16
	3 months:	7.57 (24.32)	16.98 (22.61)			6.43 (20.39)	21.08 (37.32)		
IL-23 (pg/ml)	Basal:	152.56 (161.1)	193.52 (220.57)	2.6; p = 0.010	0.31	118.78 (158.81)	224.47 (428.50)	1.7; p = 0.091	0.25
	3 months:	117.47 (131.83)	155.85 (216.21)			106.65 (168.11)	224.56 (358.81)		
IL-5 (pg/ml)	Basal:	1.14 (0.35)	1.65 (3.40)	1.5; p = 0.138	0.18	1.15 (0.70)	1.22 (0.52)	1.3; p = 0.178	0.20
	3 months:	1.03 (0.53)	1.72 (3.88)			1.02 (0.57)	1.11 (0.59)		
IL-7 (pg/ml)	Basal:	4.36 (3.68)	5.15 (2.62)	2.5; p = 0.013	0.30	3.79 (3.44)	4.69 (2.37)	1.8; p = 0.067	0.28
	3 months:	3.50 (3.87)	4.71 (3.09)			3.55 (2.69)	4.48 (2.42)		
IL-8 (pg/ml)	Basal:	4.63 (5.39)	10.89 (19.87)	4.1; p = 0.000	0.49	5.0 (5.48)	7.91 (8.75)	2.9; p = 0.003	0.44
	3 months:	2.68 (1.98)	4.26 (5.20)			2.81 (2.52)	3.75 (2.49)		
MIP-1 α (pg/ml)	Basal:	10.48 (3.87)	18.30 (48.19)	2.0; p = 0.048	0.24	9.63 (4.86)	11.76 (7.24)	1.0; p = 0.322	0.15
	3 months:	9.68 (3.91)	10.04 (4.32)			8.95 (3.95)	9.02 (3.11)		
MIP-1 β (pg/ml)	Basal:	10.10 (5.72)	12.23 (6.41)	3.1; p = 0.002	0.37	9.53 (7.08)	10.42 (4.75)	1.6; p = 0.108	0.24
	3 months:	9.01 (7.77)	10.51 (5.26)			9.41 (8.21)	9.29 (4.16)		
MIP-3 α (pg/ml)	Basal:	3.83 (1.38)	5.76 (7.91)	0.9; p = 0.551	0.11	4.08 (1.08)	4.04 (1.29)	1.5; p = 0.131	0.23
	3 months:	4.21 (2.84)	4.19 (3.07)			3.50 (1.26)	3.58 (1.22)		
ITAC (pg/ml)	Basal:	7.12 (7.7)	16.70 (28.27)	-1.4; p = 0.169	-0.16	8.39 (8.70)	10.27 (5.38)	0.2; p = 0.808	0.04
	3 months:	6.70 (6.89)	19.32 (38.61)			7.59 (7.39)	12.72 (16.16)		
GMCSF (pg/ml)	Basal:	95.74 (84.71)	157.93 (261.47)	0.7; p = 0.466	0.09	70.74 (101.66)	193.72 (377.11)	0.4; p = 0.661	0.07
	3 months:	80.89 (168.5)	173.82 (243.31)			77.02 (102.52)	209.71 (442.76)		
Fractalkine (pg/ml)	Basal:	135.65 (62.43)	124.70 (58.34)	1.9; p = 0.059	0.23	124.70 (58.34)	136.55 (54.22)	2.8; p = 0.006	0.42
	3 months:	126.05 (62.16)	137.30 (60.73)			106.98 (31.97)	122.41 (57.78)		

Risperidone: basal: n = 44; 3 months (per protocol analysis): n = 35.

Aripiprazole: basal: n = 31; 3 months (per protocol analysis): n = 22.

z: Matched-pair analyses (W-Wilcoxon); p value.

r: correlation coefficient ranging from -1 to +1; r = 0.1 (small); r = 0.3 (medium); r = 0.5 (large).

sd: standard deviation; IQR: Interquartile range

Supplementary Figs. 3 and 4 show the full comparison between the basal and the 3 months serum cytokine levels within each antipsychotic group.

We have also analyzed the possible correlation between the percentage of change of the 21 cytokines and the percentage of change of the total-score of clinical scales within the two antipsychotic groups, finding no significant correlation between none of these variables (all $ps > 0.1$).

4. Discussion

The results of our study suggest a similar anti-inflammatory effect of both risperidone and aripiprazole in a large sample of FEP individuals. To our knowledge, this is the first study that has compared the anti-inflammatory effect of risperidone and aripiprazole and also that has studied the largest number of cytokines in FEP individuals.

Regarding the comparison of cytokine levels between healthy volunteers and patients at baseline, we have found that patients who were initially assigned to aripiprazole had no statistically significant differences in none of the 21 cytokines studied with respect to healthy volunteers (all $ps > 0.025$), whereas those patients who were randomly

assigned to risperidone had higher levels of IL-8 ($p = 0.000$) and MIP-1 β ($p = 0.007$) than the healthy volunteers, despite the fact that in both groups of patients the levels of these two cytokines were higher than in the healthy volunteers group (see Supplementary Figs. 1 and 2). Two possible explanations for understanding these results could be as follows: first, the means difference between the healthy volunteers and the two treatment groups as well as the dispersion of the data are higher for the risperidone group (see Table 2); and second, we have performed a non-parametric multiple regression controlling for BMI, which is the only variable that showed statistically significant differences in the univariate analysis among the three groups. However, there could be other variables that have not been considered in these analyses, which might have an effect on the association that is being evaluated.

Di Nicola et al., 2013 also observed that IL-8 levels were higher in patients with respect to healthy volunteers. However, in contrast to previous studies that have mainly studied pro-inflammatory cytokines (Di Nicola et al., 2013; Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Noto et al., 2014), we found no differences between healthy volunteers and patients on IL-6, TNF- α and IL-1 β , which are interestingly three of the cytokines most affected by BMI (Song et al., 2014). We suggest three possible reasons that may explain this discrepancy. First, the present

work has been carried out in drug-naïve FEP individuals, whereas several previous studies have analyzed together both drug-naïve and chronic schizophrenia patients (Di Nicola et al., 2013; Tourjman et al., 2013). Second, unlike other studies (Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Petrikis et al., 2017), we have not excluded those individuals with overweight. Indeed, we have performed a non-parametric regression in order to be able to control the analysis for BMI. Third, as mentioned above, the largest number of cytokines has been analyzed in this study, including some chemokines such as IL-8, MIP-1 β and Fractalkine, which have been scarcely studied in previous investigations. Inflammatory chemokines function mainly as chemoattractants for leukocytes, recruiting monocytes, neutrophils and other effector cells from the blood to sites of infection or tissue damage, including the central nervous system (CNS) (White et al., 2007; Nomiya et al., 2010). Their increase in peripheral blood might reflect that occurring in the CNS (Šumanović-Glamuzina et al., 2017), although their exact relation is currently unknown.

With regard to the anti-inflammatory efficacy, both risperidone and aripiprazole show anti-inflammatory effects as shown in Figs. 1 and 2. Interestingly, the two chemokines that were elevated in patients initially assigned to risperidone regarding healthy volunteers at baseline, decreased significantly after treatment. Our findings are supported by previous studies: Noto et al., 2014 observed that IL-6, IL-10, TNF- α and IL-4 decreased significantly after six weeks of risperidone treatment. Sobiš et al., 2015 found that IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23, IL-4 and IFN- γ decreased significantly after four weeks of aripiprazole treatment. Unlike a meta-analysis by Miller et al. (2011) in which TNF- α appeared to be a trait marker of psychosis, in our study, as in the previous ones (Noto et al., 2014; Sobiš et al., 2015), we have found that this cytokine decreased significantly after aripiprazole treatment. The anti-inflammatory effect of both treatments was similar on the panel of 21 cytokines, except for TNF- α , IL-13, IL-17 α and Fractalkine in which aripiprazole seems to have a greater effect size than risperidone (change from small to medium), whereas risperidone seems to have a greater effect size than aripiprazole on MIP-1 β (change from small to medium). However, it is important to remark that this is a large exploratory work where 21 cytokines have been analyzed and thus we must be cautious with the results.

With respect to the cessation of cannabis use after hospitalization, as it is known, cannabis may have an anti-inflammatory effect. Therefore, its abandonment after hospitalization might increase the pro-inflammatory cytokines instead of decreased them. For that reason, the anti-inflammatory effect found in both treatments after 3 months seems not to be influenced by the cessation of cannabis use.

It is also important to take into account if BMI has been modified because of antipsychotics to correctly evaluate the anti-inflammatory effect of both treatments (Pisano et al., 2017). Although there is an increase in BMI within both antipsychotic groups, our results do not seem to be influenced by the BMI change, because no statistically significant differences were found within both treatment groups along the follow-up period (all p s > 0.05). In addition, a higher BMI would be related to a pro-inflammatory effect instead to an anti-inflammatory one.

Regarding the mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of antipsychotics, Kato et al. (2011) suggested that antipsychotics might directly modulate the response of microglia, as it has been postulated the existence of dopamine receptors on these immune cells (Farber et al., 2005). In particular, antipsychotics may induce an inhibitory effect on the activation of microglia (Liu and Hong, 2003; Kato et al., 2007) and in this way, may reduce some pro-inflammatory cytokines and chemokines.

With regard to the possible correlation between cytokine levels and psychopathology, Petrikis et al., 2017 attempted to correlate the decreased in pro-inflammatory cytokines with clinical scales improvement. However, like us, they were not able to demonstrate a significantly correlation among these variables.

This study has several limitations that should be considered: (1) the fact that multiple comparisons were made to explore the anti-inflammatory effect of both treatments, may increase the probability of a type I error. However, when many significant results with biological sense are occurring, the chance of all these results being spurious is extremely improbable; (2) cannabis and tobacco were recorded as qualitative variables only at baseline; (3) stress level, which is known to influence inflammatory status, was not measured; (4) we have only measured cytokine levels at 3 months following the onset of antipsychotic treatment, and thus we do not know how serum concentrations have changed within this period; (5) we were not able to consider the consumption of classical analgesic or anti-inflammatory drugs as possible confounding factors (however, it is important to remark that subjects from this study are young, healthy individuals without chronic diseases or chronic treatments); (6) analysis was performed on peripheral blood. We assume that these findings are an indicator of what occurs in the CNS and therefore, we would expect to find a greater disturbance of these cytokines in the CNS.

In summary, after controlling for BMI, we have found that some chemokines such as IL-8 and MIP-1 β were elevated in patients compared to healthy volunteers. These two chemokines and other pro-inflammatory and regulatory cytokines decreased significantly after treatment. This is the first study that has compared the immunomodulatory effect of risperidone and aripiprazole on a large array of pro-inflammatory cytokines and chemokines in FEP individuals, finding that the anti-inflammatory effect of both treatments was similar. Further studies in the same line may help to create novel therapeutic options involving cytokine-modulating agents.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.06.039>.

Funding

The present study was carried out at the Hospital Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, Santander, Spain, under the following grant support from MINECO SAF2013-46292-R, Instituto de Salud Carlos III and Fundación Marqués de Valdecilla. No pharmaceutical company has participated in the study concept and design, data collection, analysis and interpretation of the results, and drafting of the manuscript. We thank the Valdecilla Biobank for blood sampling handling and storage. We also wish also to thank the participants and their families for enrolling in this study. The study, designed and directed by B C-F, conformed to international standards for research ethics and was approved by the local institutional review board.

Contributors

Crespo-Facorro B, López-Hoyos M and Juncal-Ruiz M designed the study and wrote the protocol. Author Juncal-Ruiz M, Riesco-Dávila L, Martínez-García O and Ortiz-García V managed the literature searches and analyses. Authors Juncal-Ruiz M undertook the statistical analysis, and author Ramírez-Bonilla M, Leza JC and Ocejo-Viñals J participated in the bibliographic search and manuscript preparation. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards and conflicts of interest

Prof. Crespo-Facorro has received speaking honoraria (advisory board and educational lectures) and travel expenses from Teva, Otsuka, Lundbeck and Johnson & Johnson in the last three years. Dr. Juncal-Ruiz has received travel expenses from Lundbeck in the last three years. Dr. Ramírez-Bonilla has received travel expenses from Lundbeck and Johnson & Johnson in the last three years. Prof. López. Hoyos, Prof. Leza, Dr. Riesco-Dávila, Dr. Ocejo-Viñal, Mrs. Martínez-García and Mr. Ortiz-García report no additional financial or other relationship relevant to the subject of this article.

Acknowledgements

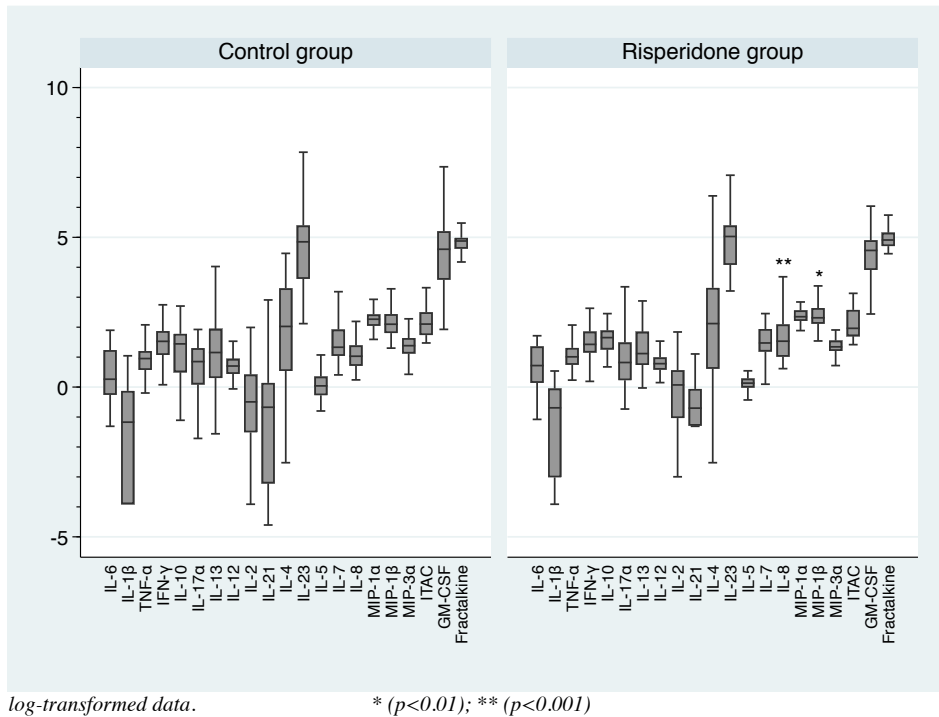
We wish to thank the PAFIP researchers who helped with data collection and especially acknowledge Duly and Rodrigo Romero. Finally, we would also like to thank the participants and their families for enrolling in this study.

References

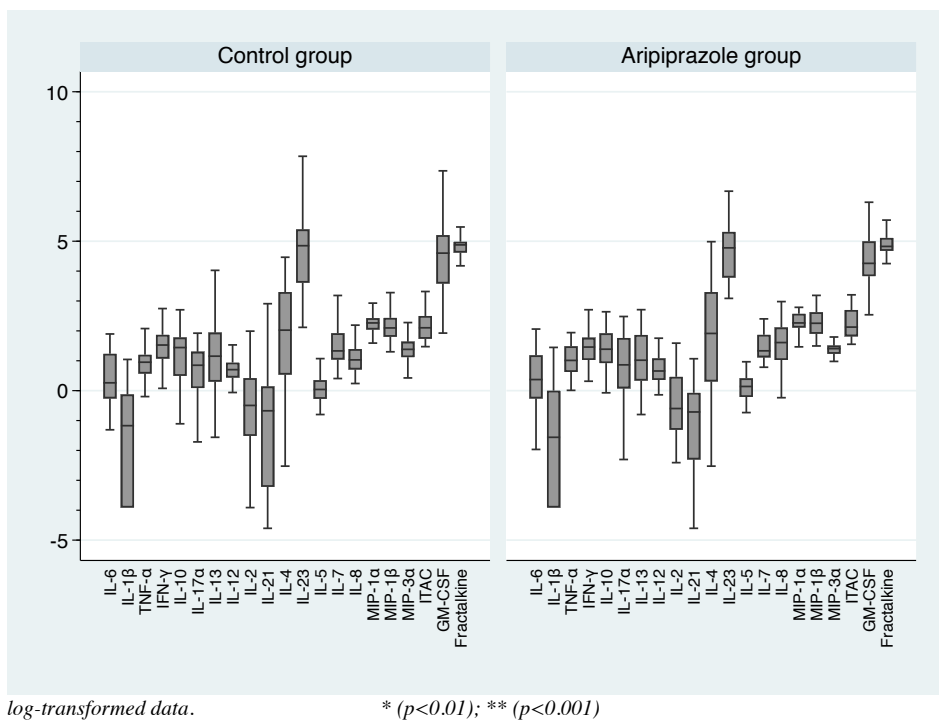
- Bergink, V., Gibney, S.M., Drexhage, H.A., 2014. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol. Psychiatry* 75, 324–331.
- Beumer, W., Drexhage, R.C., De Wit, H., Versnel, M.A., Drexhage, H.A., Cohen, D., 2012. Increased level of serum cytokines, chemokines and adipokines in patients with schizophrenia is associated with disease and metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1901–1911.
- Capuzzi, E., Bartoli, F., Crocamo, C., Clerici, M., Carrà, G., 2017. Acute variations of cytokine levels after antipsychotic treatment in drug-naïve subjects with a first-episode psychosis: a meta-analysis. *Neurosci. Biobehav.* 77, 122–128.
- Carter, C.J., 2009. Schizophrenia susceptibility genes directly implicated in the life cycles of pathogens: cytomegalovirus, influenza, herpes simplex, rubella and *Toxoplasma gondii*. *Schizophr. Bull.* 35, 1163–1182.
- Chew, L.J., Fusar-Poli, P., Schmitz, T., 2013. Oligodendroglial alterations on the role of microglia in white matter injury: Relevance to schizophrenia. *Dev. Neurosci.* 35, 102–129.
- Cohen, J., 1988. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. second ed. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ.
- Crespo-Facorro, B., Carrasco-Marín, E., Pérez-Iglesias, R., Pelayo-Terán, J.M., Fernández-Prieto, L., Leyva-Cobián, F., Vázquez-Barquero, J.L., 2008. Interleukin-12 plasma levels in drug-naïve patients with a first episode of psychosis: effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 158 (2), 206–216.
- Crespo-Facorro, B., Pelayo-Terán, J.M., Mayoral-Van Son, J., 2016. Current data on and clinical insights into the treatment of first episode nonaffective psychosis: a comprehensive review. *Neurol. Ther.* 5, 105–130.
- Di Nicola, M., Cattaneo, A., Heggul, N., Di Forti, M., Aitchison, K.J., Janiri, L., Murray, R.M., Dazzan, P., Pariante, C.M., Mondelli, V., 2013. Serum and gene expression profile of cytokines in first-episode psychosis. *Brain Behav. Immun.* 31, 90–95.
- Ding, M., Song, X., Zhao, J., Gao, J., Li, X., Yang, G., Wang, X., Harrington, A., Fan, X., Lv, L., 2014. Activation of Th17 cells in drug naive, first episode schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 51, 78–82.
- Farber, K., Pannasch, U., Kettenmann, H., 2005. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 128–138.
- Fonseka, T.M., Müller, D.J., Kennedy, S.H., 2016. Inflammatory cytokines and antipsychotic-induced weight gain: review and clinical implications. *Mol. Neuropsychiat.* 2, 1–14.
- Fritz, C.O., Morris, P.E., Richler, J.J., 2012. Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. *J. Exp. Psychol. Gen.* 141 (1), 2–18.
- García-Bueno, B., Caso, J.R., Leza, J.C., 2008. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32 (6), 1136–1151.
- García-Bueno, B., Gassó, P., MacDowell, K.S., Callado, L.F., Mas, S., Bernardo, M., Lafuente, A., Meana, J.J., Leza, J.C., 2016. Evidence of activation of the toll-like receptor-4 pro-inflammatory pathway in patients with schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* 41 (3), E46–E55.
- Hartwig, F.P., Borges, M.C., Horta, B.L., Bowden, J., Davey-Smith, G., 2017. Inflammatory biomarkers and risk of schizophrenia A 2-Sample Mendelian Randomization Study. *JAMA Psychiat.* 174 (12), 1226–1233.
- Juncal-Ruiz, M., Riesco-Dávila, L., de la Foz, V.O.-G., Ramírez-Bonilla, M., Martínez-García, O., Orure-Ventura, J., Leza, J.C., López-Hoyos, M., Crespo-Facorro, B., 2018. The effect of excess weight on circulating inflammatory cytokines in drug-naïve first-episode psychosis individuals. *J. Neuroinflammation* 15 (1), 63.
- Kahn, R.S., Sommer, I.E., 2015. The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 20, 84–97.
- Kato, T., Monji, A., Hashioka, S., Kanba, S., 2007. Risperidone significantly inhibits interferon-gamma-induced microglial activation in vitro. *Schizophr. Res.* 92, 108–115.
- Kato, T.A., Monji, A., Mizoguchi, Y., Hashioka, S., Seki, Y., Kasai, M., Utsumi, H., Kanba, S., 2011. Anti-inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a 'fire extinguisher' in the brain of schizophrenia? *Mini-Rev. Med. Chem.* 11, 565–574.
- Kinney, D.K., Hintz, K., Shearer, E.M., Barch, D.H., Riffin, C., Whitley, K., Butler, R., 2010. A unifying hypothesis of schizophrenia: abnormal immune system development may help explain roles of prenatal hazards, post-pubertal onset, stress, genes, climate, infections, and brain dysfunction. *Med. Hypotheses* 74, 555–563.
- Kowalski, J., Blada, P., Kucia, K., Madej, A., Herman, Z.S., 2001. Neuroleptics normalize increased release of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha from monocytes in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 50, 169–175.
- Larsen, P.H., Holm, T.H., Owens, T., 2007. Toll-like receptors in brain development and homeostasis. *Sci. STKE* (402), pe47.
- Leza, J.C., García-Bueno, B., Bioque, M., Arango, C., Parellada, M., Do, K., O'Donnell, P., Bernardo, M., 2015. Inflammation in schizophrenia: a question of balance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 612–626.
- Li, J., Baud, O., Vartanian, T., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A., 2005. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and naph oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9936–9941.
- Liu, B., Hong, J.S., 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1–7.
- MacDowell, K.S., García-Bueno, B., Madrigal, J.L., Parellada, M., Arango, C., Mico, J.A., Leza, J.C., 2013. Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 121–135.
- MacDowell, K.S., Caso, J.R., Martín-Hernández, D., Madrigal, J.L., Leza, J.C., García-Bueno, B., 2014. Paliperidone prevents brain toll-like receptor 4 pathway activation and neuroinflammation in rat models of acute and chronic restraint stress. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, 1–11.
- Meyer, U., 2011. Anti-inflammatory signaling in schizophrenia. *Brain Behav. Immun.* 25, 1507–1518.
- Miller, B.J., Goldsmith, D.R., 2017. Towards an immunophenotype of schizophrenia: progress, potential mechanisms, and future directions. *Neuropsychopharmacology* 42 (1), 299–317.
- Miller, B.J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., Kirkpatrick, B., 2011. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol. Psychiatry* 70, 663–671.
- Monji, A., Kato, T., Kanba, S., 2009. Cytokines and schizophrenia: microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 63, 257–265.
- Müller, N., Empl, M., Riedel, M., Schwarz, M., Ackenheil, M., 1997. Neuroleptic treatment increases soluble IL-2 receptors and decreases soluble IL-6 receptors in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 247, 308–313.
- Nomiyama, H., Osada, N., Yoshie, O., 2010. The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 253–262.
- Noto, C., Ota, V.K., Gouvea, E.S., Rizzo, L.B., Spindola, L.M.N., Honda, P.H.S., Cordeiro, Q., et al., 2014. Effects of risperidone on cytokine profile in drug-naïve first-episode psychosis. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18 (4), 1–8.
- O'Sullivan, D., Green, L., Stone, S., Zareie, P., Kharrang, M., Fong, D., Connor, B., LaFlamme, A.C., 2014. Treatment with the antipsychotic agent, risperidone, reduces disease severity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* 9 (8), e104430.
- Petriakis, P., Voulgari, P.V., Tzallas, A.T., Boumba, V.A., Archimandriti, D.T., Zambetas, D., Papadopoulos, I., et al., 2017. Changes in the cytokine profile in first-episode, drug-naïve patients with psychosis after short-term antipsychotic treatment. *Psychiatry Res.* 256, 378–383.
- Pisano, S., Catone, G., Coppola, G., Carotenuto, M., Iuliano, R., Tiano, C., Montesanto, A.R., et al., 2017. Different immune signature in youths experiencing antipsychotic-induced weight gain compared to untreated obese patients. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 27 (9), 844–848.
- Robinson, D.G., Gallego, J.A., John, M., Petrides, G., Hassoun, Y., Zhang, J.P., Lopez, L., et al., 2015. A randomized comparison of aripiprazole and risperidone for the acute treatment of first-episode schizophrenia and related disorders: 3 months outcomes. *Schizophr. Bull.* 41, 1227–1236.
- Rothermundt, M., Ohrmann, P., Abel, S., Siegmund, A., Pedersen, A., Ponath, G., Suslow, T., et al., 2007. Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased serum concentrations and elevated myo-inositol. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 361–364.
- Sirota, P., Meiman, M., Herschko, R., Bessler, H., 2005. Effect of neuroleptic administration on serum levels of soluble IL-2 receptor-alpha and IL-1 receptor antagonist in schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 134, 151–159.
- Sobiś, J., Rykaczewska-Czerwińska, M., Świątochowska, E., Gorczyca, P., 2015. Therapeutic effect of aripiprazole in chronic schizophrenia is accompanied by anti-inflammatory activity. *Pharmacol. Rep.* 67 (2), 353–359.
- Song, X., Fan, X., Li, X., Zhang, W., Gao, J., Zhao, J., Harrington, A., Ziedonis, D., Lv, L., 2014. Changes in pro-inflammatory cytokines and body weight during 6-month risperidone treatment in drug naive, first-episode schizophrenia. *Psychopharmacology* 231 (2), 319–325.
- Suárez-Pinilla, P., López-Gil, J., Crespo-Facorro, B., 2014. Immune system: a possible nexus between cannabinoids and psychosis. *Brain Behav. Immun.* 40, 269–282.
- Šumanović-Glamuzina, D., Čulo, F., Čulo, M.I., Konjevoda, P., Jerković-Raguž, M., 2017. A comparison of blood and cerebrospinal fluid cytokines (IL-1β, IL-6, IL-18, TNF-α) in neonates with perinatal hypoxia. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 20:17 (3), 203–210.
- Tourjman, V., Kouassi, E., Koué, M.E., Rocchetti, M., Fortin-Fournier, S., Fusar-Poli, P., Potvin, S., 2013. Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr. Res.* 151, 43–47.
- Uphergrove, R., Manzañares-Teson, N., Barnes, N.M., 2014. Cytokine function in medication-naïve first episode psychosis: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr. Res.* 101–108.
- White, F.A., Jung, H., Miller, R.J., 2007. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20151–20158.
- Wood, S.W., 2003. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *J. Clin. Psychiatry* 64 (6), 663–667.

Material suplementario:

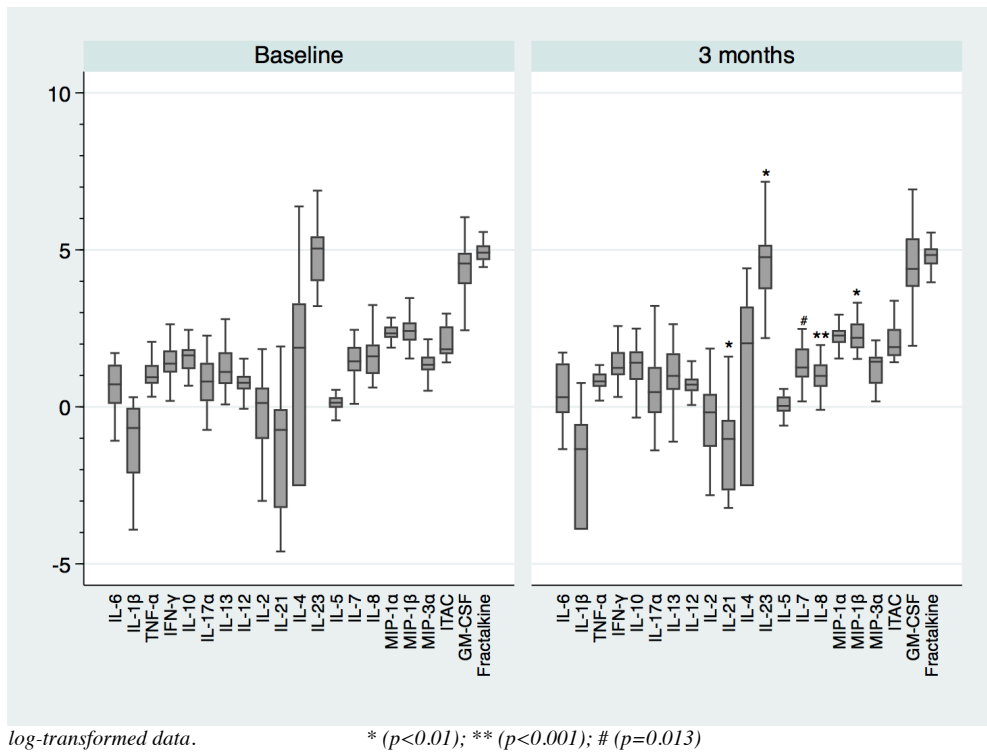
Supplementary Figure 1: Basal serum cytokine levels between healthy volunteers and the risperidone group



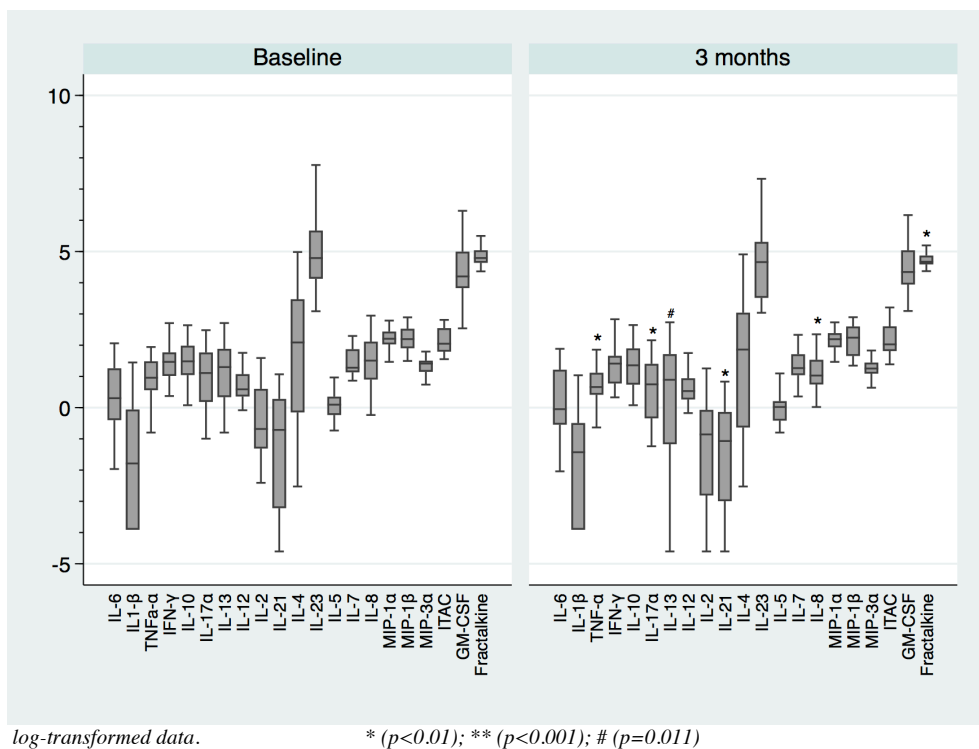
Supplementary Figure 2: Basal serum cytokine levels between healthy volunteers and the aripiprazole group



Supplementary Figure 3: comparison between the basal and 3-month serum cytokine levels within the risperidone group (matched-pair analysis)



Supplementary Figure 4: comparison between the basal and 3-month serum cytokine levels within the aripiprazole group (matched-pair analysis)




RESEARCH

Open Access



The effect of excess weight on circulating inflammatory cytokines in drug-naïve first-episode psychosis individuals

María Juncal-Ruiz^{1*} , Laura Riesco-Dávila³, Víctor Ortiz-García de la Foz², Mariluz Ramírez-Bonilla², Obdulia Martínez-García², Juan Irure-Ventura³, Juan Carlos Leza^{5,6,7}, Marcos López-Hoyos^{3†} and Benedicto Crespo-Facorro^{2,4*†}

Abstract

Background: Low-grade inflammation has been repeatedly associated with both excess weight and psychosis. However, no previous studies have addressed the direct effect of body mass index (BMI) on basal serum cytokines in individuals with first-episode psychosis (FEP).

Objectives: The aim of this study is to analyze the effect of BMI on basal serum cytokine levels in FEP patients and control subjects, separating the total sample into two groups: normal-weight and overweight individuals.

Methods: This is a prospective and open-label study. We selected 75 FEP patients and 75 healthy controls with similar characteristics to patients according to the following variables: sex, age, and cannabis and tobacco consumption. Both controls and patients were separated into two groups according to their BMI: subjects with a BMI under 25 were considered as normal weight and those with a BMI equal to or more than 25 were considered as overweight. Serum levels of 21 cytokines/chemokines were measured at baseline using the Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel protocol from the Milliplex[®] Map Kit. We compared the basal serum levels of the 21 cytokines between control and patient groups according to their BMI.

Results: In the normal-weight group, IL-8 was the only cytokine that was higher in patients than in the control group ($p = 0.001$), whereas in the overweight group, serum levels of two pro-inflammatory cytokines (IL-6, $p = 0.000$; IL-1 β , $p = 0.003$), two chemokines (IL-8, $p = 0.001$; MIP-1 β , $p = 0.001$), four Th-1 and Th-2 cytokines (IL-13, $p = 0.009$; IL-2, $p = 0.001$; IL-7, $p = 0.001$; IL-12p70, $p = 0.010$), and one Type-3 cytokine (IL-23, $p = 0.010$) were higher in patients than in controls.

Conclusions: Most differences in the basal serum cytokine levels between patients and healthy volunteers were found in the overweight group. These findings suggest that excess weight can alter the homeostasis of the immune system and therefore may have an additive pro-inflammatory effect on the one produced by psychosis in the central nervous system.

Keywords: Psychosis, Body mass index, Low-grade inflammation, Cytokines, Chemokines

* Correspondence: mjuncal11@gmail.com; bcfacorro@humv.es

†Equal contributors

¹Department of Psychiatry, Sierrallana Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Torrelavega, Spain

²Department of Psychiatry, Marqués de Valdecilla University Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Inflammation is usually a physiological response of the organism to harmful stimuli, whether physical, chemical, or biological. The inflammatory state that accompanies excess weight shows a peculiar presentation, as it is not accompanied by infection or sign of autoimmunity and no massive tissue injury seems to occur. In fact, it is often called “low-grade” chronic inflammation [17]. Cytokines are hormone-like proteins that enable immune cells to communicate and play an integral role in the initiation, perpetuation, and subsequent down-regulation of the immune response [28]. Several studies have found that overweight individuals (body mass index (BMI) ≥ 25) have higher plasma levels of some pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , and IL-1 β than normal-weight individuals [16, 22].

Obesity is reported in approximately 50% of patients with schizophrenia [2, 3]. In addition, a pro-inflammatory state has been repeatedly associated with first-episode psychosis (FEP) [5, 11, 12, 15], especially in women, overweight patients, and tobacco users [9, 10]. However, no previous study has addressed the direct effect of BMI on basal serum cytokines in FEP individuals.

The aim of this study is to analyze the effect of BMI on basal serum cytokine levels in FEP patients and control subjects, separating the total sample into two groups: normal-weight and overweight individuals. Our hypothesis is that higher levels of inflammatory cytokines will be observed in patients than in controls in the overweight group with respect to this same comparison in the normal-weight group.

Methods

Study setting

The data for the present study were obtained from a large epidemiological cohort of patients who have been treated in a longitudinal intervention program of FEP (PAFIP: *Programa de Atención a Fases Iniciales de Psicosis*) conducted at the University Hospital Marqués de Valdecilla in Cantabria, Spain. The main procedures that are carried out in this program have been described elsewhere [19]. The program was approved by the local institutional review board, and informed consent was obtained from patients and their families prior to inclusion.

Subjects

In June 2016, 75 patients with FEP drug-naïve, who were previously included in PAFIP from June 2011 to May 2016, were selected to entry in this study according to the following criteria: (1) age between 15 and 50, (2) residency in the catchment area, (3) experiencing their first-episode of psychosis, (4) no prior treatment with antipsychotic medication, (5) DSM-IV criteria for brief psychotic disorder, schizophreniform disorder, schizophrenia,

schizoaffective disorder, or psychotic disorder not otherwise specified. Patients were excluded if they met any of the following criteria: (1) DSM-IV criteria for drug dependence, (2) DSM-IV criteria for mental retardation, and (3) history of neurological disorder or brain injury. The diagnoses were confirmed by an experienced psychiatrist, applying the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I) 6 months following the baseline visit.

Study design

This is a prospective, open-label study. We selected 75 healthy volunteers with similar characteristics to patients according to some possible confounding variables, such as sex, age, and both cannabis and tobacco consumption, that might have a pro-inflammatory effect. Both controls and patients were separated into two groups according to their BMI: those subjects with a BMI under 25 were considered as normal-weight and those ones with a BMI equal or over 25 were considered as overweight. Fasting venous blood samples were collected at baseline.

We have performed four comparisons of the basal serum levels of the 21 cytokines between the control group and the patient group: (1) between normal-weight controls and normal-weight patients, (2) between overweight controls and overweight patients, (3) between normal-weight controls and overweight controls, and (4) between normal-weight patients and overweight patients.

Serum cytokine/chemokine measurement

Serum cytokine/chemokine levels and different profiles were measured using the Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel protocol from the Milliplex[®] Map Kit (cat. no. HSTCMAG28SPMX21, EMD Millipore, Billerica, MA 01821, USA), following the manufacturer's instructions. Briefly, assay plates were washed with wash buffer, sealed, and mixed on a plate shaker for 10 min at room temperature. The wash buffer was decanted and 50 μ L of the diluted standards, quality controls, and serum samples were added into the appropriate wells. After the addition of the samples or controls, the plates were incubated overnight at 4 °C on a plate shaker with fluorescently labeled capture antibody-coated beads. After overnight incubation with capture antibodies to detect Fractalkine, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-21, IL-23, ITAC, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , and TNF- α , well content was removed and washed using a handheld magnet. Then, 50 μ L of biotinylated detection antibodies were added into each well and incubated for 1 h at room temperature while shaking. Following, without removing well content, 50 μ L of streptavidin-phycoerythrin was added into each well. After incubation for 30 min at room temperature, the samples were washed using a handheld magnet and resuspended in sheath fluid.

Finally, the samples were run on the Luminex 100/200 and the data were collected using the Luminex xPONENT® software (v. 3.1). Analysis of the cytokine/chemokine median fluorescence intensity (MFI) was performed using the MasterPlex® QT software (v1.1). The intra and inter-assay coefficients of variation for all cytokines tested were < 5 and < 15–20%, respectively.

Statistical analysis

According to the normality Kolmogorov-Smirnov test, all continuous variables except BMI and age were departed from a normal distribution. Levene test shows that age has not equality of variances. Therefore, non-parametric tests were used for all continuous variables except for BMI and age. Moreover, a correction for not equality of variances was performed for the age variable.

Sociodemographic and clinical variables were analyzed among control and patient groups using Student *T* test, Wilcoxon *W* test or Chi-Square test as necessary. Wilcoxon *W* test was used to compare the basal serum levels of the 21 cytokines between controls and patients in four different analyses as it was mentioned in the study design section. Although these are considered as planned or “a priori” contrasts, as many tests are being conducted, the probability of making a type I error (false positive) is increased. Keeping this in mind, we decided to apply the Bonferroni adjustment for planned comparisons and lowering the threshold of statistical significance to 0.0125 ($0.05/4 = 0.0125$), being 4 the number of independent contrasts that have been conducted.

For describing the samples, means and standard deviations were used in the case of continuous variables, whereas the total number of observations and percentages were used for qualitative variables. Median serum cytokine levels and interquartile range (IQR) were represented by box plots after performing a natural logarithmic transformation.

STATA 15.0 was used for statistical analysis. Statistical tests were two-tailed with a 99% confidence interval.

Results

Differences in sociodemographic and clinical variables

As shown in Table 1, there were no statistically significant differences between healthy volunteers and patients in terms of demographic and clinical variables (all p s > 0.1), except for BMI ($t = -4.06$; $p = 0.001$) in the normal-weight group, and in terms of age ($t = 2.49$; $p = 0.017$) and cannabis-use ($\chi^2 = 10.97$; $p = 0.001$) in the overweight group.

Basal serum cytokine levels: analyses stratified by BMI

Out of 75 patients, 53 (70.7%) had a BMI under 25 and thus were considered as normal-weight individuals

(BMI mean = 20.3; sd = 2.28), whereas 22 (29.3%) were considered as overweight individuals (BMI mean = 28.2; sd = 2.28). Of the control subjects, 45 (60%) were initially considered as normal-weight (BMI mean = 22.0; sd = 1.77), whereas 30 (40%) were classified as belonging to the overweight group (BMI mean = 29.6; sd = 3.83).

In comparison of the basal serum cytokine levels between healthy volunteers and patients with normal weight, Fig. 1 shows that IL-8 was the only cytokine that was higher in patients than in the controls ($p = 0.001$). In comparison of the basal serum cytokine levels between healthy volunteers and patients with overweight as shown in Fig. 2, serum levels of two pro-inflammatory cytokines (IL-6, $p = 0.000$; IL-1 β , $p = 0.003$), two chemokines (IL-8, $p = 0.001$; MIP-1 β , $p = 0.001$), four Th-1 and Th-2 cytokines (IL-13, $p = 0.009$; IL-2, $p = 0.001$; IL-7, $p = 0.001$; IL-12p70, $p = 0.010$), and one Type-3 cytokine (IL-23, $p = 0.010$) were higher in patients than in the controls. As a secondary analysis, we have compared the basal serum cytokine levels between normal-weight and overweight individuals within both groups of healthy volunteers and patients, as shown in Figs. 3 and 4. No differences were found between the normal-weight and the overweight individuals in the control group (all p s > 0.01), whereas in the patient group, the overweight individuals had higher levels of several cytokines such as IL-6 ($p = 0.000$), IL-13 ($p = 0.000$), IL-2 ($p = 0.002$), IL-7 ($p = 0.000$), and MIP-1 β (0.010) than the normal-weight individuals.

Discussion

These findings support our main hypothesis that excess weight can alter the homeostasis of the immune system and therefore may have an additive pro-inflammatory effect on the one produced by psychosis in the central nervous system (CNS). As far as we know, this is the first research that studies the direct effect of excess weight on basal serum cytokine levels in individuals with FEP.

In the present study, we separated the subjects into two different groups according their BMI (Table 1). In the normal-weight group, only the IL-8 (chemokine) was higher in patients than in healthy volunteers, whereas in the overweight group, we found more differences, as expected: patients had higher levels than the control subjects of two pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 β), two chemokines (IL-8, MIP-1 β), four Th-1 and Th-2 cytokines (IL-13, IL-2, IL-7, IL-12p70), as well as one Type-3 cytokine (IL-23) (Figs. 1 and 2). IL-8 seems to be the chemokine more related to psychosis and might be considered as a probably state/trait marker of the disease. This is supported by the fact that its levels

Table 1 Demographic and clinical characteristics between healthy volunteers and patients according to BMI

	Entire sample N = 150	Normal-weight Control group n = 45	Normal-weight Patient group n = 53	Overweight Control group n = 30	Overweight Patient group n = 22	Statistics
	N (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Sex (female)	76 (50.7)	23 (51.1)	31 (58.5)	13 (43.3)	9 (40.9)	$\chi^2 = 0.53; p = 0.464^a$ $\chi^2 = 0.03; p = 0.861^b$
Cannabis users	51 (34.0)	12 (26.7)	24 (45.9)	14 (46.7)	1 (4.6)	$\chi^2 = 3.63; p = 0.057^a$ $\chi^2 = 10.97; p = 0.001^b$
Tobacco users ^c	76 (51.4)	22 (48.9)	27 (51.9)	19 (63.3)	8 (38.1)	$\chi^2 = 0.09; p = 0.766^a$ $\chi^2 = 3.16; p = 0.076^b$
	Mean (sd)	Mean (sd)	Mean (sd)	Mean (sd)	Mean (sd)	Statistics
Age at onset (years)	29.2 (7.15)	28.2 (6.09)	27.7 (7.33)	29.6 (6.53)	34.5 (7.46)	$t = -0.33; p = 0.739^a$ $t = 2.49; p = 0.017^b$
BMI at baseline (kg/m ²)	23.8 (4.59)	22.0 (1.77)	20.3 (2.28)	29.6 (3.83)	28.2 (2.28)	$t = -4.06; p = 0.000^a$ $t = -1.50; p = 0.139^b$

^aComparison between patients and healthy volunteers in the normal-weight group

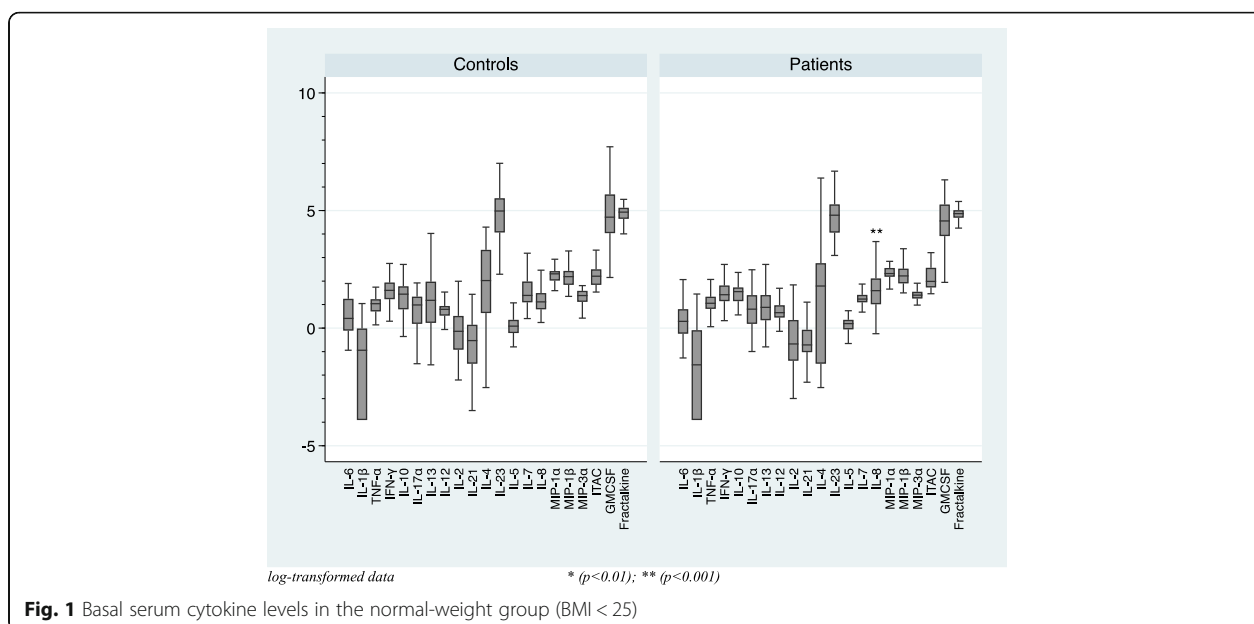
^bComparison between patients and healthy volunteers in the overweight group

^cn = 148

are not influenced by weight (no differences were found between overweight patients and normal-weight patients, as shown in Fig. 4), as well as its levels are higher in patients than in healthy volunteers in both overweight comparison and in normal-weight comparison (see Figs. 1 and 2). In addition, one article by Hayes et al. (2014) found higher IL-8 levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of schizophrenia patients than in healthy volunteers; they concluded that the differences observed were consistent, suggesting these may represent a trait marker associated with psychosis. Regarding the rest of altered cytokines between patients and controls in the overweight group, the cytokines which are more related to overweight are IL-6, TNF- α , and IL-1 β . The fact that

these cytokines are not higher in the overweight control group than in the normal-weight control group suggest that excess weight in isolation, without the synergistic pro-inflammatory effect of psychosis, might not be enough to alter these cytokines in some cases.

Previous studies carried out in FEP either have excluded the overweight individuals [7, 20, 23] from the analysis or have not considered the BMI in the analysis [6, 18] because the result was similar between patients and controls. Regarding the two articles that did not consider the effect of the BMI, Di Nicola et al. [6] and Noto et al. [18] observed that IL-6, TNF- α , and IL-8 were higher in patients than in healthy volunteers. On the other hand, regarding the three studies which



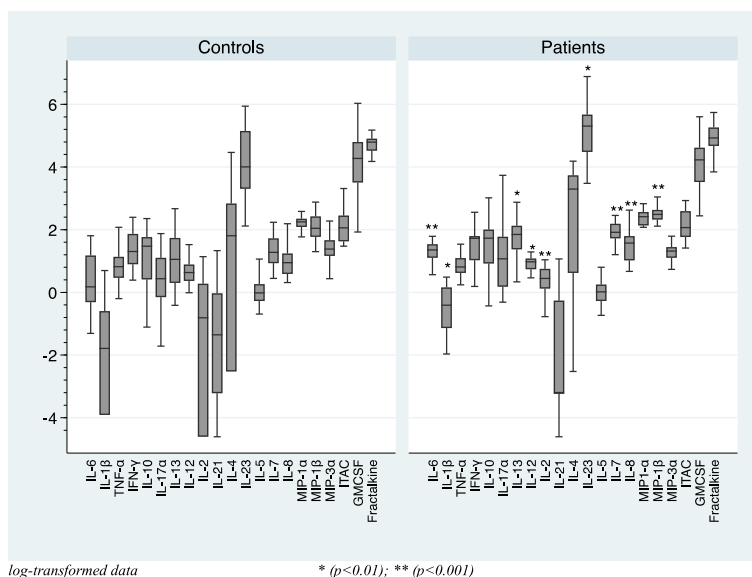


Fig. 2 Basal serum cytokine levels in the overweight group (BMI ≥ 25)

excluded overweight individuals from the analysis, Ding et al. [7] found that IL-6 and IL-17 were increased in patients when compared to controls, Song et al. [23] found that IL-6, TNF- α , and IL-1 β were elevated in patients compared to healthy volunteers, and [20] observed that IL-6 and IL-2 were higher in patients than in controls.

We suggest three possible reasons that may explain the discrepancies between our findings in the normal-weight group, in which only IL-8 was increased in patients as opposed to the control subjects, and previous studies that excluded the overweight individuals [7, 20, 23], where several pro-inflammatory cytokines as well as

Th-1 and Th-2 cytokines are altered. First, whereas our study population is of Caucasian origin, the studies by Ding et al. [7] and Song et al. [23] were conducted in Asian populations, so some of the differences could be explained by genetic background. Second, cannabis, which is known to play a role in the homeostasis of the immune system [24], has not been considered as a possible confounding variable in the match of any of the three studies. Third, it is important to remark that individuals with identical BMI may have different body compositions regarding fat and muscle, so we cannot exclude the contribution of

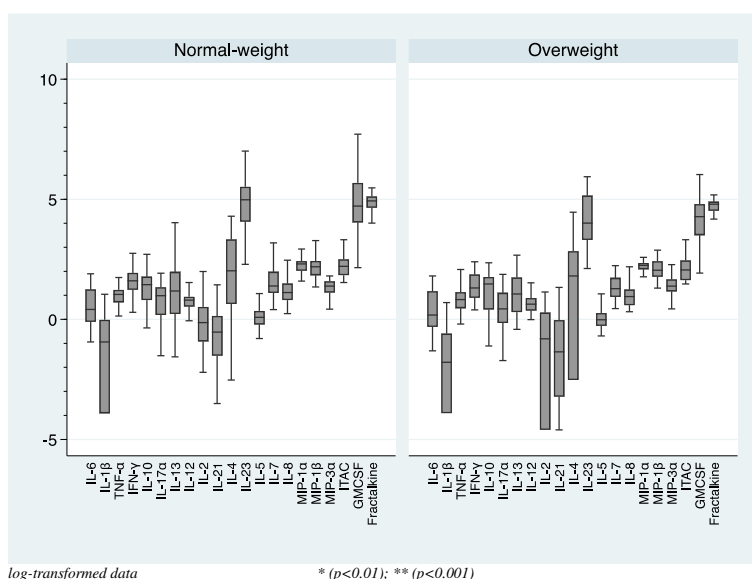
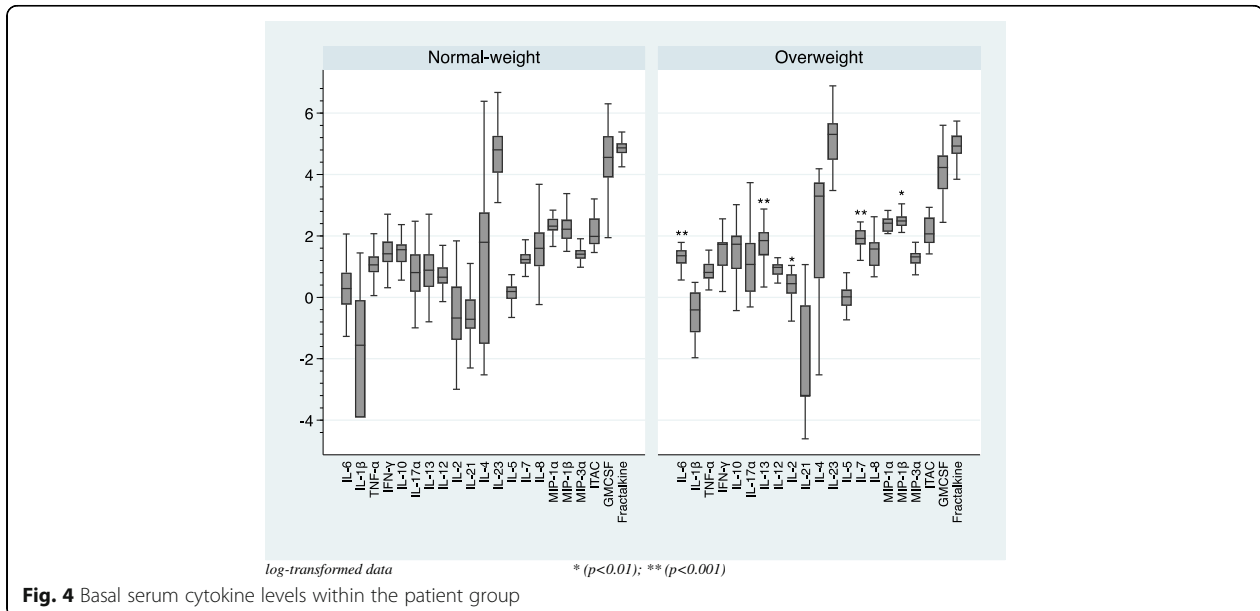


Fig. 3 Basal serum cytokine levels within the control group



adipose tissue or of other lymphoid or non-lymphoid cells to the elevated levels of pro-inflammatory cytokines [6, 26].

Excess weight may produce a pro-inflammatory effect when BMI is equal or over 25 [16, 22]. Thus, although there is a statistically significant difference between BMI of healthy volunteers and patients in the normal-weight group (see Table 1), as BMI is under 25 in both sub-groups, the difference observed should not assume any effect on the cytokines studied.

In this study, the overweight controls used more cannabis than the overweight patients ($p = 0.001$), as shown in Table 1. Cannabis may have an anti-inflammatory effect [24] that could explain why more differences have been found in the overweight group with regard to the normal-weight group. Thus, we have repeated the previous analysis excluding cannabis-use individuals and found that the results remain similar. Because the cannabis variable is qualitative (consumption yes/no), we may speculate that our findings seem to support the notion that overweight controls might consume small amounts of cannabis and therefore it seems not to have any anti-inflammatory effect on the cytokines studied.

Regarding the likely effect of age in our study, patients in the overweight group are older than the controls ($p = 0.017$), as shown in Table 1. Álvarez-Rodríguez et al. [1] described a positive correlation between age and some circulating pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-12. However, this correlation was observed for individuals with a mean age difference much greater than the one observed in our sample (25 years of age difference VS 5 years of age difference, respectively). In addition, as shown in Fig. 2, patients in

the overweight group had higher levels of other cytokines besides the pro-inflammatory ones that have not been previously correlated with age, such as two chemokines (IL-8 and MIP-1 β) and also several Th-1 and Th-2 cytokines (IL-13, IL-2, and IL-7).

Three original studies [8, 13, 21] and one meta-analysis [27] have found elevated mRNA expressions of several pro-inflammatory cytokines and Toll-like receptors in post-mortem brains of individuals with schizophrenia. Moreover, as it was mentioned above, Hayes et al. [14] found higher levels of IL-8 in the CSF of psychosis individuals compared to healthy volunteers. However, peripheral blood is a biological matrix not sensitive enough to detect immune disturbances in the CNS. Furthermore, it is possible that CNS immune changes may be only observed after a second hit. Thus, the inflammation induced by the overweight might be the spark that initiates the fire and the inflammation caused by psychosis would be the second hit [16, 22, 25]. The fact that the largest differences in the basal cytokine levels between patients and healthy volunteers were found in the overweight group might be explained by the additive pro-inflammatory effect of both excess weight and psychosis [4, 22]. This is supported by the analyses comparing the basal serum cytokine levels between normal-weight and overweight individuals within the groups of healthy volunteers and patients; Fig. 3 shows no differences in the cytokine levels between overweight and normal-weight healthy volunteers, whereas in Fig. 4, it is depicted that overweight patients have higher inflammatory cytokine and chemokine levels than the normal-weight patients. Keeping this in mind, we suggest that cytokines are probably not the best biomarkers to detect the inflammation

that is taking place in the CNS because they are influenced by several confounding factors such as BMI, cannabis use, the taking of analgesics and anti-inflammatory drugs, stress, and age.

This study has several limitations that should be considered: (1) stress level, which is known to influence inflammatory status, was not measured; (2) we have not been able to gauge the possible influence of adipose tissue on the pro-inflammatory cytokines; (3) we were not able to consider the consumption of classical analgesic or anti-inflammatory drugs as possible confounding factors (however, it is important to remark that the subjects from this study are young, healthy individuals without chronic diseases or chronic treatments); and (4) analyses were performed on peripheral blood. We assume that these findings are an indirect reflection of the CNS events; therefore, we would expect to find a greater disturbance of these cytokines in the CNS.

Conclusions

We found that the most remarkable differences in the basal serum cytokine levels between patients and healthy volunteers were found in the overweight group. In addition, the overweight patients had higher levels of several inflammatory cytokines and chemokines than the normal-weight patients, whereas no differences were found between the normal-weight controls and the overweight controls. Considering these findings, we suggest that excess weight may help to detect immune alterations in peripheral blood that are taking place in the CNS by psychosis, due to a possible additive pro-inflammatory effect that alters the homeostasis of the immune system.

Abbreviations

BMI: Body mass index; CNS: Central nervous system; CSF: Cerebrospinal fluid; FEP: First-episode psychosis

Acknowledgements

We wish to thank the PAFIP researchers who helped with data collection and especially acknowledge Duly. Finally, we would also like to thank the participants and their families for enrolling in this study.

Availability of data materials

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Funding

The present study was carried out at the Hospital Marqués de Valdecilla, University of Cantabria, Santander, Spain, under the following grant support from MINECO SAF2013-46292-R, Instituto de Salud Carlos III, and Fundación Marqués de Valdecilla. No pharmaceutical company has participated in the study concept and design, data collection, analysis and interpretation of the results, and drafting of the manuscript. We thank the Valdecilla Biobank for blood sampling handling and storage. We also wish to thank the participants and their families for enrolling in this study. The study, designed and directed by B C-F, conformed to international standards for research ethics and was approved by the local institutional review board.

Authors' contributions

All authors participated in bibliographic search, manuscript preparation, and revision and approved the final version of the paper.

Ethics approval and consent to participate

Approval status: approved. Approval number 2016.119. Board name: Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria. Board affiliation: CEIC de Cantabria. Email: eclinicos4@idival.org

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

Prof. Crespo-Facorro has received speaking honoraria (advisory board and educational lectures) and travel expenses from Teva, Otsuka, Lundbeck, and Johnson & Johnson in the last 3 years. Dr. Juncal-Ruiz has received travel expenses from Lundbeck, Johnson & Johnson, and Rovi in the last 3 years. Dr. Ramirez-Bonilla has received travel expenses from Lundbeck and Johnson & Johnson in the last 3 years. Prof. López Hoyos, Prof. Leza, Dr. Riesco-Davila, Dr. Ocejo-Viñal, Dr. Irure-Ventura, Mrs. Martinez-Garcia, and Mr. Ortiz-Garcia declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Psychiatry, Sierrallana Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Torrelavega, Spain. ²Department of Psychiatry, Marqués de Valdecilla University Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain. ³Department of Immunology, Marqués de Valdecilla University Hospital, IDIVAL, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain. ⁴Centro de investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Santander, Spain. ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Complutense University, Madrid, Spain. ⁶Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain. ⁷Instituto de Investigación Sanitaria (IS) Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain.

Received: 23 December 2017 Accepted: 11 February 2018

Published online: 28 February 2018

References

- Álvarez-Rodríguez L, López-Hoyos M, Muñoz-Cacho P, Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol.* 2012;273:124–32.
- Annamalai A, Kosir U, Tek C. Prevalence of obesity and diabetes in patients with schizophrenia. *World J Diabetes.* 2017;8(8):390–6.
- Beumer W, Drexhage RC, De Wit H, Versnel MA, Drexhage HA, Cohen D. Increased level of serum cytokines, chemokines and adipokines in patients with schizophrenia is associated with disease and metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37:1901–11.
- Borska L, Kremlacek J, Andrys C, Krejssek J, Hamakova K, Borsky P, Palicka V, et al. Systemic inflammation, oxidative damage to nucleic acids, and metabolic syndrome in the pathogenesis of psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18:2238.
- Crespo-Facorro B, Carrasco-Marín E, Pérez-Iglesias R, Pelayo-Terán JM, Fernandez- Prieto L, Leyva-Cobián F, Vázquez-Barquero JL. Interleukin-12 plasma levels in drug-naïve patients with a first episode of psychosis: effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 2008;158(2):206–16.
- Di Nicola M, Cattaneo A, Hepgul N, Di Forti M, Aitchison KJ, Janiri L, Murray RM, Dazzan P, Pariante CM, Mondelli V. Serum and gene expression profile of cytokines in first-episode psychosis. *Brain Behav Immun.* 2012;31:90–5.
- Ding M, Song X, Zhao J, Gao J, Li X, Yang G, Wang X, Harrington A, Fan X, Lv L. Activation of Th17 cells in drug naïve, first episode schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014;51:78–82.
- Fillman SG, Cloonan N, Catts VS, Miller LC, Wong J, McCrossin T, et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2013;18:206–14.
- Fond G, d'Albis MA, Jamain S, Tamouza R, Arango C, Fleischhacker WW, Glenthøj B, et al. The promise of biological markers for treatment response in first-episode psychosis: a systematic review. *Schizophr Bull.* 2015;41:559–73.
- Fond G, Resseguier N, Schürhoff F, Godin O, Andrianarisoa M, Brunel L, Bulzacka E, et al. Relationships between low-grade peripheral inflammation and psychotropic drugs in schizophrenia: results from the national FACE-SZ

- cohort. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2017; <https://doi.org/10.1007/s00406-017-0847-1>.
11. García-Bueno B, Bioque M, MacDowell KS, Barcones MF, Martínez-Cengotitabengoa M, Pina-Camacho L, Rodríguez-Jiménez R, Sáiz PA, Castro C, Lafuente A, Santabárbara J, González-Pinto A, Parellada M, Rubio G, García-Portilla MP, Micó JA, Bernardo M, Leza JC. Pro-/anti-inflammatory dysregulation in patients with first episode of psychosis: toward an integrative inflammatory hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2014a; 40(2):376–87.
 12. García-Bueno B, Bioque M, MacDowell KS, Santabárbara J, Martínez-Cengotitabengoa M, Moreno C, Sáiz PA, Berrocoso E, Gassó P, Fe Barcones M, González-Pinto A, Parellada M, Bobes J, Micó JA, Bernardo M, Leza JC. Pro-/anti-inflammatory dysregulation in early psychosis: results from a 1-year follow-up study. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014b;18(2) <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu037>.
 13. García-Bueno B, Gassó P, MacDowell KS, Callado LF, Mas S, Bernardo M, Lafuente A, Meana JJ, Leza JC. Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 pro-inflammatory pathway in patients with schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*. 2016 May;41(3):E46–55. <https://doi.org/10.1503/jpn.150195>.
 14. Hayes LN, Severance EG, Leek JT, Gressitt KL, Rohleder C, Coughlin JM, Leweke M, et al. Inflammatory molecular signature associated with infectious agents in psychosis. *Schizophr Bull*. 2014; p. 963–72. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu052>.
 15. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011;70:663–71.
 16. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203):428–35.
 17. Monteiro R & Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediat Inflamm*. 2010; 2010: 289645. <https://doi.org/10.1155/2010/289645>.
 18. Noto C, Ota VK, Gouveia ES, Rizzo LB, Spindola LM, Honda PH, Cordeiro Q, et al. Effects of risperidone on cytokine profile in drug-naïve first-episode psychosis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015 Feb;18(4):pyu042. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu042>.
 19. Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Ramírez-Bonilla M, González-Blanch C, Martínez-García O, Pardo-García G, Rodríguez-Sánchez JM, et al. Epidemiological factors associated with treated incidence of first-episode non-affective psychosis in Cantabria: insights from the Clinical Programme on Early Phases of Psychosis. *Early Interv Psychiatry*. 2008;2(3):178–87.
 20. Petrikis P, Voulgari PV, Tzallas AT, Archimandriti DT, Skapinakis P, Mavreas V. Cytokine profile in drug-naïve, first episode patients with psychosis. *J Psychosom Res*. 2015;79:324–7.
 21. Rao JS, Kim H-W, Harry GJ, Rapoport SI, Reese EA. Increased neuroinflammatory and arachidonic acid cascade markers, and reduced synaptic proteins, in the postmortem frontal cortex from schizophrenia patients. *Schizophr Res*. 2013;147:24–31.
 22. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, ChittkaT MR, et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121971.
 23. Song X, Fan X, Li X, Zhang W, Gao J, Zhao J, Harrington A, Ziedonis D, Changes LL. In pro-inflammatory cytokines and body weight during 6-month risperidone treatment in drug naïve, first-episode schizophrenia. *Psychopharmacology*. 2014;231(2):319–25.
 24. Suárez-Pinilla P, López-Gil J, Crespo-Facorro B. Immune system: a possible nexus between cannabinoids and psychosis. *Brain Behav Immun*. 2014;40:269–82.
 25. Šumanović-Glamuzina D, Čulo F, Čulo MI, Konjevoda P, Jerković-Raguž M. A comparison of blood and cerebrospinal fluid cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α) in neonates with perinatal hypoxia. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017;17(3): 203–10. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2017.1381>.
 26. Thakore JH, Richards PJ, Reznick RH, Martin A, Dinan TG. Increased intra-abdominal fat deposition in patients with major depressive illness as measured by computed tomography. *Biol Psychiatry*. 1997;41:1140–2.
 27. Van Kesteren CF, Gremmels H, de Witte LD, Hol EM, Van Gool AR, Falkai PG, Kahn RS, Sommer IE. Immune involvement in the pathogenesis of schizophrenia: a meta-analysis on postmortem brain studies. *Transl Psychiatry*. 2017;7(3):e1075.
 28. Yamane H, Paul WE. Cytokines of the γ (c) family control CD4+ T cells differentiation and function. *Nat Immunol*. 2012;13:1037–44.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



7. DISCUSIÓN

Hasta donde llega nuestro conocimiento, los dos estudios que constituyen esta tesis doctoral han sido los primeros en comparar el efecto antiinflamatorio de aripiprazol y risperidona y en evaluar el efecto sumatorio de la inflamación sistémica de “bajo grado” asociada al sobrepeso y de la neuroinflamación asociada a los PEP.

Nuestros resultados secundan a estudios previos (Crespo-Facorro et al., 2008; Di Nicola et al., 2013; Noto et al., 2014; Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Petrikis et al., 2015, 2017) respecto a que en los sujetos con un PEP existe un estado proinflamatorio que se detecta en sangre periférica y que revierte con el uso de antipsicóticos. Sin embargo, a diferencia de otros estudios que apenas han estudiado las quimiocinas, nuestros hallazgos subrayan el papel de la IL-8 y MIP-1 β en la neuroinflamación asociada a la psicosis. El efecto antiinflamatorio de los dos antipsicóticos fue similar, aunque se ha visto que el aripiprazol parece tener un mayor tamaño del efecto sobre algunas citocinas/quimiocinas. Asimismo, se ha confirmado la hipótesis de que la inflamación sistémica de “bajo grado” que está presente en el exceso de peso, podría actuar como *first-hit*, facilitando la detección en sangre periférica de la neuroinflamación asociada al PEP, por la teoría del “doble impacto”.

Primer estudio

Con respecto a la comparación de los niveles séricos basales de citocinas/quimiocinas, hemos encontrado que los pacientes asignados inicialmente a aripiprazol no tenían diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las 21 citocinas/quimiocinas respecto a los voluntarios sanos (todas las p 's $> 0,01$), mientras que aquellos pacientes que fueron asignados aleatoriamente a risperidona tenían niveles más altos de IL-8 ($p = 0,000$) y MIP-1 β ($p = 0,007$) que los voluntarios sanos, a pesar del hecho de que en ambos grupos de pacientes los niveles de estas dos quimiocinas eran más altos que en el grupo de voluntarios sanos (ver *Figuras complementarias 1 y 2*). Dos posibles razones para explicar estos hallazgos serían: en primer lugar, tanto la diferencia de medias entre los voluntarios sanos y los dos grupos de tratamiento, como la dispersión de los datos, son mayores en el grupo de risperidona (ver *Tabla 2*); y en segundo lugar, en el análisis estadístico llevado a cabo (regresión múltiple no paramétrica) sólo se ha

utilizado el IMC como covariable, ya que fue la única variable que mostró diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante entre los tres grupos. Sin embargo, podría haber otras variables que podrían estar actuando como factores de confusión o modificadores del efecto, que no se han tenido en cuenta en el análisis.

En relación a las quimiocinas que estaban elevadas en los pacientes respecto a los voluntarios sanos (IL-8 y MIP-1 β), Di Nicola y colegas (2013) también observaron una elevación de los niveles séricos basales de IL-8 en su estudio. Un estudio reciente publicado por Frydecka y colegas (2018) sugería que el aumento de estas quimiocinas podría estar asociado con el progreso de la enfermedad, ya que sólo lo observaron en sujetos con esquizofrenia crónica y no en sujetos con PEP. Esta discrepancia entre sus resultados y los nuestros podría explicarse por las diferencias metodológicas: en su estudio se analizó un número escaso de sujetos ($n = 39$), de los cuales sólo 9 eran *drug-naïve*; además, no se tuvo en cuenta el consumo de cannabis en el diseño del estudio.

Por otro lado, a diferencia de estudios previos (Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Noto et al., 2014), nosotros no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en IL-6, TNF- α e IL-1 β , que son curiosamente tres de las citocinas proinflamatorias más afectadas por el IMC (Song et al., 2014). Inicialmente atribuimos estas diferencias a que en nuestro estudio, en contraposición con otros (Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Petrikis et al., 2015), no hemos excluido a las personas con sobrepeso sino que hemos utilizado el IMC como covariable. No obstante, cuando se introduce una covariable en un modelo estadístico, se anula su efecto sobre la variable respuesta y por lo tanto, los resultados deberían ser similares a los que cabría encontrar en sujetos sin sobrepeso, pero con mayor poder estadístico porque no disminuimos el tamaño muestral. De hecho, los resultados del análisis basal del primer estudio son muy similares a los obtenidos en la comparación de voluntarios sanos con normopeso y pacientes con normopeso en el segundo estudio, donde sólo la IL-8 mostró una elevación estadísticamente significativa. Por lo tanto, estas diferencias probablemente se deban al efecto de otras variables sociodemográficas o clínicas sobre los niveles séricos de citocinas/quimiocinas. Por ejemplo, mientras que nuestra población de estudio es de origen caucásico, los estudios llevados a cabo por Ding y colegas (2014) y por Song y colegas (2014) se llevaron a cabo en poblaciones asiáticas, por lo que algunas diferencias podrían explicarse por el *background* genético. Además, el cannabis, que se sabe que tiene un efecto en la regulación del sistema inmune (Bioque et al., 2013; Suárez-Pinilla et al., 2014), no se ha considerado en el emparejamiento de los voluntarios sanos y de los

pacientes, ni en el análisis estadístico, en ninguno de los tres estudios (Ding et al., 2014; Song et al., 2014; Noto et al., 2014). En tercer lugar, es importante señalar que personas con idéntico IMC, pueden tener diferencias en la composición corporal de grasa y músculo, por lo que no podemos excluir la contribución del tejido adiposo o de otras células linfoides o no linfoides sobre los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias (Thakore et al., 1997; Di Nicola et al., 2013).

Respecto a la eficacia antiinflamatoria de risperidona y aripiprazol, en los dos grupos de antipsicóticos se ha observado una disminución estadísticamente significativa de varias citocinas/quimiocinas después de 3 meses de tratamiento, lo que apunta a un efecto antiinflamatorio de los dos fármacos, tal y como se muestra en las *Figuras 1 y 2*. Interesantemente, las dos quimioquinas que estaban elevadas en el análisis basal (IL-8 y MIP-1 β), disminuyeron significativamente después del tratamiento. Como se ha descrito de forma más detallada en la sección de Introducción, nuestros hallazgos sobre el efecto antiinflamatorio de los antipsicóticos están respaldados por estudios previos: Noto et al., (2014) observaron que la IL-6, IL-10, TNF- α e IL-4 disminuyeron significativamente después de seis semanas de tratamiento con risperidona. Asimismo, Sobiś et al., (2015) encontraron que la IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23, IL-4 e IFN- γ disminuyeron significativamente después de cuatro semanas de tratamiento con aripiprazol. Sin embargo, a diferencia de un metanálisis publicado por Miller et al. (2011) en el que el TNF- α parecía ser un marcador de rasgo en la psicosis, en nuestro estudio, al igual que en los anteriores (Noto et al., 2014; Sobiś et al., 2015), esta citocina disminuyó significativamente después del tratamiento, a pesar de que sus niveles basales no presentaban diferencias significativas respecto a los voluntarios sanos. El hecho de que varios estudios hayamos encontrado una disminución del TNF- α tras el uso de antipsicóticos, plantea la duda de si se trata de un marcador de rasgo o de estado en la psicosis. Probablemente estas diferencias se expliquen por las características de las muestras y por la metodología utilizada en los distintos estudios y sería necesario confirmarlo con nuevas investigaciones.

El efecto antiinflamatorio de ambos tratamientos fue similar para el panel de 21 citocinas/quimiocinas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los porcentajes de cambio. No obstante, se ha visto que el aripiprazol presenta un mayor tamaño del efecto sobre la IL-6, TNF- α , IL-13, IL-17 α y Fractalkine (cambio de pequeño a medio), mientras que la risperidona tiene un tamaño del efecto

mayor sobre MIP-1 β (cambio de pequeño a medio). El hecho de que no se encontrasen diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los porcentajes de cambio pero sí en los tamaños del efecto, se puede entender si tenemos en cuenta que la potencia estadística de cualquier test estadístico (en este caso del W-Wilcoxon Singed-Rank para datos independientes) se afecta notablemente por el tamaño de la muestra, en contraposición con los coeficientes que miden el tamaño del efecto, que informan de la importancia de las diferencias en el mundo real sin tener en cuenta el tamaño muestral (Cohen, 1992; Fritz et al., 2012). A pesar de estos hallazgos, es importante señalar que este es un trabajo exploratorio en el que se ha analizado un amplio *array* de citocinas/quimiocinas y por lo tanto debemos ser cautelosos con la interpretación de los resultados.

En cuanto a los mecanismos implicados en el efecto antiinflamatorio de los antipsicóticos, Kato et al. (2011) sugirieron que los antipsicóticos podrían actuar modulando directamente la respuesta de la microglía a través de los receptores de dopamina que están en la superficie de éstas y de otras células del sistema inmune (Farber et al., 2005; Franco et al., 2007; Pacheco et al., 2014). Más concretamente, se ha descrito que los antipsicóticos podrían inducir un efecto inhibitorio sobre la activación de la microglía (Liu y Hong, 2003; Kato et al., 2007) y de esta manera, reducir el daño neuronal asociado a la producción de citocinas/quimiocinas proinflamatorias y de radicales libres. En este sentido, el hecho de que el aripiprazol sea un agonista parcial dopaminérgico, podría explicar por qué en nuestro estudio ha mostrado tener un mayor tamaño de efecto sobre algunas citocinas/quimiocinas. Teniendo en cuenta sus propiedades agonistas parciales, su efecto regulador sobre la activación de la microglía a través de los receptores dopaminérgicos que éstas tienen en su superficie, va a depender del desequilibrio dopaminérgico en cada área cerebral, por lo que esta regulación podría ser más específica y eficaz que con fármacos antagonistas como la risperidona, cuya acción sobre los receptores D2 de la microglía es independiente de los niveles extracelulares de dopamina.

En relación al efecto que puede tener sobre los niveles séricos de citocinas/quimiocinas los cambios que se producen en algunas variables a lo largo del periodo de seguimiento, como por ejemplo el cese del consumo de cannabis después de la hospitalización o el aumento del IMC asociado al tratamiento antipsicótico, es importante hacer las siguientes consideraciones: aunque clásicamente se han descrito propiedades antiinflamatorias relacionadas con el consumo de cannabis exógeno

(Nagarkatti et al., 2009) y por tanto el cese en su consumo podría suponer un aumento de citocinas/quimiocinas proinflamatorias o descenso de las citocinas antiinflamatorias, lo cierto es que dependiendo de la frecuencia e intensidad de consumo, así como de la presencia de alteraciones previas en varios componentes del sistema endocanabinoide, el consumo de cannabis puede tener un efecto antiinflamatorio o proinflamatorio (Bioque et al., 2013; Suárez-Pinilla et al., 2014). Como la variable consumo de cannabis utilizada en estos estudios es cualitativa (sí/no), no ha sido posible controlar los resultados por la cantidad de cannabis consumido, por lo que hemos repetido los análisis anteriores estratificando por el consumo de cannabis y los resultados obtenidos son similares. En el segundo artículo también se realizó un análisis similar, ya que en el grupo con sobrepeso los voluntarios sanos consumían más cannabis que los pacientes ($\chi^2 = 10,97$; $p = 0,001$); en este caso, en lugar de realizar un análisis estratificado por la variable consumo de cannabis, se repitió el análisis inicial eliminando a los sujetos consumidores, ya que el análisis estratificado no podía realizarse porque sólo había un consumidor de cannabis en el grupo de pacientes con sobrepeso (ver *Tabla 1*). Tras eliminar a los sujetos consumidores del análisis, también se obtuvieron resultados similares. Esto apuntaría a que el consumo de cannabis en nuestra muestra es poco frecuente y/o poco intenso y por lo tanto parece no alterar de forma significativa los niveles séricos de las citocinas/quimiocinas estudiadas. Respecto a la asociación que existe entre los antipsicóticos y el aumento de peso (Pisano et al., 2017), aunque se observa un mayor IMC en ambos grupos de tratamiento cuando finalizan los 3 meses de seguimiento, nuestros resultados no parecen estar influenciados por este cambio, ya que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el peso basal y el peso a los 3 meses en ambos grupos de tratamiento ni tampoco en la comparación del IMC entre los dos tratamientos a los 3 meses (p 's $> 0,05$). Además, si aumenta el IMC, cabría esperar un aumento de algunas citocinas/quimiocinas proinflamatorias, y por lo tanto, no explicaría el efecto antiinflamatorio observado en este estudio.

Con respecto a la posible correlación entre el estado clínico e inflamatorio, al igual que otro estudio llevado a cabo por Petrikis y colegas (2017), no hemos encontrado una correlación estadísticamente significativa entre la disminución de las citocinas/quimiocinas proinflamatorias y la disminución de la puntuación total de las escalas clínicas (BPRS, SAPS, SANS) después de 3 meses de tratamiento antipsicótico. Esta falta de significación probablemente se deba a que a los 3 meses la mayoría de los

pacientes estaban en remisión clínica, con puntuaciones muy bajas en las tres escalas clínicas. Por este motivo, sería interesante repetir estos análisis a las pocas semanas de iniciar el tratamiento antipsicótico.

Segundo estudio

La segunda publicación de esta tesis ha estudiado el posible efecto sumatorio del sobrepeso y la neuroinflamación asociada al PEP sobre los niveles séricos de 21 citocinas/quimiocina. Nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de partida de que en los sujetos con una alteración previa de la homeostasis del sistema inmune, en este caso por la inflamación sistémica asociada al exceso de peso, es más probable detectar en sangre periférica la inflamación que está teniendo lugar en el SNC. Como se ha comentado más arriba, esto se explicaría por la teoría del “doble impacto”.

Esta conclusión está respaldada por los siguientes análisis: por un lado, los pacientes con normopeso sólo presentaban un aumento de la IL-8 respecto a los voluntarios sanos con normopeso (ver *Figura 1*), mientras que en la comparación entre los pacientes con sobrepeso y los voluntarios sanos con sobrepeso, se ha observado que los pacientes tenían una elevación estadísticamente significativa de varias citocinas proinflamatorias (incluidas las que antes describíamos como altamente influenciadas por el IMC, como la IL-6 y la IL-1 β), además de otras citocinas/quimiocinas (IL-8, MIP-1 β , IL-13, IL-2, IL-7, IL-12 e IL-23), tal y como muestra la *Figura 2*. Por otro lado, no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los voluntarios sanos con sobrepeso y con normopeso (ver *Figura 3*), mientras que los pacientes con sobrepeso presentaban una elevación estadísticamente significativa de varias citocinas/quimiocinas proinflamatorias (IL-6, IL-13, IL-2, IL-7 y MIP-1 β) respecto a los pacientes con normopeso (ver *Figura 4*).

Es decir, este estudio sugiere que ambas situaciones, la neuroinflamación asociada a la psicosis y la inflamación sistémica de “bajo grado” asociada al exceso de peso, podrían ser necesarias para detectar en sangre periférica la neuroinflamación que aparece en los PEP, en al menos un subgrupo de pacientes. Esto se puede entender si se tiene en cuenta la dificultad que tiene la detección en sangre periférica de una alteración que está teniendo lugar en el SNC (Schmidt et al., 2015; Šumanović-Glamuzina et al., 2017). Es importante señalar que la IL-8 es la única quimiocina que ha mostrado diferencias significativas en el grupo de normopeso, y de forma global, es la quimiocina

que parece ser más relevante en la neuroinflamación de los PEP si tenemos en cuenta los resultados de los dos estudios que componen esta tesis doctoral.

En este segundo artículo, tal y como se muestra en la *Tabla 1*, se aprecia una diferencia estadísticamente significativa en la edad de los grupos con sobrepeso: los pacientes tienen más edad que los voluntarios sanos ($t=2,49$; $p=0,017$). Álvarez-Rodríguez y colegas (2012) describieron una correlación positiva entre la edad y los niveles séricos de algunas citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12. Sin embargo, esta correlación se observó para las personas con una diferencia media de edad de 25 años o más, que es muy superior a la diferencia de edad encontrada en nuestra muestra, que es de 5 años. Además, como se muestra en la *Figura 2*, los pacientes con sobrepeso tenían niveles más altos de dos quimiocinas (IL-8 y MIP-1 β), así como de varias citocinas Th-1 y Th-2 (IL-13, IL-2 e IL-7), que no se han correlacionado previamente con la edad.

Discusión final

Como fortaleza de esta investigación debemos destacar que, hasta donde llega nuestro conocimiento, es la primera vez que se analiza un *array* tan amplio de citocinas/quimiocinas, algunas de ellas de reciente descubrimiento, en una misma población de voluntarios sanos y de individuos con un PEP *drug-naïve*. Asimismo, en el diseño y en los análisis estadísticos llevados a cabo, se han tenido en cuenta como potenciales factores de confusión y/o modificadores del efecto el sexo, la edad, el IMC, así como el consumo de cannabis y de tabaco, lo que disminuye la probabilidad de que aparezcan sesgos o errores en la interpretación de los resultados.

Nuestros resultados apoyan la teoría inflamatoria de la esquizofrenia. Aunque el efecto antiinflamatorio de la risperidona y el aripiprazol es similar, el aripiprazol ha mostrado tener un mayor tamaño del efecto sobre algunas citocinas/quimiocinas respecto a la risperidona. Considerando nuestra investigación como exploratoria, es necesario continuar estudiando los efectos que los antipsicóticos pueden tener sobre el sistema inmune, no sólo sobre los niveles séricos de citocinas/quimiocinas, sino a otros niveles de las rutas de señalización intracelular, como por ejemplo sobre la expresión y función de los TLRs, que son los receptores que inician la cascada de señalización intracelular

que aumentará la producción de moléculas proinflamatorias, como las propias citocinas/quimiocinas.

Asimismo, nuestros hallazgos remarcan la importancia de considerar las variables que podrían actuar como factores de confusión y/o modificadores del efecto en los diseños de los estudios que tienen como objetivo cuantificar los niveles séricos de citocinas/quimiocinas en sujetos con psicosis, ya que sus niveles se pueden afectar por factores que son muy prevalentes en la esquizofrenia, como el sobrepeso, el consumo de cannabis y de tabaco y el estrés. Nuestra investigación sugiere que la inflamación de “bajo grado” asociada al sobrepeso facilita la detección en sangre periférica de la neuroinflamación presente en los PEP. En este sentido, es importante señalar que la IL-8, que ha sido poco estudiada en individuos con un PEP, es la quimiocina que ha mostrado diferencias más significativas y estables en los dos estudios de esta tesis, siendo la única con diferencias significativas tanto en el análisis que utilizaba el IMC como covariable, como en los análisis estratificados por IMC. Un estudio reciente llevado a cabo por Hayes y colegas (2014) encontró valores elevados de la IL-8 en el líquido cefalorraquídeo de individuos con un PEP *drug-naïve* y de individuos con riesgo elevado de desarrollar una psicosis respecto a voluntarios sanos, sugiriendo que podría tratarse de un marcador de rasgo en la psicosis. Sin embargo, teniendo en cuenta que en nuestros estudios los valores de la IL-8 estaban aumentados al inicio de la enfermedad y disminuyeron con el tratamiento antipsicótico hasta niveles similares a los encontrados en los voluntarios sanos, sugerimos que podría considerarse más un marcador de estado que de rasgo en la psicosis. No obstante, sería necesario confirmar nuestros hallazgos en futuras investigaciones.

8. LIMITACIONES

- El consumo de cannabis y de tabaco se registraron como variables cualitativas solo al inicio del estudio, por lo que no ha sido posible considerar la cantidad de consumo como posible factor de confusión o modificador del efecto ni en el momento basal ni a los 3 meses de seguimiento.
- Como se ha descrito en la Introducción de esta tesis doctoral, los sujetos con un PEP están expuestos a una situación de estrés agudo que podría producir una alteración en la homeostasis del sistema inmune. A pesar de conocer el efecto que el estrés puede tener sobre la regulación del sistema inmune, no ha sido posible medir el nivel de estrés al que estaba expuesto cada sujeto. Sin embargo, el hecho de que se hayan obtenido resultados similares en otros estudios tanto en PEP (Di Nicola et al., 2013; Noto et al., 2014) como en fases de descompensación de pacientes con esquizofrenia de larga evolución (Sirota et al., 2005; Miller et al., 2011; Borovcanin et al., 2013), así como en estudios llevados a cabo sobre tejido cerebral de pacientes con esquizofrenia (Rao et al., 2013; García-Bueno et al., 2016), hace poco probable que la disregulación del sistema inmune que hemos encontrado en estos estudios se deba solamente a la exposición aguda al estrés. Además, algunos estudios sugieren una mayor alteración del sistema inmune con el paso de los años (Frydecka et al., 2018). Por otro lado, los voluntarios sanos también pueden estar expuestos a factores estresantes que podrían producir una alteración en el sistema inmune (Di Nicola et al., 2013).
- Hemos considerado el valor del IMC para clasificar a los sujetos en el grupo de normopeso o sobrepeso. Sin embargo, no hemos podido medir la posible influencia del tejido adiposo sobre los niveles séricos de citocinas/quimiocinas.
- En el primer estudio, los niveles séricos de citocinas/quimiocinas sólo se han medido en el momento basal y 3 meses después del tratamiento, por lo que no sabemos cómo han ido variando las concentraciones séricas durante este período.

- No se recogieron como potenciales variables de confusión el uso reciente de analgésicos o de fármacos antiinflamatorios distintos a los glucocorticoides. Sin embargo, es importante señalar que los sujetos que forman parte de la muestra de esta tesis son individuos jóvenes y sanos, que no toman medicación de forma habitual ni tienen antecedentes de enfermedades crónicas.
- A pesar de que nuestro objetivo inicial era estudiar la neuroinflamación asociada a la psicosis, la cuantificación de los niveles de citocinas/quimiocinas se ha realizado en sangre periférica. Suponemos que estos hallazgos son un indicador de lo que está ocurriendo en el SNC y, por lo tanto, teniendo en cuenta que estamos midiendo los niveles de citocinas/quimiocinas en suero, esperaríamos encontrar una mayor disregulación del sistema inmune en el SNC.

9. CONCLUSIONES

- En los sujetos con un PEP se ha detectado una elevación en sangre periférica de varias citocinas/quimiocinas proinflamatorias respecto a los voluntarios sanos, lo que apoya la hipótesis inflamatoria de la esquizofrenia. A diferencia de otros estudios, se subraya el papel de las quimiocinas en la neuroinflamación asociada al PEP.
- La inflamación sistémica de “bajo grado” asociada al sobrepeso ayuda a detectar en sangre periférica la neuroinflamación asociada al PEP.
- Después de 3 meses de tratamiento, en ambos grupos de antipsicóticos se ha producido una disminución significativa de varias citocinas/quimiocinas, sin encontrarse diferencias con los niveles séricos observados en los voluntarios sanos. Aunque el efecto antiinflamatorio de la risperidona y el aripiprazol es similar, el aripiprazol ha mostrado tener un mayor tamaño del efecto sobre algunas citocinas/quimiocinas.
- No hemos encontrado una correlación estadísticamente significativa entre la disminución de los niveles séricos de citocinas/quimiocinas y la disminución de la puntuación total de las escalas clínicas (BPRS, SANS y SAPS) después de 3 meses de tratamiento.
- La IL-8 es la quimiocina que ha mostrado diferencias más significativas y estables en los dos estudios de esta tesis doctoral, siendo la quimiocina que menos se afecta por las variaciones en el IMC. Sus valores están aumentados al inicio de la enfermedad y disminuyen con el tratamiento antipsicótico, por lo que podría considerarse un marcador de estado en la psicosis.
- Teniendo en cuenta que los sujetos con psicosis están expuestos a numerosos factores de confusión que pueden alterar los niveles séricos de citocinas/quimiocinas, como el IMC, la edad, o el consumo de tabaco y de

cannabis, es importante considerar estas variables tanto en el diseño como en el análisis estadístico.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-Like Receptors: Critical Proteins Linking Innate And Acquired Immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675–80. doi: 10.1038/90609.
2. Aleman A, Khan RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Archives of General Psychiatry*. 2003;60:565-71. doi: 10.1001/archpsyc.60.6.565.
3. Álvarez-Rodríguez L, López-Hoyos M, Muñoz-Cacho P, Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol*. 2012;273:124–32. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.01.001.
4. American Psychiatric Association, Kupfer DJ, Regier DA, Arango-López C, Ayuso-Mateos JL, Vieta-Pascual E, Bagny-Lifante A. *DSM-5: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*. 5a ed. Madrid [etc.]: Editorial Médica Panamericana, 2014. ISBN: 9788491103721.
5. Andreasen NC. *Scale for the assessment of negative symptoms (SANS)*. Iowa City: University of Iowa. 1983.
6. Andreasen NC. *Scale for the assessment of positive symptoms (SAPS)*. Iowa City: University of Iowa. 1984.
7. Andreasen NC, Flaum M, Arndt S. The Comprehensive Assessment of Symptoms and History (CASH). An instrument for assessing diagnosis and psychopathology. *Arch Gen Psychiatry*. 1992 Aug;49(8):615-23.
8. Annamalai A, Kosir U, Tek C. Prevalence of obesity and diabetes in patients with schizophrenia. *World J Diabetes*. 2017;8(8):390–6. doi: 10.4239/wjd.v8.i8.390.
9. Arango C, Rapado-Castro M, Reig S, Castro-Fornieles J, González-Pinto A, Otero S, Baeza I et al. Progressive brain changes in children and adolescents with first-episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 2012;69:16–26. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.150.
10. Atalay F, Atalay H. Gender differences in patients with schizophrenia in terms of sociodemographic and clinical characteristics. *German Journal of Psychiatry*. 2006;162:2337-2343. ISSN 1433-1055.
11. Ayesa-Arriola R, Setién-Suero E, Neergaard KD, Belzunces AA, Contreras F, van Haren NEM, Crespo-Facorro B. Premorbid IQ subgroups in first episode non affective psychosis patients: Long-term sex differences in function and neurocognition. *Schizophr Res*. 2017;(17)30758-2. doi: 10.1016/j.schres.2017.12.006.
12. Avila MT, Sherr J, Valentine LE, Blaxton TA, Thaker GK. Neurodevelopmental interactions conferring risk for schizophrenia: a study of dermatoglyphic markers in patients and relatives. *Schizophr Bull*. 2003;29(3):595-605. PMID: 14609252.
13. Baldwin P, Browne D, Scully PJ, Quinn JF, Morgan MG, Kinsella A, Owens JM, Russell V, O'Callaghan E, Waddington JL. Epidemiology of first-episode psychosis: illustrating the challenges across diagnostic boundaries through the Cavan- Monaghan study at 8 years. *Schizophr Bull*. 2005;31(3):624-38. doi: 10.1093/schbul/sbi025.

14. Barkus E, Stirling J, Hopkins R, Lewis S. The presence of neurological soft signs along the psychosis proneness continuum. *Schizophr Bull.* 2006 Jul;32(3):573-7. doi: 10.1093/schbul/sbj037.
15. Bennett MR. Stress and anxiety in schizophrenia and depression: glucocorticoids, corticotropin-releasing hormone and synapse regression. *Aust N Z J Psychiatry.* 2008 Dec;42(12):995-1002. doi: 10.1080/00048670802512073.
16. Benros M.E, Nielsen P.R, Nordentoft M, Eaton W.W, Dalton S.O, Mortensen P.B. Autoimmune Diseases And Severe Infections As Risk Factors For Schizophrenia: A 30-Year Population-Based Register Study. *Americal Journal Of Psychiatry* 2011;168:1303-1310.12. doi: 10.1176/appi.ajp.2011.11030516.
17. Beards S, Gayer-Anderson C, Borges S, Dewey ME, Fisher HL, Morgan C. Life events and psychosis: a review and meta-analysis. *Schizophr. Bull.* 2013;39(4):740–747. doi: 10.1093/schbul/sbt065.
18. Bernardo M, Bioque M, Parellada M, Saiz-Ruiz J, Cuesta MJ, Llerena A, Sanjuán J et al. Assessing clinical and functional outcomes in a gene-environment interaction study in first episode of psychosis (PEPs). *Rev Psiquiatr Salud Ment,* 2013. 6(1): p. 4-16. doi: 10.1016/j.rpsm.2012.11.001.
19. Bernardo M y Bioque M. Esquizofrenia. En: Vallejo-Ruiloba J. Introducción a la psicopatología y a la psiquiatría, 8º edición. Ed. Elsevier, España, 2015, pp. 226-234. ISBN: 978-84-458-2584-6.
20. Beumer W, Drexhage RC, De Wit H, Versnel MA, Drexhage HA, Cohen D. Increased level of serum cytokines, chemokines and adipokines in patients with schizophrenia is associated with disease and metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37:1901–11. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.04.001.
21. Bioque M, García-Bueno B, Macdowell KS, Mesenguer A, Saiz PA, Parellada M, González-Pinto A et al. Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Dec;38(13):2568-77. doi: 10.1038/npp.2013.165.
22. Borovcanin M, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic Dejanovic S, Stefanovic V, Arsenijevic N et al. Antipsychotics can modulate the cytokine profile in schizophrenia: attenuation of the type-2 inflammatory response. *Schizophr Res.* 2013 Jun;147(1):103-109. doi: 10.1016/j.schres.2013.03.027.
23. Boska P. Effects Of Prenatal Infection On Brain Development And Behaviour: A Review Of Findings From Animal Models. *Brain Behav Immun.* 2010;24:881–97. doi: 10.1016/j.bbi.2010.03.005.
24. Boss HB, Aleman A, Cahn W, Hulshoff Pol H, Kahn RS. Brain volumes in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry.* 2007 Mar;64(3):297-304. doi: 10.1001/archpsyc.64.3.297.
25. Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr, Liu L, Babulas VP, Susser ES. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry.* 2005 Apr;162(4):767-73. doi: 10.1176/appi.ajp.162.4.767
26. Brown AS. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2006 Apr;32(2):200-2. doi: 10.1093/schbul/sbj052.

27. Brown AS. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev Neurobiol.* 2012 October ; 72(10): 1272–1276. doi:10.1002/dneu.22024.
28. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, Van Noort J.M. Broad Expression Of Toll-Like Receptors In The Human Central Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:1013–21. PMID: 12430718.
29. Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry.* 2005;162:12-24. doi: 10.1176/appi.ajp.162.1.12.
30. Capuzzi E, Bartoli F, Crocamo C, Clerici M, Carrà G. Acute variations of cytokine levels after antipsychotic treatment in drug-naïve subjects with a first-episode psychosis: a meta-analysis. *Neurosci. Biobehav.* 2017;77:122–128.
31. Carter C.J. Schizophrenia Susceptibility Genes Directly Implicated In The Life Cycles Of Pathogenes: Cytomegalovirus, Influenza, Herpes Simplex, Rubella And Toxoplasma Gondii. *Schizophrenia Bulletin* 2009;35:1163-1182. doi: 10.1093/schbul/sbn054.
32. Cebers G, Ceberé A, Kovács AD, Högberg H, Moreira T, Liljequist S. Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int.* 2001 Aug;39(2):151-60. PMID: 11408094.
33. Chew L.J, Fusar-Poli P, Schmitz T. Oligodendroglial Alterations On The Role Of Microglia In White Matter Injury: Revelance To Schizophrenia. *Dev Neurosci.* 2013;35:102–129. doi: 10.1159/000346157.
34. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 39: 112–119. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.05.018.
35. Cohen J. A power primer. *Psychological Bulletin*, 1992;112:155-159. doi:10.1037/0033-2909.112.1.155.
36. Comptom MT, Bollini AM, McKenzie-Mack L, Kryda AD, Rutland J, Weiss PS, Bercu Z et al. Neurological soft signs and minor physical anomalies in patients with schizophrenia and related disorders, their first-degree biological relatives, and non-psychiatric controls. *Schizophr Res.* 2007 Aug;94(1-3):64-73. doi: 10.1016/j.schres.2007.04.002.
37. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. Jordi Salas-Salvadó, Miguel A. Rubio, Monserrat Barbany, Basilio Moreno y Grupo Colaborativo de la SEEDO. *Med Clin (Barc)* 2007; 128 (5): 184-196.
38. Crespo-Facorro B, González-Blanch C, Pelayo JM, et al. Programa asistencial para las fases iniciales de las psicosis de Cantabria (PAFIP). En: Vázquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B, Herrán A (eds.) *Fases Iniciales de las Enfermedades Mentales: Psicosis.* Barcelona: Masson, 2005, pp. 133-42.
39. Crespo-Facorro, B, Carrasco-Marín E, Pérez-Iglesias R, Pelayo-Terán J.M, Fernandez-Prieto L, Leyva-Cobián F, Vázquez-Barquero J.L. Interleukin-12 plasma levels in drug-naïve patients with a first episode of psychosis: effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 2008;158(2):206–216. doi: 10.1016/j.psychres.2006.08.005.

40. Crespo-Facorro B, Pelayo-Terán JM, Mayoral-Van Son J. Current data on and clinical insights into the treatment of first episode nonaffective psychosis: a comprehensive review. *Neurol. Ther.* 2016;5:105–130. doi: 10.1186/s12974-017-0862-1.
41. Crespo-Facorro B, Bernardo M, Argimon JM, Arrojo M, Bravo-Ortiz MF, Cabrera-Cifuentes A, Carretero-Román J et al. Eficacia, eficiencia y efectividad en el tratamiento multidimensional de la esquizofrenia: proyecto Rethinking. *Rev Psiquiatr Salud Ment (Barc.)*. 2017;10(1):4-20. doi: 10.1016/j.rpsm.2016.09.001.
42. Di Nicola M, Cattaneo A, Hepgul N, Di Forti M, Aitchison KJ, Janiri L, Murray RM, et al. Serum and gene expression profile of cytokines in first-episode psychosis. *Brain Behav Immun.* 2013;31:90–5. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.010.
43. Ding M, Song X, Zhao J, Gao J, Li X, Yang G, Wang X, Harrington A, Fan X, Lv L. Activation of Th17 cells in drug naive, first episode schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014;51:78–82. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.01.001.
44. Erta M, Quintana A, Hidalgo H. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(9): 1254–1266. doi: 10.7150/ijbs.4679.
45. Evensen S, Wisloff T, Lystad JU, et al. Prevalence, Employment Rate, and Cost of Schizophrenia in a High-Income Welfare Society: A Population-Based Study Using Comprehensive Health and Welfare Registers. *Schizophr Bull.* 2016;42(2):476-83. doi: 10.1093/schbul/sbv141.
46. Farber K, Pannasch U, Kettenmann H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 2005;29:128–138. doi: 10.1016/j.mcn.2005.01.003
47. Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull.* 2009 May;35(3):528-48. doi: 10.1093/schbul/sbn187.
48. Ferrari M, Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Rasini E, Lecchini S, et al. Dopaminergic D1-like receptor-dependent inhibition of tyrosine hydroxylase mRNA expression and catecholamine production in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:865–73. doi: 10.1016/j.bcp.2003.10.004.
49. Fillman SG, Sinclair D, Fung SJ, Webster MJ, Shanon-Weickert C. Markers of inflammation and stress distinguish subsets of individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Transl Psychiatry* 2014; 4:e365. doi:10.1038/tp.2014.8.
50. Fraguas D, Díaz-Caneja CM, Ayora M, Hernández-Álvarez F, Rodríguez-Quiroga A, Recio S, Leza JC, Arango C. Oxidative Stress and Inflammation in First-Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophr Bull.* 2018 Aug 28. doi: 10.1093/schbul/sby125.
51. Franco R, Pacheco R, Lluís C, Ahern GP, O’Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol.* 2007;28:400–7. doi:10.1016/j.it.2007.07.005.
52. Frydecka D, Krzystek-Korpacka M, Lubeiro A, Stramecki F, Stańczykiewicz B, Beszlej JA, Piotrowski P et al. Profiling inflammatory signatures of schizophrenia: A cross-sectional and meta-analysis study. *Brain Behav Immun.* 2018 Jul;71:28-36. doi: 10.1016/j.bbi.2018.05.002.

53. Fritz CO, Morris PE, Richler JJ. Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. *J. Exp. Psychol. Gen.* 2012;141:(1)2–18.
54. Gallagher P, Watson S, Smith MS, Young AH, Ferrier IN. Plasma cortisol-dehydroepiandrosterone (DHEA) ratios in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res.* 2007 Feb;90(1-3):258-65. doi: 10.1016/j.schres.2006.11.020.
55. García-Bueno B, Caso JR, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008. 32(6): p. 1136-51. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.04.001.
56. García-Bueno B, Bioque M, MacDowell KS, Barcones MF, Martínez-Cengotitabengoa M, Pina-Camacho L, Rodríguez-Jiménez R et al. Pro-/Anti-inflammatory Dysregulation in Patients With First Episode of Psychosis: Toward an Integrative Inflammatory Hypothesis of Schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2013 Mar;40(2):376-87. doi: 10.1093/schbul/sbt001.
57. García-Bueno B, Gassó P, MacDowell KS, Callado LF, Mas S, Bernardo M, Lafuente A, Meana JJ, Leza JC. Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 pro-inflammatory pathway in patients with schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci.* 2016 May;41(3):E46–55. <https://doi.org/10.1503/jpn.150195>.
58. Gogos A, Sbisa AM, Sun J, Gibbons A, Udawela M, Dean B. A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:615356. doi: 10.1155/2015/615356.
59. Gratten J, Wray NR, Keller MC, Visscher PM. Large-scale genomics unveils the genetic architecture of psychiatric disorders. *Nature Neuroscience.* 2014;17(6):782-790. doi: 10.1038/nn.3708.
60. Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation During Fetal And Neonatal Life: Implications For Neurologic And Neuropsychiatric Disease In Children And Adults. *Ann Neurol.* 2012;71:444–57. doi: 10.1002/ana.22620.
61. Hanisch U.K, Johnson T.V, Kipnis J. Toll-Like Receptors: Roles In Neuroprotection?. *Trends Neurosci.* 2008;31(4):176-82. doi: 10.1016/j.tins.2008.01.005.
62. Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry.* 2005;10:40-68. doi: 10.1038/sj.mp.4001558.
63. Hayes LN, Severance EG, Leek JT, Gressitt KL, Rohleder C, Coughlin JM, Leweke M, et al. Inflammatory molecular signature associated with infectious agents in psychosis. *Schizophr Bull.* 2014; p. 963–72. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu052>.
64. Ho BC, Wassink TH, Ziebell S, Andreasen NC. Cannabinoid receptor 1 gene polymorphisms and marijuana misuse interactions on white matter and cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2011 May;128(1-3):66-75. doi: 10.1016/j.schres.2011.02.021.
65. Howes OD, Murray RM. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model. *Lancet.* 2014;383:1677-1687. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62036-X.
66. Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature.* 2010. 468(7321): p. 187-93. doi: 10.1038/nature09552.

67. Juckel G, Manitz M.P, Brune M, Friebe A, Heneka M.T, Wolf R.J. Microglial Activation In A Neuroinflammatory Animal Model Of Schizophrenia—A Pilot Study. *Schizophr. Res.* 2011;131:96–100. doi: 10.1016/j.schres.2011.06.018.
68. Jüttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist.* 2002 Jun;8(3):268-75. doi: 10.1177/1073858402008003012.
69. Kahn RS, Fleischhacker WW, Boter H, Davidson M, Vergouwe Y, Keet IP, Gheorghe MD et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial. *Lancet*, 2008. 371(9618): p. 1085-97. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60486-9.
70. Kahn RS, Sommer IE. The Neurobiology And Treatment Of First-Episode Schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2015;20: 84–97. doi: 10.1038/mp.2014.66.
71. Kaplan & Sadock's. Sinopsis de psiquiatría. Ciencias de la conducta/Psiquiatría clínica, 11ª edición. Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. Wolters Kluwer, 2015. ISBN: 978-84-16004-80-5.
72. Kato T, Monji A, Hashioka S, Kanba S. Risperidone significantly inhibits inter-feron-gamma-induced microglial activation in vitro. *Schizophr. Res.* 2007;92:108–115. doi: 10.1016/j.schres.2007.01.019.
73. Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Hashioka S, Seki Y, Kasai M, Utsumi H, Kanba S. Anti-inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a 'fire extinguisher' in the brain of schizophrenia? *Mini-Rev. Med. Chem.* 2011;11:565–574. PMID: 21699487.
74. Kaul D, Habel P, Derkow K, Krüger C, Franzoni E, Wulczyn FG, Bereswill S, et al. Expression Of Toll-Like Receptor In The Developing Brain. *PloS One* 2012;7:E37767. doi: 10.1371/journal.pone.0037767.
75. Kawai T, Akira S. The Role Of Pattern-Recognition Receptors In Innate Immunity: Update On Toll-Like Receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84. doi: 10.1038/ni.1863.
76. Kettenamn H, Hanisch U.K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology Of Microglia. *Physiol Rev.* 2011;91:461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
77. Kirkbride JB, Errazuriz A, Croudace TJ, Jackson D. Incidence of schizophrenia and other psychoses in England, 1950-2009: a systematic review and meta-analysis. *PloS ONE*, 2012; 7(3):e31660. doi: 10.1371/journal.pone.0031660.
78. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1971;68:820-3. PMID: PMC389051.
79. Lambert TJ y Newcomer JW. Are the cardiometabolic complications of schizophrenia still neglected? *Barriers to care. Med J Aust.* 2009 Feb 16;190(4 Suppl):S39-42. PMID: 19220173.
80. Larsen PH, Holm TH, Owens T. Toll-Like Receptors In Brain Development And Homeostasis. *Sci Stke.* 2007;402:Pe47. doi: 10.1126/stke.4022007pe47.
81. Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, Neatby MA et al. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. *Schizophr Res.* 2007 Aug;94(1-3):29-36. doi: 10.1016/j.schres.2007.04.025.

82. Leza, JC, García-Bueno B, Bioque M, Arango C, Parellada M, Do K, O'Donnell P, Bernardo, M. Inflammation in schizophrenia: a question of balance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015;55:612–626. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.014.
83. Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe J.J, Rosenberg P.A. Peroxynitrite Generated By Inducible Nitric Oxide Synthase And NADPH Oxidase Mediates Microglial Toxicity To Oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005;102:9936–41. doi: 10.1073/pnas.0502552102.
84. Ling Y, Yunlong H, Lixia Z, Yuju L, Lijun S, You Z, Guanxiang Q, Jialin C Z. IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem.* 2013 June ; 125(6): 897–908. doi:10.1111/jnc.12263.
85. Liu B, Hong J.S. Role Of Microglia In Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms And Strategies For Therapeutic Intervention. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304:1–7. doi: 10.1124/jpet.102.035048.
86. Ludvigsson J.F, Osby U, Ekbom A, Montgomery S.M. Coeliac Disease And Risk Of Schizophrenia And Other Psychosis: A General Population Cohort Study. *Scandinavian Journal Of Gastroenterology* 2007;42:179-185. doi: 10.1080/00365520600863472.
87. MacDowell KS, García-Bueno B, Madrigal JL, Parellada M, Arango C, Mico JA, Leza JC. Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2013;16:121–135. doi: 10.1017/S1461145711001775.
88. MacDowell KS, Caso JR, Martín-Hernández D, Madrigal JL, Leza JC, García-Bueno B. Paliperidone prevents brain toll-like receptor 4 pathway activation and neuro-inflammation in rat models of acute and chronic restraint stress. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014;18:1–11. doi: 10.1093/ijnp/pyu070.
89. Madrigal JL, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Boscá L, Leza JC. The increase in TNF- α levels is implicated in NF- κ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*, 2002. 26(2): p. 155-63. doi: 10.1016/S0893-133X(01)00292-5
90. Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS. Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2001;27:457-476. PMID: 11596847.
91. Mayoral-van Son J, Juncal-Ruiz M, Ortiz-García-de la Foz V, Cantarero-Prieto D, Blázquez-Fernández C, Paz-Zulueta M, Paras P et al. Understanding the direct and indirect costs of a First Episode of Psychosis Program: Insights from the PAFIP of Cantabria, Spain, during the first year of intervention. *Early Intervention in Psychiatry*, 2018, in press. doi: 10.1111/eip.12752.
92. McGrath J, Saha S, Welham J, El-Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Medicine.* 2004;2:13. doi: 10.1186/1741-7015-2-13.
93. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev.* 2008;30:67-76. doi: 10.1093/epirev/mxn001.

94. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203):428–35. doi: 10.1038/nature07201.
95. Meyer U. Anti-inflammatory signaling in schizophrenia. *Brain Behav. Immun*. 2011;25:1507–1518. doi: 10.1016/j.bbi.2011.05.014.
96. Meyer U, Schwarz MJ, Muller N. Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol Ther*, 2011. 132(1): p. 96-110. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.06.003.
97. Menezes NM, Arenovich T, Zipursky RB. A systematic review of longitudinal outcome studies of first-episode psychosis. *Psychol Med*. 2006;36(10):1349-62. doi: 10.1017/S0033291706007951.
98. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011;70:663–71. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.04.013.
99. Miller B.J, Culpepper N, Rapoport M.H, Buckley P. Prenatal Inflammation And Neurodevelopment In Schizophrenia: A Review Of Human Studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013;42:92-100. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.03.010.
100. Miller BJ, Goldsmith DR. Towards an immunophenotype of schizophrenia: prog-ress, potential mechanisms, and future directions. *Neuropsychopharmacology* 2017;42(1):299–317. doi: 10.1038/npp.2016.211.
101. Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines And Schizophrenia: Microglia Hypothesis Of Schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009;63:257–65. PMID: 19579286.
102. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediat Inflamm*. 2010: 289645. doi: 10.1155/2010/289645.
103. Morrison BE, Garibaldi-Marcondes MC, Nomura DK, Sánchez-ÁlaveZ M, Sánchez-González A, Saar I, Kim KS et al. IL-13R α 1 expression in dopaminergic neurons contributes to their oxidative stress-mediated loss following chronic peripheral treatment with LPS. *J Immunol*. 2012 Dec 15; 189(12): 5498–5502. doi: 10.4049/jimmunol.1102150.
104. Mueser KT y Jeste DV. *Clinical Handbook of Schizophrenia*, Guilford Press, New York, NY, USA, 2011. ISBN 9781609182373.
105. Muller N, Schwarz MJ. A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelins dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2008. 258 Suppl 2: p. 97-106. doi: 10.1007/s00406-008-2012-3.
106. Müller N, Wagner JK, Krause D, Weidinger E, Wildenauner A, Obermeier M, et al. Impaired Monocyte Activation In Schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2012;198:341–6. doi: 10.1016/j.psychres.2011.12.049.
107. Murray RM y Lewis SW. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 Sep 19; 295(6600): 681–682. PMID: 3117295
108. Nadeau S, Rivest S. Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. *J Neurosci* 2003; 23: 5536–5544. PMID: 12843254.

109. Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hedge VL, Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem.* 2009 Oct;1(7):1333-49. doi: 10.4155/fmc.09.93.
110. Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, Cascella NG, Kano S, Ozaki N, Nabeshima T, Sawa A. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. *Science.* 2013 Jan 18;339(6117):335-9. doi: 10.1126/science.1226931.
111. Nomiya H, Osada N, Yoshie O. The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21:253–262. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.03.004.
112. Noto C, Ota VK, Gouvea ES, Rizzo LB, Spindola LM, Honda PH, Cordeiro Q, et al. Effects of risperidone on cytokine profile in drug-naïve first-episode psychosis. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 Feb;18(4):pyu042. doi: 10.1093/ijnp/pyu042.
113. Overall JE, Gorham DR. The brief psychiatric rating scale. *Psychological Reports.*1962;10:799-812.
114. Pacheco R, Contreras F, Zouali M. The dopaminergic system in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2014; 5: 117. doi: 10.3389/fimmu.2014.00117.
115. Páth G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2343–2349. doi: 10.1210/jcem.82.7.4072.
116. Pelayo-Terán JM, Pérez-Iglesias R, Ramírez-Bonilla M, González-Blanch C, Martínez-García O, Pardo-García G, Rodríguez-Sánchez JM, et al. Epidemiological factors associated with treated incidence of first-episode non-affective psychosis in Cantabria: insights from the Clinical Programme on Early Phases of Psychosis. *Early Interv Psychiatry.* 2008;2(3):178-87. doi: 10.1111/j.1751-7893.2008.00074.x.
117. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 2007. 8(1): p. 49-62. doi: 10.1038/nrm2083
118. Perlman WR, Webster MJ, Kleinman JE, Weickert CS. Reduced glucocorticoid and estrogen receptor alpha messenger ribonucleic acid levels in the amygdala of patients with major mental illness. *BPS* 2004; 56: 844–852. doi:10.1016/j.biopsycho.2004.09.006.
119. Petrikis P, Voulgari PV, Tzallas AT, Archimandriti DT, Skapinakis P, Mavreas V. Cytokine profile in drug-naive, first episode patients with psychosis. *J Psychosom Res.* 2015;79:324–7. doi: 10.1016/j.jpsychores.2015.06.011.
120. Petrikis P, Voulgari PV, Tzallas AT, Boumba VA, Archimandriti DT, Zambetas D, Papadopoulos I, et al. Changes in the cytokine profile in first-episode, drug-naïve patients with psychosis after short-term antipsychotic treatment. *Psychiatry Res.* 2017;256.:378–383. doi: 10.1016/j.psychres.2017.07.002.
121. Pisano S, Catone G, Coppola G, Carotenuto M, Iuliano R, Tiano C, Montesanto AR, et al. Different immune signature in youths experiencing antipsychotic-induced weight gain compared to untreated obese patients. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 2017;27 (9), 844–848. doi: 10.1089/cap.2016.0203.
122. Rao JS, Kim HW, Harry GJ, Rapoport SI, Reese EA. Increased neuroinflammatory and arachidonic acid cascade markers, and reduced synaptic proteins, in the postmortem frontal

- cortex from schizophrenia patients. *Schizophr Res*, 2013. 147(1): p. 24-31. doi: 10.1016/j.schres.2013.02.017.
123. Ritsner MS. *Handbook of Schizophrenia Spectrum Disorders: Therapeutic Approaches, Comorbidity, and Outcomes*, Springer, New York, NY, USA, 2011. ISBN: 978-94-007-0833-4.
 124. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 429–439. doi: 10.1038/nri2565.
 125. Robinson DG, Gallego JA, John M, Petrides G, Hassoun Y, Zhang JP, Lopez L, et al. A randomized comparison of aripiprazole and risperidone for the acute treatment of first-episode schizophrenia and related disorders: 3 months outcomes. *Schizophr. Bull.* 2015;41:227–1236. doi: 10.1093/schbul/sbv125.
 126. Rothermundt, M, Ohrmann P, Abel S, Siegmund A, Pedersen A, Ponath G, Suslow T, Peters M, et al. Glial Cell Activation In A Subgroup Of Patients With Schizophrenia Indicated By Increased S100b Serum Concentrations And Elevated Myo-Inositol. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2007;31:361–364. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.09.013.
 127. Rothman KJ. Six Persistent Research Misconceptions. *J Gen Intern Med* 2014;29(7):1060–4. doi: 10.1007/s11606-013-2755-z.
 128. Saetre P, Emilsson L, Axelsson E, Kreuger J, Lindholm E, Jazin E. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. *BMC Psychiatry*, 2007. 7: p. 46. doi: 0.1186/1471-244X-7-46.
 129. Saha S, Chant D, McGrath J. A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time?. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Oct;64(10):1123-31. doi: 10.1001/archpsyc.64.10.1123.
 130. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, ChittkaT MR, et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121971. doi: 10.1371/journal.pone.0121971.
 131. Schmitt A, Malchow B, Hassan A., Falkai P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front. Neurosci*. 2014;8:19. doi: 10.3389/fnins.2014.00019.
 132. Schulze B, Rössler W. Caregiver burden in mental illness: review of measurement, findings and interventions in 2004-2005. *Curr Opin Psychiatry*. 2005;18(6):684-691. doi: 10.1097/01.yco.0000179504.87613.00.
 133. Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Harris LW, Wang L, Leweke FM et al. Identification of a biological signature for schizophrenia in serum. *Mol Psychiatry* 2011; 17: 494–502. doi: 10.1038/mp.2011.42.
 134. Segarra R, Gutiérrez M, Eguíluz JI. Curso y pronóstico de la esquizofrenia. En: Vallejo J, Leal C. *Tratado de Psiquiatría*, 2º edición. Ed. Ars Médica, Barcelona, 2010, pp. 1077-107.
 135. Segarra R. *Abordaje integral de las fases iniciales de psicosis: una visión crítica*. Ed: Médica Panamericana, D.L., Madrid, 2013. ISBN: 978-94-9835-797-4.

136. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, Tooley K et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*. 2016 Feb 11;530(7589):177-83. doi: 10.1038/nature16549.
137. Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dudbridge F et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature*. 2009 Aug 6;460(7256):753-7. doi: 10.1038/nature08192.
138. Sinclair D, Tsai S-Y, Woon HG, Weickert CS. Abnormal glucocorticoid receptor mRNA and protein isoform expression in the prefrontal cortex in psychiatric illness. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 2698–2709. doi: 10.1038/npp.2011.160.
139. Sirota P, Meiman M, Herschko R, Bessler H. Effect of neuroleptic administration on serum levels of soluble IL-2 receptor-alpha and IL-1 receptor antagonist in schizophrenic patients. *Psychiatry Res*. 2005;134:151–159. doi: 10.1016/j.psychres.2004.04.012.
140. Sobiś J, Rykaczewska-Czerwińska M, Świętochowska E, Gorczyca P. Therapeutic effect of aripiprazole in chronic schizophrenia is accompanied by anti-inflammatory activity. *Pharmacol. Rep.* 67 (2), 353–359. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.007.
141. Sommer IE, de Witte L, Begemann M, Kahn RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in schizophrenia: ready for practice or a good start? A meta-analysis. *J Clin Psychiatry*, 2011. 73(4): p. 414-9. doi: 10.4088/JCP.10r06823.
142. Song X, Fan X, Li X, Zhang W, Gao J, Zhao J, Harrington A, Ziedonis D, Changes LL. In pro-inflammatory cytokines and body weight during 6-month risperidone treatment in drug naive, first-episode schizophrenia. *Psychopharmacology*. 2014;231(2):319–25. doi: 10.1007/s00213-013-3382-4.
143. Stahl SM. *Stahl's essential psychopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications*. Fourth edition. Cambridge University Press, 2013. ISBN: 978-1-107-68646-5.
144. Steiner J, Bielau H, Brisch R, Danos P, Ullrich O, Mawrin C, Bernstein HG, Bogerts B.. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res*, 2008. 42(2): p. 151-7. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.10.013.
145. Steiner RW, Awdishu L. Steroids in kidney transplant patients. *Semin Immuno-pathol* 2011; 33: 157–167. doi: 10.1007/s00281-011-0259-7.
146. Suárez-Pinilla P, López-Gil J, Crespo-Facorro B. Immune system: a possible nexus between cannabinoids and psychosis. *Brain Behav Immun*. 2014;40:269–82. doi: 10.1016/j.bbi.2014.01.018.
147. Šumanović-Glamuzina, D., Čulo, F., Čulo, M.I., Konjevoda, P., Jerković-Raguž, M. A comparison of blood and cerebrospinal fluid cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α) in neonates with perinatal hypoxia. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2017;20:17(3)203–210. doi: 10.17305/bjbm.2017.1381.
148. Thakore JH, Richards PJ, Reznick RH, Martin A, Dinan TG. Increased intra-abdominal fat deposition in patients with major depressive illness as measured by computed tomography. *Biol Psychiatry*. 1997;41:1140–2. doi: 10.1016/S0006-3223(97)85394-2

149. Tordesillas-Gutierrez D, Koutsouleris N, Roiz-Santiañez R, Meisenzahl E, Ayesa-Arriola R, Marco de Lucas E, Soriano-Mas C, Suarez-Pinilla P, Crespo-Facorro B. Grey matter volume differences in non-affective psychosis and the effects of age of onset on grey matter volumes: A voxelwise study. *Schizophr Res.* 2015 May;164(1-3):74-82. doi: 10.1016/j.schres.2015.01.032.
150. Tourjman V, Kouassi E, Koué M.E, Rocchetti M, Fortin-Fournier S, Fusar-Poli P, Potvin S. Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr. Res.* 2013;151: 43–47. doi: 10.1016/j.schres.2013.10.011.
151. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999; 79: 1–71. doi: 10.1152/physrev.1999.79.1.1.
152. Uptegrove R, Manzanares-Teson, Barnes N.M. Cytokine function in medication-naive first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research.* 2014;101–108. doi: 10.1016/j.schres.2014.03.005.
153. Van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitmaker A, Caspers E, Luurtsema G et al. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*, 2008. 64(9): p. 820-2. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.025.
154. van der Meer MJ, Sweep CG, Pesman GJ, Tilders FJ, Hermus AR. Chronic stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in rats by interleukin 1beta: central and peripheral mechanisms. *Cytokine* 1996; 8: 910–919. doi: 10.1006/cyto.1996.0122.
155. van Os J, Kenis G, Rutten. The environment and the schizophrenia. *Nature.* 2010;468:203-212. doi: 10.1038/nature09563.
156. Verhoog NJD, Du Toit A, Avenant C, Hapgood JP. Glucocorticoid-independent repression of tumor necrosis factor (TNF) alpha-stimulated interleukin (IL)-6 expression by the glucocorticoid receptor: a potential mechanism for protection against an excessive inflammatory response. *J Biol Chem* 2011; 286: 19297–19310. doi: 10.1074/jbc.M110.193672.
157. Waterman WR, Xu LL, Tetradis S, Motyckova G, Tsukada J, Saito K et al. Gluco-corticoid inhibits the human pro-interleukin 1beta gene (IL1B) by decreasing DNA binding of transactivators to the signal-responsive enhancer. *Mol Immunol* 2006; 43: 773–782. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.07.003.
158. Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J, Weickert CS. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 924. doi:10.1038/sj.mp.4001139.
159. White FA, Jung H, Miller RJ. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104:20151–20158. doi: 10.1073/pnas.0709250104.
160. WHO World Health Report: new understanding, new hope, 2001, Geneva.
161. Wood, S.W., 2003. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *J. Clin. Psychiatry* 64 (6), 663–667. PMID: 12823080.
162. Woodberry KA, Giuliano AJ, Seidman LJ. Premorbid IQ in schizophrenia: a meta-analytic review. *Am J Psychiatry.* 2008 May;165(5):579-87. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.07081242.

11. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN ACTUAL

Con el objetivo de completar los hallazgos encontrados en esta tesis doctoral, en este momento estamos realizando un estudio en el que se compararán la expresión y la función de 9 TLRs en tres tipos de células inmunes (monocitos, linfocitos B y linfocitos T) entre voluntarios sanos y sujetos con un PEP *drug-naïve*. Los análisis se realizarán en el momento basal y 3 meses después de iniciar el tratamiento, comparándose así mismo el efecto de aripiprazol y risperidona sobre la expresión y la función de los 9 TLRs.

