

Prevención de la esquizofrenia: utilización de
estrategias farmacológicas basadas en compuestos
antiinflamatorios y antioxidantes en el modelo murino
de estimulación inmunitaria materna

Luis Diego Romero Miguel

Tesis depositada en cumplimiento parcial de los requisitos para el
grado de Doctor en

Ciencia y Tecnología Biomédica

Universidad Carlos III de Madrid

Directora:

María Luisa Soto Montenegro

Tutor:

Manuel Desco Menéndez

Julio 2022

Esta tesis se distribuye bajo licencia “Creative Commons **Reconocimiento – No Comercial – Sin
Obra Derivada**”.



Para Isabel, Luis y Rober. Sin un orden en particular.

Para Laura.

-AGRADECIMIENTOS-

Se suele decir que lo bonito de alcanzar una meta no es la meta en sí misma, sino el camino recorrido para llegar hasta ella. Bien. Correcto. Pero estoy seguro de que el autor de esa frase no hizo una tesis en su vida. El camino no ha sido de rosas precisamente. Ha sido bastante tortuoso, con estrés, ansiedad, infinitas horas de trabajo y más giros de guión en el tramo final que una película de Shyamalan. Evidentemente, exagero un poco. Sólo un poco. Ha sido duro, sí –¿hay alguna tesis que no lo sea?–, pero, en muchos sentidos, no puedo evitar sentirme un privilegiado. He tenido la suerte de estudiar la carrera y el máster que he querido. He podido hacer mi tesis con un grupo extraordinario, que me llevaría a cualquier lado y que dudo que pueda encontrar dondequiera que acabe después. Una tesis es dura, sí, pero la mía ha sido un poquitito más sencilla gracias a todos y a todas con los que la he podido compartir, fuera y dentro del laboratorio, este camino. Esta tesis es también vuestra.

Mi primer agradecimiento es para Marisa, como no podía ser de otro modo. Imagino que en muchas tesis el agradecimiento a tu directora de tesis/jefa es algo que se da por supuesto y se hace para completar el expediente. No es en absoluto el caso. Me siento realmente un privilegiado –segunda vez que uso esta palabra y seguro que no va a ser la última– de poder haber hecho la tesis contigo, Marisa. Difícilmente encontraré en otro sitio una jefa de grupo con la empatía y la calidad humana que has demostrado tener durante estos cinco años. Si en este tiempo he mejorado notablemente como científico, mucho se debe a ti.

Esta tesis es también de Marta. Por muchos motivos. El primero, básico, porque no estaría en el laboratorio si no fuese por ti –gracias también por la parte que te toca, MadCool–. Y los demás, que son muchos, se podrían resumir en que, contigo en el grupo, la vida fue un poco más fácil. Hiciste que las noches de PPI, los incendios y los pinchazos en las manos se hiciesen un poco más llevaderos. Lo mismo puedo decir de ti, Nico. Llegados a este punto, me hubiera gustado dedicarte una cita cinéfila, pero “I don’t know a s**t about f**k”. En cualquier caso, no podía haber pedido un compañero mejor con el que compartir experimentos de conducta nocturnos –a las ratas y a nosotros–, congresos y cervezas. Y eso sí que es una verdad absoluta. Parte de esta tesis va dedicada también a Magda, digna merecedora de estar en el top3 de personas favoritas del LIM. Y probablemente en el top1 de las más graciosas. Que lo que unió el parkour no lo separe nadie.

Dedico también esta tesis a todos los miembros del LIM que han ayudado de alguna manera a que todo esto salga adelante. Las chicas, Tra, Esther, Jorge, sondas, los neuros... Gracias por la parte que os toca. Mención especial para Desi, una de las mejores compañeras de congreso y probablemente una de las peores DJs copiloto del mundo.

Tampoco me quiero olvidar de María, Alicia, Paco y todo el personal de apoyo de experimental y del animalario, que hicieron todo muchísimo más sencillo. Y muchas veces, sin tener la obligación de hacerlo, simplemente por su buena fe y las ganas de ayudar.

Agradezco asimismo a la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón, a la Consejería de Educación e Investigación de la Comunidad de Madrid y a la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas por facilitar los medios y/o la financiación necesarias para llevar a cabo esta tesis.

Si dentro del laboratorio he sido un privilegiado –tercera vez–, fuera tampoco me puedo quejar. Aquí la lista de gente es más larga, más por estadística que por otra cosa –no las he contado, pero diría que hay más gente fuera del laboratorio que dentro–, así que espero no pecar de intenso y no sobrecargar esto en exceso. No creáis que no se me ha pasado por la cabeza hacer un índice de la dedicatoria, para que podáis ir a tiro fijo. Para que no haya quejas ni prioridades, nombraré por estricto orden de aparición.

Y si nos vamos al principio, no queda otra que empezar indefectiblemente por la familia, pero me vais a permitir romper a las primeras de cambio mi norma autoimpuesta y reservar ese párrafo para el final. En su lugar, quiero empezar primero por Beatriz, mi profesora de Biología del instituto. Estrictamente hablando, un porcentaje más que importante de esta tesis se lo debo a ti. Creo que la labor de un profesor, de una profesora, es conseguir inculcar amor por lo que pretende transmitir. A la vista está que, en mi caso, lo conseguiste. Y con creces. No me olvido de otros profesores y profesoras que de alguna manera me han marcado tanto en la etapa escolar como en la universidad, pero quería resaltar tu importancia por lo que de veras ha significado.

De la etapa escolar guardo también otros buenos recuerdos y, sobre todo, amistades que, casi dos décadas después, sigo manteniendo. Podría citar varias, pero voy a acordarme sobre todo de dos: Alexandra y Silvia (Carlos, tú eres ya del otro grupo y no vas a salir dos veces). Ale, aún conservo esa lámina de dibujo en la que el profesor me bajó un punto de la nota por “sus constantes distracciones con Alexandra”. A pesar de tus esfuerzos premeditados para boicotear mi escolarización, aquí estamos. Y si, a estas alturas, y después de todo, me sigo acordando de ti y te dedico un hueco en esta dedicatoria, es porque te tengo y te tendré siempre en el top top de las amistades. Silvia, de ti podría decir muchísimas cosas. Buenas, claro. Y eso lo hago extensivo a Javi, que no me olvido de él. Pero creo que se podría resumir todas ellas en que probablemente nunca haya tenido el placer de conocer a una persona que irradie una bondad tan absoluta, tan pura, como lo haces tú. Eres una persona que da gusto tener siempre cerca. Ale, Silvia. Esta tesis va dedicada también a vosotras.

Siguiendo la etapa educativa, no puedo dejar fuera de esta dedicatoria a todos los Nostálgicos y Nostálgicas de Biología. Tanto a los gran reserva como a los de nuevo cuño. Biólogos, ingenieros y misceláneos varios que han hecho de este camino algo

infinitamente más llevadero. Podría decir muchísimas cosas de vosotros a nivel individual pero sé que sois gente pragmática y preferís más cerveza –Aquarius para ti, Guille– y menos sensiblerías. A la siguiente invito yo. I was filled with determination y aquí están los resultados. Felicidades, Roberto. Brindaremos con (bio)lencia.

No me quiero olvidar tampoco de los viejóvenes. Muchas gracias, Víctor, Susana, Bea y Nacho. Susana, espero que, por la parte que te toca, hayas superado ya tus reticencias iniciales hacia mi persona. No comparto las mismas hacia Víctor. Esta tesis es también un poquito para vosotros. Bea, Nacho, también podría escribir párrafos y párrafos de agradecimiento. En su lugar, voy a ser conciso y lo voy a dejar en que, sin el mínimo atisbo de duda, sois los mejores amigos que se puedan tener. Es un lujo haber podido hacer este trámite del camino con vosotros. Muchísimas gracias.

Podría seguir diciendo muchas cosas más, pero tengo la sensación de que, si hago esto más extenso, el tribunal lo va a considerar, legítimamente, parte del cuerpo de la tesis y no me he preparado preguntas sobre esta parte. Así que, con vuestro permiso, pasamos a la familia.

En primer lugar quería dedicar esta tesis a mi tía, Feli, que siempre está ahí. Y la verdad es que se agradece siempre. Si por ella fuera, me deberían haber dado un título –como mínimo– de doctor hace años, antes de defenderla e incluso de escribirla. Esta tesis también va para ella, sin duda.

Durante el camino se han quedado los últimos representantes que quedaban de la tercera generación de los Romero Fernández y de los Miguel Polo. No pretendo ponerme demasiado intensito al respecto, pero sí quería destinar un pequeño rincón de esta tesis para ellos. A Avelina, Carmen y Emiliano, mis abuelos, que no podrán ver a su nieto como doctor, pero que me han acompañado hasta casi el final.

Esta tesis también es para la familia Sánchez Burgos. Para Antonio, para Sonia y para Ignacio. Si normalmente se dice que las relaciones suegros–yerno no son las mejores del mundo, creo que en este caso eso no aplica en absoluto. Correa aparte, no podría estar más contento y agradecido con vosotros. A todos los niveles.

Y, por supuesto, esta tesis es para Rober, para Luis y para Isabel. Pero vayamos por partes. Rober, te toca el primero. Ve pasando. Más allá de la portada de tesis, evidentemente, esta tesis es también tuya. En sentido figurado, me refiero. La versión impresa es para los tres. Acaparador, que eres un acaparador. Bromas aparte, si pudiese elegir hermano en una subasta, lo primero que haría es llamar a la policía porque eso no puede ser legal, y lo segundo, sin duda, pujar por ti. Si esta parte de la dedicatoria está llena de bromas es precisamente porque es para ti, que sé que la vas a disfrutar y apreciar más que nadie. Te quiero, bro, aunque seamos tontísimos. La segunda parte es para Isabel, mi madre. Probablemente, la persona del mundo a la que más ilusión le haga leer estas líneas. Tu hijo es doctor. Por fin. Huelga decir, aunque sea un tópico, que si soy doctor es, en un porcentaje muy importante, por ti. Muchas gracias. Aunque

daría lo mismo en realidad. Porque si no fuese doctor sería otra cosa y eso no cambiaría en absoluto el orgullo que siento por ser tu hijo. Todo esto se podría aplicar también a ti, papá. Pero sé que prefieres otro rollo, menos intenso, así que toma como propias también esas líneas, pero añadeles al final la frase de Rick que tanto te gusta decir. Y ahora, aunque no te guste, sí vamos a ponernos sentimentales. Sólo un poco. No te dolerá, lo prometo. Te podría dar las gracias por lo mismo que a mamá –y lo hago–, pero añado una cosa. Gracias por enseñarme a leer. No a leer en el sentido literal, que más que menos ya lo dominaba desde hace unos pocos años, sino a *leer*. Y con ese *leer* me refiero a esos intercambios literarios que siempre, ya sean más o menos breves, me parecen una delicia. Creo de verdad que la escritura de la tesis se ha visto reflejada en todos esos momentos y, por eso, te pertenece un poquito también. A los tres, Rober, Isabel y Luis, os quiero mucho.

Evidentemente, esta tesis es por y para Laura. Es Laura. Y no es Laura únicamente porque haya contribuido directamente a ella, ya sea con las correcciones o con las ideas para la parte del Connectivity Map, que también. Esta tesis es Laura porque, sencilla y llanamente, quizás no se habría hecho si no nos hubiésemos conocido. Pero es que sin tesis no hay laboratorio futuro que compartir y, aunque seguirías siendo la dueña del paraguas amarillo, ese laboratorio es algo por lo que merece la pena pelear un poquito. Que lo que han unido los cheques gourmet no lo separe nadie. Y me gustaría acabar citando algo del principio, de nuestro principio. De un tal Cortázar, en una tal Rayuela: “Andábamos sin buscarnos, pero sabiendo que andábamos para encontrarnos”. Si es que me pinchas y al final acabo siendo moñas también...

A todos y a todas, esta tesis es un poquito vuestra también. Muchas gracias por hacer algo más llevadero el camino. La meta se intuye ya al fondo. No sé si será mejor que el camino, pero desde aquí os aseguro que tiene una pinta extraordinaria.

-CONTENIDOS PUBLICADOS Y PRESENTADOS-

PUBLICACIONES EN REVISTAS INDEXADAS

1. Resultados del efecto de los ácidos grasos omega-3 en la periadolescencia en el modelo MIS (incluido en los capítulos 1, 2 y 4 de esta Tesis).

(El material de esta fuente incluido en la Tesis no está señalado por medios tipográficos ni referencias).

Marta Casquero-Veiga, **Diego Romero-Miguel**, Karina S MacDowell, et al. (2021) Omega-3 fatty acids during adolescence prevent schizophrenia-related behavioural deficits: Neurophysiological evidences from the prenatal viral infection with PolyI:C, *European Neuropsychopharmacology*;46:pp14-27 //doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.02.001.

2. Resultados del efecto de la minociclina en la periadolescencia en el modelo MIS (incluido en los capítulos 1, 2 y 4 de esta Tesis).

(El material de esta fuente incluido en la Tesis no está señalado por medios tipográficos ni referencias).

Diego Romero-Miguel, Marta Casquero-Veiga, Karina S MacDowell, et al. (2021) A Characterization of the Effects of Minocycline Treatment During Adolescence on Structural, Metabolic, and Oxidative Stress Parameters in a Maternal Immune Stimulation Model of Neurodevelopmental Brain Disorders, *International Journal of Neuropsychopharmacology*; 24(9): 734-748, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyab036>.

3. Revisión bibliográfica sobre los efectos de la minociclina en patología neurodegenerativa y psiquiátrica (incluido en los capítulos 1 y 4 de esta Tesis).

(Todo material de esta fuente incluido en la tesis está señalado por medios tipográficos y una referencia explícita).

Diego Romero-Miguel, Nicolás Lamanna-Rama, Marta Casquero-Veiga, et al. (2021) Minocycline in neurodegenerative and psychiatric diseases: An update, *European Journal of Neurology*; 28(3): 1056-1081, <https://doi.org/10.1111/ene.14642>.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

-2022-

1. **Diego Romero-Miguel**, Nicolás Lamanna-Rama, Javier Fernández, *et al.* Maternal N-acetylcysteine therapy promotes anti-inflammatory gut microbiota in the MIS offspring. European Congress of Neuropsychopharmacology (ECNP). *Pendiente de aceptación.*
2. **Diego Romero-Miguel**, Laura Sánchez Burgos, Nicolás Lamanna-Rama, *et al.* Repurposing drugs for schizophrenia: an in silico approach using Connectivity Map. European Congress of Neuropsychopharmacology (ECNP). *Pendiente de aceptación.*

-2021-

3. **Diego Romero-Miguel**, Nicolás Lamanna-Rama, Marta Casquero-Veiga, *et al.* N-acetylcysteine supplement during pregnancy may prevent some of the behavioral and neuroanatomical deficits in a schizophrenia-like rat model. European Congress of Neuropsychopharmacology (ECNP). Lisboa, Portugal. Póster. Octubre 2021. **Premio Mejor Comunicación en formato póster.**
4. Nicolás Lamanna-Rama, **Diego Romero-Miguel**, Marta Casquero-Veiga, *et al.* Omega-3 fatty acids supplement during pregnancy prevents neuroanatomical and behavioural deficits in the offspring in a maternal immune stimulation rat model. European Molecular Imaging Meeting (EMIM). Göttingen, Alemania. Póster. Agosto 2021.
5. **Diego Romero-Miguel**, Nicolás Lamanna-Rama, Marta Casquero-Veiga, *et al.* The role of the N-acetylcysteine in the prevention of behavioral and neuroanatomical deficits in a schizophrenia-like rat model. European Molecular Imaging Meeting (EMIM). Göttingen, Alemania. Póster. Agosto 2021.

-2020-

6. Carlos Gálvez, **Diego Romero-Miguel**, Yolanda López-Tofiño, *et al.* Alteraciones producidas por la activación inmunitaria materna en la función motora gastrointestinal y efecto del tratamiento gestacional con N-acetilcisteína. Estudio en la descendencia y las madres. XVIII Reunión de la ASENEM. Póster. Noviembre 2020.
7. **Diego Romero-Miguel**, Nicolás Lamanna-Rama, Marta Casquero-Veiga, *et al.* Mino-cycline treatment during adolescence prevents structural and oxidative stress brain abnormalities at adulthood: a functional and structural imaging study in the Poly I:C rat model of schizophrenia. World Molecular Imaging Congress (WMIC). Praga, República Checa. Ponencia Oral. Octubre 2020.

8. **Diego Romero-Miguel**, Nicolás Lamanna-Rama, Marta Casquero-Veiga, *et al.* N-acetylcysteine treatment during pregnancy prevents biochemical, neuroanatomical and behavioral deficits in the offspring of a maternal immune stimulation rat model. World Molecular Imaging Congress (WMIC). Praga, República Checa. Póster. Octubre 2020.

-2019-

9. Marta Casquero-Veiga, **Diego Romero-Miguel**, Sonia Torres-Sánchez, *et al.* Could N-acetylcysteine prevent schizophrenia onset? Preclinical study of behavioral, neuroimaging and neurochemical benefits in a schizophrenia model. 25th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (OHBM 2019). Roma, Italia. Póster. Junio 2019.

-2018-

10. **Diego Romero-Miguel**, Marta Casquero-Veiga, Ana Romero-Miranda, *et al.* Could omega 3 fatty acids prevent schizophrenia onset? A neuroimaging study of the metabolic and volumetric changes in the Poly I:C rat model. 2nd Meeting of the young Spanish Molecular Imaging Network (ySMIN). Madrid, España. Ponencia oral. Marzo 2018.

-OTROS MÉRITOS DE INVESTIGACIÓN-

PUBLICACIONES EN REVISTAS INDEXADAS

1. Nicolás Lamanna-Rama, **Diego Romero-Miguel**, Manuel Desco, *et al.* (2022). An Update on the Exploratory Use of Curcumin in Neuropsychiatric Disorders. *Antioxidants*;11,353. <https://doi.org/10.3390/antiox11020353>.
2. Marta Casquero-Veiga, Nicolás Lamanna-Rama, **Diego Romero-Miguel**, *et al.* (2022). In vivo Positron Emission Tomography to Reveal Activity Patterns Induced by Deep Brain Stimulation in Rats. *Journal of Visualized Experiments: Jove*. DOI: 10.3791/63478.
3. Marta Casquero-Veiga, Clara Bueno-Fernández, **Diego Romero-Miguel**, *et al.* (2021). Exploratory study of the long-term footprint of deep brain stimulation on brain metabolism and neuroplasticity in an animal model of obesity. *Scientific Reports*; 11(1):1-11.
4. **Diego Romero-Miguel**, Nicolás Lamanna-Rama, Marta Casquero-Veiga *et al.* (2021). Positron Emission Tomography of the Reward System. *The Brain Reward System*. Humana, Nueva York.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

-2022-

1. Nicolás Lamanna-Rama, **Diego Romero-Miguel**, Rebeca Lobo-Vega, *et al.* Is Cannabidiol able to prevent telomere length shortening? European Congress of Neuropsychopharmacology (ECNP). *Pendiente de revisión*.

-2021-

2. Nicolás Lamanna-Rama, **Diego Romero-Miguel**, Marta Casquero-Veiga, *et al.* Cannabinoids in the prevention of behavioural and brain deficits in a schizophrenia-like rat model. European Congress of Neuropsychopharmacology (ECNP). Póster. Octubre 2021.
3. Nicolás Lamanna-Rama, **Diego Romero-Miguel**, Marta Casquero-Veiga, *et al.* Is THC a reliable risk factor for a double-hit model of schizophrenia? European Molecular Imaging Meeting (EMIM). Göttingen, Alemania. Póster. Agosto 2021.

-2020-

4. Nicolás Lamanna-Rama, **Diego Romero-Miguel**, Marta Casquero-Veiga, *et al.* Cannabidiol treatment during adolescence induces volumetric and metabolic changes in the maternal immune stimulation rat model of schizophrenia: a combined T2 and MRS study.

World Molecular Imaging Congress (WMIC). Praga, República Checa. Póster. Octubre 2020.

–2019–

5. Carlos Gálvez–Robleño, Nicolás Lamanna–Rama, Ana Bagües, **Diego Romero–Miguel**, *et al.* The maternal immune activation rat model of schizophrenia and the effects of THC repeated administration in young adult. Focus on gastrointestinal motility. Reunión Anual de la Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC). Barcelona, España. Póster. Noviembre 2019.

6. Carlos Gálvez, **Diego Romero–Miguel**, Yolanda López–Tofiño, *et al.* Gastrointestinal motility is altered in the maternal immune activation rat model of schizophrenia. Proceedings of the World Congress of Gastroenterology. Estambul, Turquía. Póster. Septiembre 2019.

7. **Diego Romero–Miguel**, Nicolás Lamanna–Rama, Marta Casquero–Veiga, *et al.* Estudio de espectroscopía por resonancia magnética en corteza prefrontal e hipocampo en el modelo de estimulación inmunitaria materna. VII Laboratorio de Ideas para jóvenes investigadores CIBERSAM: “Inteligencia Artificial en ciencias de la vida”. Oviedo, España. Póster. Junio 2019.

8. Nicolás Lamanna–Rama, **Diego Romero–Miguel**, Marta Casquero–Veiga, *et al.* Estudio de imagen de difusión por resonancia magnética en el modelo de estimulación inmunitaria materna. VII Laboratorio de Ideas para jóvenes investigadores CIBERSAM: “Inteligencia Artificial en ciencias de la vida”. Oviedo, España. Póster. Junio 2019.

9. **Diego Romero–Miguel**, Marta Casquero–Veiga, Lucía Vicario, *et al.* Neuroinflammatory changes of the maternal immune activation animal model of schizophrenia. 25th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (OHBM 2019). Roma, Italia. Póster. Junio 2019.

10. **Diego Romero–Miguel**, Marta Casquero–Veiga, Vanessa Gómez–Rangel, *et al.* N-acetylcysteine and physical exercise as preventive therapies in the schizophrenia onset: A behavioral and imaging study in an animal model. European Molecular Imaging Meeting (EMIM). Glasgow, Escocia. Póster. Marzo 2019.

–2018–

11. Lucía Vicario, **Diego Romero–Miguel**, Jordi Llop, *et al.* Characterization of maternal immune activation model of schizophrenia by [11C]PK11195, a tracer of neuroinflammation. 2nd Meeting of the young Spanish Molecular Imaging Network. Madrid, España.

-ABREVIATURAS-

¹⁸FDG	2-desoxi-2-[¹⁸ F]fluoro-D-glucosa
5-HT	Serotonina
AA	Amígdala
ALA	Ácido linolénico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Suero fetal bovino
CAT	Catalasa
CMap	Connectivity Map
COX	Ciclooxigenasa
CPu	Caudado-putamen
CQs	Citoquinas
CT	Tomografía computerizada
CSF	Líquido cefalorraquídeo
Cys	Cisteína
D	Derecha
DA	Dopamina
DHA	Ácido docosahexanoico
DPA	Ácido docosapentanoico
DRD2	Receptor de dopamina D ₂
DSM-5-TR	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales 5 - Revisión de texto
DTI	Imagen por tensor de difusión
EPA	Ácido eicosapentanoico
ETA	Ácido eicosatetranoico
FA	Fracción de anisotropía
FWHM	Máximo de la mitad de la anchura completa
GD	Día de gestación

Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GM	Sustancia gris
GPC	Glicerofosfolina
GPx	Glutación peroxidasa
GRIA1	Receptor de glutamato tipo AMPA, subunidad 1
GRIN2A	Receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA, subunidad 2A
GRM3	Receptor metabotrópico de glutamato
GSH	Glutación
GSSG	Disulfuro de glutatión
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
Hipp	Hipocampo
HO1	Hemooxigenasa 1
HPA	Eje hipotalámico–pituitario–adrenal
I	Izquierda
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KEAP1	“Kelch–like ECH–associated protein 1”
KW	Kruskal–Wallis
Lip	Lípidos
LPS	Lipopolisacárido
MD	Difusividad media
MDA	Malondialdehído
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIN	Minociclina
MIS	Estimulación inmunitaria materna

MM	Macromoléculas
MRI	Imagen por resonancia magnética
MRS	Espectroscopía por resonancia magnética
NAA	N-acetilaspártato
NAC	N-acetilcisteína
NCr	Nervios craneales
NMDA	Receptor del ácido N-metil-D-aspártico
NOS	Especies reactivas del nitrógeno
NQO1	NAD(P)H deshidrogenasa (quinona) 1
NFκB	Factor nuclear κB
NRF2	Factor eritroide nuclear 2
OM3	Ácidos omega-3
PANSS	Escala de síndromes positivos y negativos
PCh	Fosforocolina
PET	Tomografía por emisión de positrones
PFC	Corteza prefrontal
PGs	Prostaglandinas
PND	Día postnatal
Poly I:C	Ácido poliinosínico:policitidílico
PPI	Inhibición prepulso
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PVI	Interneuronas que expresan parvalbúmina
ROIs	Regiones de interés
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDA	Ácido estearidónico
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SS	Suero salino

TE	Tiempo de eco
THA	Ácido tetracosahexanoico
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TPA	Ácido tetracosapentainoico
TR	Tiempo de repetición
Tto	Tratamiento
VBM	Morfometría basada en vóxel
VH	Vehículo
WM	Sustancia blanca

-ABREVIATURAS REGIONES CEREBRALES-

3V	Tercer ventrículo
4V	Cuarto ventrículo
AA	Amígdala
ac	Comisura anterior
AHA	Área amigdalohipocampal
Aq	Acueducto de Silvio
Au1	Corteza auditiva primaria
BS	Tronco cerebral
Cb	Cerebelo
cc	Cuerpo calloso
cic	Comisura del colículo inferior
cll	Comisura del lemnisco lateral
cp	Pedúnculo cerebral
CPu	Caudado-putamen
csc	Comisura del colículo superior
ctg	Tracto tegmental central
D3V	Tercer ventrículo dorsal
dlf	Fascículo longitudinal dorsal
dMN	Núcleo mesencefálico profundo
DRD	Núcleo dorsal del Raphe
ec	Cápsula externa
Ect	Corteza ectorrinal
Ent	Corteza entorrinal
fi	Fimbria del hipocampo
fmi	Fórceps menor del cuerpo calloso
fmj	Fórceps mayor del cuerpo calloso

Hipp	Hipocampo
HPT	Hipotálamo
ic	Cápsula interna
IC	Colículo inferior
iml	Lámina medular interna
imcv	Comisura talámica intermedioventral
lab	Fascículo de asociación longitudinal
LGP	Globo pálido lateral
lo	Tracto olfatorio lateral
LR4V	Cuarto ventrículo lateral
LV	Ventrículo lateral
Me	Mesencéfalo
mfb	Fascículo presencefálico medial
ml	Lemnisco medial
MnPo	Núcleo preóptico mediano
mt	Tracto mamilotalámico
NAcc	Núcleo accumbens
OB	Bulbo olfatorio
OFC	Corteza orbitofrontal
OV	Ventrículo olfatorio
PFC	Corteza prefrontal
Pir	Corteza piriforme
pv	Tracto piramidal
rcc	Rostrum del cuerpo caloso
RS	Corteza retrosplenial
S2	Corteza somatosensorial secundaria
SAS	Espacio subaracnoideo
SC	Colículo superior

SN	Substantia nigra
sol	Tracto solitario
sp5	Tracto trigémino espinal
Spt	Septo
SSC	Corteza somatosensorial
Th	Tálamo
V1	Corteza visual primaria
vHP	Hipocampo ventral
vsc	Tracto espinocerebelar ventral

-ÍNDICE DE CONTENIDOS-

INTRODUCCIÓN	1
1. Esquizofrenia	2
1.1. Antecedentes: de la <i>dementia praecox</i> al trastorno del neurodesarrollo	2
1.2. Esquizofrenia: estado actual	3
1.3. Etiología de la esquizofrenia	4
1.4. El cerebro en esquizofrenia: alteraciones morfológicas	7
1.5. La esquizofrenia como trastorno del neurodesarrollo.....	8
1.5.1. Factores ambientales y neurodesarrollo: la importancia del “cuándo”	9
1.5.2. Inflamación y estrés oxidativo en etapas claves del neurodesarrollo	12
2. Tratamientos de la esquizofrenia	17
2.1. Antecedentes y estado actual	17
2.1.1. Limitaciones de los tratamientos con antipsicóticos.....	19
2.2. Nuevas estrategias terapéuticas	19
2.2.1. N-acetilcisteína.....	22
2.2.2. Ácidos grasos Omega-3	25
2.2.3. Minociclina.....	27
3. Modelos animales asociados a esquizofrenia	30
3.1. Modelos genéticos, farmacológicos e inducibles por lesión	31
3.2. Modelos del neurodesarrollo.....	32
3.3.1. Modelo de estimulación inmunitaria materna: inducción mediante Poly I:C	33
MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. Estudios I y II: Estrategias preventivas frente a la aparición de síntomas asociados a esquizofrenia durante la periadolescencia y la gestación	38
1.1. Animales de estudio	38
1.2. Administración de compuestos	40
1.3. Pruebas de comportamiento	40
1.3.1. Prueba de inhibición del prepulso.....	41
1.3.2. Laberinto en T	41
1.3.3. Laberinto en cruz elevado.....	42
1.4. Pruebas de imagen.....	42
1.4.1. Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y Tomografía Computarizada (CT) ...	42
1.4.2. Imagen por resonancia magnética (MRI).....	43
1.5. Determinaciones bioquímicas	43
1.5.1. Western-Blot	44
1.5.2. Peroxidación lipídica (MDA).....	44
1.5.3. Actividad del factor nuclear derivado de eritroide 2 (NRF2).....	44
1.5.4. Actividad enzimática antioxidante y niveles de glutatión	44
1.6. Análisis de la microbiota fecal	45
1.7. Procesamiento y cuantificación de los datos.....	45
1.7.1. Cuantificación y análisis de las pruebas de comportamiento	45
1.7.2. Cuantificación y análisis de las pruebas de imagen.....	46
1.7.2.1. Tomografía por emisión de positrones (PET).....	46
1.7.2.2. Imagen por Resonancia Magnética (MRI).....	47
1.7.2.2.1. Análisis de la morfometría vóxel a vóxel y de la volumetría en imágenes T2	47
1.7.2.2.2. Análisis de la fracción de anisotropía y la difusividad media en imágenes de DTI.....	48
1.7.2.2.3. Análisis de metabolitos de interés a partir de imagen de MRS	49
1.7.3. Cuantificación y análisis de marcadores bioquímicos	49

1.7.4. Análisis filogenético de la microbiota fecal	50
1.8. Análisis estadístico y representación de los datos	50
2. Estudio III: Análisis bioinformático de fármacos con uso potencial en el tratamiento de la esquizofrenia	51
2.1. Definición de las firmas transcripcionales asociadas a esquizofrenia	51
2.2. Cálculo de los “scores” de similitud utilizando el Connectivity Map (CMap)	51
2.3. “Drug Set Enrichment Analysis”	51
RESULTADOS	53
1. Estudio I: Tratamiento preventivo con NAC, omega-3 o minociclina durante la periadolescencia.....	53
1.1. Inhibición del prepulso	53
1.2. FDG-PET y metabolismo de glucosa cerebral	54
1.3. Volumetría y morfometría cerebral mediante imagen por resonancia magnética...55	55
1.3.1. Volumetría mediante regiones de interés	55
1.3.2. Morfometría cerebral basada en vóxel (VBM)	58
1.3.2.1. Sustancia gris	59
1.3.2.2. Sustancia blanca	60
1.3.2.3. Líquido cefalorraquídeo	61
1.4. Estudio de marcadores de oxidación e inflamación	62
1.4.1. Corteza prefrontal	63
1.4.2. Hipocampo	64
1.4.3. Amígdala	65
1.4.3. Caudado-putamen	67
2. Estudio II: Tratamiento preventivo con NAC durante la gestación.....68	68
2.1. Evaluación de la conducta: inhibición del prepulso, memoria de trabajo y ansiedad	68
2.1.1. Inhibición prepulso.....	68
2.1.2. Laberinto en T	70
2.1.3. Laberinto en cruz elevado.....	70
2.2. Imagen por resonancia magnética.....	71
2.2.1. Volumetría mediante regiones de interés	71
2.2.2. Morfometría cerebral basada en vóxel.....	73
2.2.2.1. Sustancia gris.....	73
2.2.2.2. Sustancia blanca	75
2.2.2.3. Líquido cefalorraquídeo	75
2.2.3. Estudio de imagen por difusión.....	75
2.2.1. Evaluación de la concentración de metabolitos en corteza prefrontal e hipocampo mediante espectroscopía	77
2.3. Estudio de marcadores de estrés oxidativo e inflamación	79
2.3.1. Corteza prefrontal.....	79
2.3.2. Hipocampo	80
2.3.3. Amígdala	81
2.3.4. Caudado-putamen	82
2.4. Análisis de la microbiota fecal a nivel de familia, género y especie	82
3. Estudio III: Análisis bioinformático de fármacos con uso potencial en el tratamiento de la esquizofrenia	87
3.1. Análisis de CMap a partir de datos transcriptómicos procedentes de un modelo MIS inducido con Poly I:C	87
3.2. Análisis de CMap a partir de datos transcriptómicos procedentes de muestras corticales de pacientes con esquizofrenia	90

3.3. Análisis integrativo de los cinco estudios seleccionados	92
DISCUSIÓN	94
1. Sobre el efecto de la N-acetilcisteína, los ácidos grasos omega-3 y la minociclina en la periadolescencia.....	94
1.1. Comportamiento: inhibición del prepulso	94
1.2. Imagen por resonancia magnética: regiones de interés y VBM.....	96
1.3. Imagen por tomografía de emisión de positrones: metabolismo de glucosa y actividad cerebral.....	100
1.4. Inflamación y estrés oxidativo	101
2. Sobre el efecto de la N-acetilcisteína en la gestación	104
2.1. Comportamiento: inhibición del prepulso, memoria de trabajo y ansiedad	104
2.2. Imagen por resonancia magnética.....	105
2.2.1. Regiones de interés y VBM.....	105
2.2.2. DTI.....	107
2.2.3. Espectroscopía por imagen de resonancia.....	108
2.3. Inflamación y estrés oxidativo	111
2.4. Microbiota	112
3. Connectivity Map.....	114
4. Perspectivas generales en el tratamiento de la esquizofrenia	119
4.1. Limitaciones	121
4.2. Líneas futuras.....	123
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFÍA	125
ANEXOS.....	158

-1-

INTRODUCCIÓN

La **esquizofrenia** es un trastorno mental crónico e incapacitante que afecta al 1% de la población mundial. A día de hoy, su tratamiento se basa en el uso de antipsicóticos, aunque la alta tasa de efectos adversos y el alto porcentaje de pacientes que no responden a esta terapia plantean la necesidad de identificar nuevos fármacos y estrategias terapéuticas que mejoren la eficacia de las actuales. El descubrimiento de alteraciones neurológicas muy tempranas, previas al desarrollo de la sintomatología propia del trastorno, ha abierto la ventana a nuevas estrategias que plantean terapias dirigidas a la potencial **prevención** de la esquizofrenia antes de su aparición y no tanto a su tratamiento. En ese sentido, la implicación de la inflamación y el estrés oxidativo en los déficits previos y en el futuro desarrollo del trastorno ha llevado a proponer la utilización de fármacos con un potencial antiinflamatorio y antioxidante como posible complemento a los tratamientos actuales. En esta Tesis Doctoral se ha evaluado la eficacia de tres compuestos con estas propiedades –**N-acetilcisteína, ácidos omega-3 y minociclina**– previniendo la aparición de algunas de las alteraciones y déficits propios del trastorno en un modelo murino asociado a esquizofrenia. Los resultados de estos estudios nos han mostrado la potencial utilidad de los tres compuestos previniendo alguno de las alteraciones conductuales, bioquímicas y neuroanatómicas propias del modelo al ser administrados durante la periadolescencia, justo antes de su aparición. Además, la administración aún más temprana –durante la gestación– de uno de los fármacos, la N-acetilcisteína, tuvo como resultado un efecto preventivo incluso mayor que el encontrado cuando su administración se realizó en la periadolescencia. Finalmente, como complemento al estudio experimental, se realizó una aproximación bioinformática mediante la herramienta Connectivity Map y datos publicados de transcriptómica, tanto preclínicos como clínicos, con el objetivo de identificar fármacos ya aprobados actualmente para otras patologías y con un posible efecto terapéutico en el trastorno. Este análisis nos permitió identificar nuevos compuestos antiinflamatorios y antioxidantes con un gran potencial para tratar e incluso para prevenir la aparición de la esquizofrenia. De manera global, este trabajo ha contribuido a corroborar la potencial eficacia del uso temprano de agentes con potencial tanto antiinflamatorio como antioxidante para prevenir la aparición de la esquizofrenia. Además, la identificación de potenciales nuevos fármacos abre numerosas líneas futuras de acción en las que es preciso seguir incidiendo para seguir mejorando el tratamiento de este trastorno.

1. Esquizofrenia

1.1. Antecedentes: de la *dementia praecox* al trastorno del neurodesarrollo

La **esquizofrenia** es un trastorno psiquiátrico que abarca alteraciones específicas a nivel cognitivo, emocional y conductual. Estos déficits neurológicos aparecen recogidos y minuciosamente desglosados en la quinta y última edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5-TR, por sus siglas en inglés) (1), el manual de diagnóstico psiquiátrico de referencia. La precisa caracterización actual es relativamente reciente, aunque responde a una ardua carrera de fondo que se remonta siglos atrás. Las primeras menciones a algo que podría asemejarse a lo que hoy llamamos “esquizofrenia” se remontan casi 3500-4000 años atrás, fecha en la que se estima que fue escrito el llamado Book of the Hearts, que habla de alteraciones perceptivas y del ánimo causadas por “presencias malignas en los vasos que irrigan el corazón y el útero”. Aunque en siglos posteriores algunos autores, como **Hipócrates**, el célebre precursor de la medicina, ubicaron el origen del trastorno en el cerebro, la creencia de que esta enfermedad tenía un origen divino, con el estigma que esto suponía para los afectados, se prolongó hasta más allá del siglo XV. A partir de entonces, cada vez más voces intentaron buscar una explicación menos espiritual a estas alteraciones del comportamiento. Ya a mediados del siglo XVIII las enfermedades mentales empezaron a ser catalogadas y diferenciadas, aún de un modo rudimentario. Esta clasificación alcanzó su punto álgido en 1887, cuando **Emil Kraepelin**, un psiquiatra alemán, caracterizó individualmente este trastorno por primera vez denominándolo *dementia praecox* (demencia precoz), por la aparición frecuente y muy temprana de sintomatología similar a la presente en un cuadro de demencia (2,3). En 1911 el psiquiatra suizo **Eugen Bleuler** acuñó finalmente el término “esquizofrenia”, derivado del griego *schizo* (dividir/división) y *phrene* (mente), término que se ha mantenido hasta la actualidad. Avanzando ya en el siglo XX, y de la mano de los avances técnicos y médicos, la caracterización de la esquizofrenia y su diferenciación de otros trastornos mentales se ha ido perfeccionando, alcanzando los niveles de minuciosidad que citábamos al principio, en el DSM-5-TR, o en otros manuales de diagnóstico psiquiátricos de referencia, como el ICD-11 (undécima y última edición, por el momento, de la Clasificación Internacional de Enfermedades - *International Classification of Diseases*).

A pesar de los hitos diagnósticos alcanzados durante el siglo XX y principios del XXI, aún en la actualidad sigue existiendo una gran diversidad de opiniones acerca de la correcta caracterización de este trastorno, lo que demuestra y pone en evidencia la dificultad de delimitar y determinar los rasgos distintivos de un trastorno mental, teniendo en cuenta los solapamientos clínicos que existen entre ellos. En ese sentido, una de la

hipótesis más aceptada en la actualidad es la consideración de la esquizofrenia como un **trastorno del neurodesarrollo**. Esta hipótesis, acuñada a finales del siglo XX (4,5) se basa en el descubrimiento de alteraciones cerebrales previas a la aparición de la sintomatología característica que permite teorizar sobre un posible origen ligado a modificaciones tempranas en el desarrollo cerebral. A pesar de que manuales clínicos como el DSM-V no reconocen la esquizofrenia como miembro de esta categoría, esta hipótesis se considera vigente y probada actualmente. Como veremos en puntos siguientes, la caracterización de la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo no es meramente una cuestión semántica, sino que, por sus implicaciones biológicas, va a abrir la puerta a diferentes estrategias y ventanas terapéuticas con la capacidad de mejorar los tratamientos actuales para este trastorno.

1.2. Esquizofrenia: estado actual

Actualmente, la esquizofrenia afecta a aproximadamente 24 millones de personas a nivel mundial, con una **prevalencia** de en torno a 1 de cada 300 personas (**0.32 %**), siendo algo superior en la edad adulta (1 de cada 222 personas; 0.45 %) (6), aunque otras fuentes reportan un porcentaje algo más elevado (1%) (7), con una incidencia ligeramente mayor en hombres que en mujeres. La edad de debut en el trastorno es menor en varones (en torno a los 20 años) que en mujeres (en torno a los 30 años). Con menor frecuencia, la esquizofrenia puede aparecer durante la adolescencia temprana e incluso a finales de la infancia (esquizofrenia de comienzo temprano o muy temprano) o más tarde, entre los 40 y 60 años (esquizofrenia de comienzo tardío) (1).

Los síntomas asociados a este trastorno comprenden un muy amplio abanico que suele clasificarse en dos categorías, síntomas positivos y síntomas negativos, aunque este sistema organizativo ha sido, y sigue siendo, objeto de debate. Los **síntomas positivos o psicóticos** incluyen las alteraciones perceptivas, como es el caso de las alucinaciones visuales o auditivas, los delirios (creencias firme en pensamientos no sujetos a la lógica ni a la realidad) y la conducta desorganizada, que se puede manifestar por el habla incomprensible o por la reiteración de conceptos, cuya repetición extrema puede llevar, paradójicamente, a la catatonía. Los **síntomas negativos** incluyen la pérdida de motivación y de capacidad de experimentar emociones, la anhedonia o la disminución de la expresión verbal. Estos síntomas pueden coincidir con los presentados en la depresión, aunque algunos investigadores consideran la depresión, englobada dentro de la esquizofrenia, como un síntoma perteneciente a una tercera categoría, los **síntomas de tipo afectivo**. Esta categoría incluiría a su vez otros síntomas como la ansiedad. Además, se ha llegado a considerar otra categoría más en algunas caracterizaciones de este

trastorno: los **síntomas cognitivos**, que abarcan problemas de memoria, de concentración, de procesamiento de la información y de atención (8).

Además de la sintomatología asociada ya mencionada, la esquizofrenia presenta **comorbilidades** con otros trastornos psiquiátricos. De este modo, además de la sintomatología asociada a depresión ya descrita, muchas personas que sufren este trastorno pueden sufrir trastornos de ansiedad, adicción a sustancias de abuso y/o alcohol, trastornos de estrés postraumático, trastorno obsesivo-compulsivo o trastornos del pánico (9,10). Más allá de las comorbilidades con otros trastornos psiquiátricos, existen otros riesgos asociados a la esquizofrenia, no necesariamente relacionados con el trastorno mental en sí mismo. La esperanza de vida de personas que padecen esquizofrenia es aproximadamente 17–20 años menor que la media. Una de las principales causas de esta drástica **reducción de la esperanza de vida** son los problemas de salud derivados de un consumo crónico de antipsicóticos, que se ha relacionado con la aparición de déficits cardiovasculares, diabetes u obesidad. Además, el aumento de la tasa de suicidios, así como un estilo de vida menos saludable (dieta pobre, consumo de alcohol, falta de ejercicio) es recurrente en las personas que sufren de este trastorno (11).

Más allá de la sintomatología asociada, las personas que sufren esquizofrenia, así como otros trastornos psiquiátricos, tienen que lidiar con el estigma social ligado a esta enfermedad, lo que además ayuda a exacerbar la intensidad del trastorno. Este deterioro de las relaciones dentro de la esfera social puede exacerbarse en situaciones de emergencia sanitaria, como es el caso de la reciente pandemia causada por el SARS-CoV2, o en países con sistemas sanitarios deficientes, donde los pacientes que sufren este trastorno no reciben la ayuda externa que precisan, lo que les convierte en un colectivo especialmente vulnerable (12). Se estima que, a nivel mundial, únicamente el 31.3% de las personas con psicosis reciben un tratamiento psiquiátrico especializado (6).

1.3. Etiología de la esquizofrenia

La esquizofrenia es considerada un trastorno psiquiátrico heterogéneo y multifactorial. No existe un factor único que explique completamente su etiología. En su lugar, una amplia variedad de predisponentes genéticos y ambientales, así como la combinación de ambos, son considerados factores de riesgo cuya presencia puede desembocar en la aparición de este trastorno (ver **Figura 1.1.**).

Aunque la implicación de los **factores genéticos** en la aparición de la esquizofrenia se daba por hecho desde principios del siglo XX por la acumulación de evidencias de casos de esquizofrenia en la misma familia (actualmente, la heredabilidad se ha establecido en torno al 60–80%) y mediante el estudio de gemelos monocigóticos, no fue

hasta la publicación de un estudio genómico realizado en 2014, el mayor hasta la fecha, cuando se empezó a considerar la esquizofrenia como un trastorno poligénico. En ese estudio (13), los autores encontraron 108 loci que se encontraban alterados en esquizofrenia. De los 108, el 75% incluían genes codificadores de proteínas. Muchos de ellos, como es el caso de *DRD2* (Dopamine Receptor D2), el gen diana sobre el que actúan muchos fármacos antipsicóticos, relacionados con el **sistema dopaminérgico**. Otro gran porcentaje, como *GRM3* (Glutamate Metabotropic Receptor 3), *GRIN2A* (Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A) o *GRIA1* (Glutamate Receptor AMPA Type Subunit 1), estaban relacionados con el **sistema glutamatérgico**. También describían loci relacionados con la plasticidad sináptica o, fuera del sistema nervioso, con componentes del **sistema inmunitario**. Estudios posteriores hallarían un mayor número de genes modificados en personas con esquizofrenia, muchos de ellos relacionados con respuestas de **neuroinflamación** y con otros sistemas de neurotransmisión (14,15).

Figura 1.1.

Interacciones entre elementos genéticos y ambientales como factores de riesgo frente a la aparición de esquizofrenia

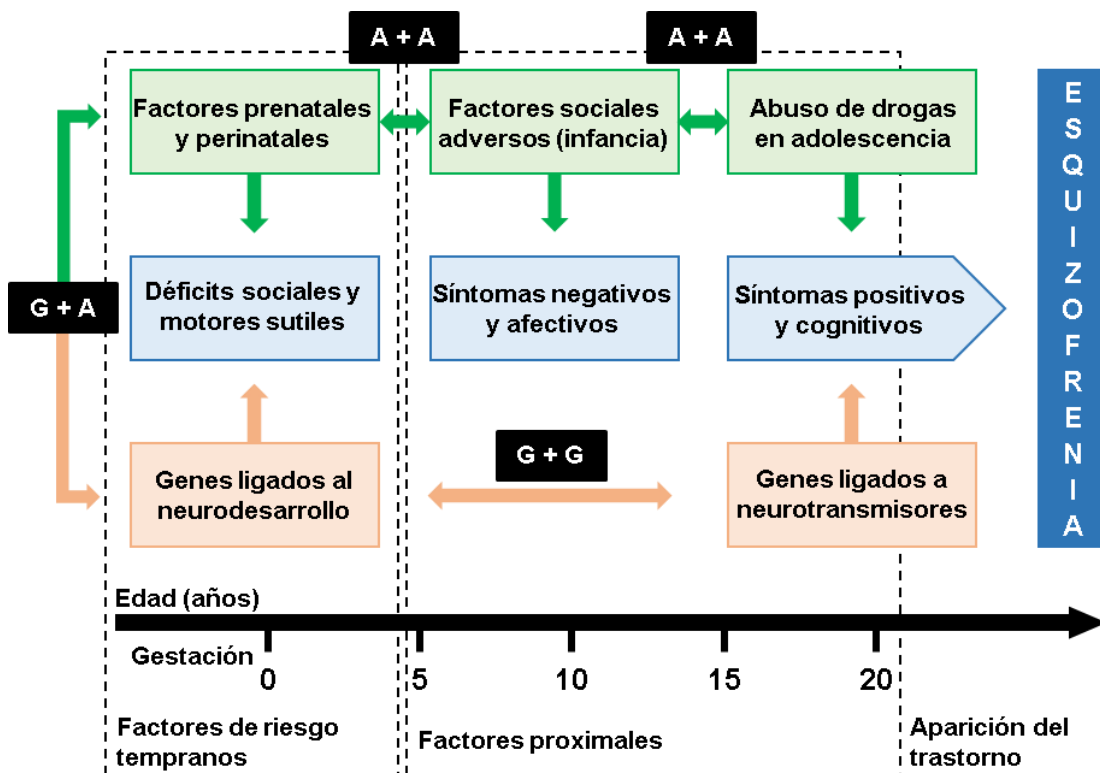


Fig. 1.1. Adaptada y modificada a partir de (16). Factores de riesgo genéticos (naranja) y ambientales (azul) previos a la aparición de la esquizofrenia y su interacción entre ellos. A + A: interacción ambiente-ambiente; G + A: interacción gen + ambiente; G + G: gen + gen.

No obstante, la predisposición genética no es capaz por sí sola de explicar completamente la etiología de la esquizofrenia. Además de los factores de riesgo genético, existe un amplio número de **componentes ambientales** que posibilitan la aparición de este trastorno. Éstos actuarían durante periodos críticos del neurodesarrollo, como el periodo prenatal, durante la gestación, o en etapas claves de la infancia y la adolescencia, interactuando entre ellos y con los genes, produciendo a largo plazo los déficits asociados a la esquizofrenia.

Uno de los factores que se ha ligado con más frecuencia al desarrollo de la esquizofrenia es el consumo de alcohol y de sustancias de abuso. Así, el consumo de **cannabis** se ha relacionado con el aumento del riesgo de aparición de psicosis de un modo directamente proporcional a la dosis consumida: a mayor consumo, mayor riesgo (17). Además, su consumo continuado después de la aparición de los primeros brotes psicóticos aumentará exponencialmente las probabilidades de recaída y la exacerbación de los síntomas (18,19). Algunos psicoestimulantes, como es el caso de la **cocaína** o las **anfetaminas**, se han relacionado también con el aumento del riesgo de aparición de psicosis (20). Otras sustancias, como el **alcohol** (21) o incluso el tabaco (22), se han considerado también factores de riesgo.

Podemos encontrar varias de las etapas clave del neurodesarrollo durante el periodo prenatal. Existen muchas circunstancias que pueden actuar como elementos disruptivos en esta fase del desarrollo temprano del sistema nervioso. Un análisis más detallado sobre cómo estos factores pueden alterar el desarrollo normal del cerebro y sobre qué mecanismos moleculares pueden regir esta triple interacción entre genética, ambiente y neurodesarrollo se presentará en mayor profundidad en el capítulo siguiente de la Introducción (1.4.). Una de las **complicaciones obstétricas** más frecuentes, la hipoxia fetal por insuficiencia de oxígeno, se ha ligado con un incremento potencial del riesgo de desarrollar psicosis a largo plazo, tanto en estudios clínicos (23,24) como en modelos animales (25). Otras complicaciones obstétricas pre- y perinatales, como el nacimiento prematuro, la preeclampsia o el sangrado durante el parto, se han considerado también factores de riesgo (24). Las **infecciones prenatales** son otro predisponente ambiental clave de cara a desarrollar potencialmente psicosis a largo plazo. Así, son numerosos los estudios que muestran una clara correlación entre la exposición a bacterias o virus en etapas concretas del embarazo y el aumento de la probabilidad de desarrollar esquizofrenia a principios de la edad adulta (26-28). Probablemente relacionado con las infecciones prenatales, se ha trazado asimismo una curiosa correlación entre la estación del año en la que se produce el nacimiento y el riesgo de desarrollar esquizofrenia. De este modo, se ha observado un incremento de esta probabilidad en aquellas personas nacidas en invierno o a principios de la primavera (29,30). No obstante, el periodo prenatal no es el único susceptible a sufrir infecciones que puedan

acarrear el riesgo de sufrir esquizofrenia. Varios estudios demuestran que la exposición a agentes víricos concretos durante la infancia también puede incrementar el riesgo de desarrollar este trastorno (28,31,32).

Además de los factores ya mencionados, se han caracterizado distintos componentes socioculturales que podrían correlacionar con la aparición de esquizofrenia: eventos migratorios forzosos, experiencias de discriminación, guerras, la vida en entorno urbano o la malnutrición han evidenciado ser factores que, sumados a alguno de los anteriores o, en colaboración con los predisponentes genéticos, pueden incrementar exponencialmente el desarrollo potencial de la esquizofrenia (33-36).

1.4. El cerebro en esquizofrenia: alteraciones morfológicas

La acción de los factores tanto genéticos como ambientales implica la alteración de una serie de factores moleculares que serán responsables de los síntomas asociados a este trastorno. Sobre estos factores se hablará en puntos posteriores en mayor profundidad. En último término, estos factores serán los responsables de alteraciones en regiones cerebrales y vías nerviosas que tendrán una implicación directa en la sintomatología clínica propia de la esquizofrenia. Aunque actualmente existen muchas hipótesis al respecto, una de las que ha gozado de más respaldo científico está relacionada con dos vías dopaminérgicas, la mesolímbica, principalmente, y la mesocortical. La **vía mesolímbica**, también conocida como la vía de la recompensa, proyecta sus neuronas desde el área tegmental ventral hasta diferentes regiones del sistema límbico, especialmente el núcleo accumbens (37). Teóricamente, la hiperfunción de esta vía estaría detrás de la sintomatología positiva de la esquizofrenia, aunque al mediar en parte en respuestas emocionales, una disfunción a este nivel podría estar detrás asimismo de la sintomatología negativa. Otra vía que podría estar alterada en este trastorno es la **vía mesocortical**. Esta vía que también parte del área tegmental ventral, proyecta mayoritariamente sus neuronas hasta la corteza prefrontal. En este caso, una hipofunción dopaminérgica estaría detrás de los síntomas tanto negativos como cognitivos del trastorno (38). Más allá de la alteración de varios sistemas dopaminérgicos de neurotransmisión, se ha hipotetizado con la participación de otros sistemas, como el glutamatérgico, el serotoninérgico o el gabaérgico, en la modulación de estas regiones cerebrales como se verá más adelante. Esto queda aún más patente con la distinta eficacia de los fármacos de uso común en esquizofrenia, los antipsicóticos, cuyo funcionamiento, mayoritariamente orientado a la actuación sobre el sistema dopaminérgico, no es suficiente para paliar todo el espectro sintomático de este trastorno. Sobre la farmacología de la esquizofrenia se hablará en secciones posteriores.

1.5. La esquizofrenia como trastorno del neurodesarrollo

El DSM-V considera los trastornos del neurodesarrollo como el grupo de enfermedades que comienzan durante el periodo de desarrollo del sistema nervioso, provocando déficits relacionados, a medio y largo plazo, con un deterioro de la función neurológica. El término con el que se conoce a este grupo de enfermedades fue acuñado en 1820 por el psiquiatra francés Étienne Jean Georget (39), pero no fue incluido en el DSM hasta su tercera edición y, entonces, formaba parte únicamente del trastorno del espectro autista. Actualmente, además de éste, el DSM-5-TR engloba como trastornos del neurodesarrollo la discapacidad intelectual, el trastorno por déficit de atención-hiperactividad, los trastornos motores del neurodesarrollo, los trastornos de la comunicación, del aprendizaje y de la motricidad (1). Sin embargo, la esquizofrenia no está incluida en esta categoría. La correcta caracterización y clasificación de los trastornos no es baladí, no tanto por su consideración semántica, sino por las implicaciones fisiopatológicas asociadas a esta caracterización. En ese sentido, los trastornos del neurodesarrollo se denominan como tal por presentar una serie de alteraciones a nivel cerebral cuyo conocimiento puede facilitar la correcta interpretación de las estrategias terapéuticas a aplicar. Además, en este caso implica también la presencia de déficits y modificaciones en una fase premórbida de la patología, considerablemente anterior a la aparición de los síntomas, permitiendo así un mayor margen terapéutico en el que las estrategias pueden ser utilizadas en ventanas anteriores, posibilitando el desarrollo de terapias preventivas, además de las meramente sintomáticas. Por tanto, la caracterización de la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo no tiene únicamente implicaciones diagnósticas, sino también de cara a la comprensión de la etiología de la enfermedad, así como de la búsqueda de nuevos tratamientos frente a este trastorno. En el Capítulo 2 de la Introducción se abordarán en mayor profundidad las estrategias terapéuticas frente a la esquizofrenia.

Existen múltiples evidencias que permiten identificar la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo. En 1994, un estudio retrospectivo ya mostró un aumento significativo de los déficits de la función neuromotora en niños de hasta dos años que posteriormente desarrollaron esquizofrenia, en comparación con niños que no desarrollaron ningún trastorno psiquiátrico en edad adulta (40). En 2010, científicos daneses publicaron un artículo en el que se analizó una muestra poblacional de 5675 personas en un estudio longitudinal sin precedentes, con un seguimiento que se extendió durante 45 años. En éste, identificaron 12 hitos del desarrollo que suelen darse durante el primer año de vida, tales como andar, sonreír, gatear o sentarse. Para cada una de las personas que formaron parte del estudio, analizaron a qué edad se alcanzó cada uno de los 12 momentos claves del desarrollo normal. A los 45 años, 92 personas habían desarrollado esquizofrenia y, lo que es más importante, todas habían alcanzado cada uno de los 12

hitos significativamente más tarde que las personas control que no habían desarrollado ningún trastorno psiquiátrico en estos 45 años, evidenciando alteraciones tempranas del desarrollo (40).

Otra prueba que juega a favor de la hipótesis de la esquizofrenia como trastorno del neurodesarrollo es la aparición de alteraciones estructurales, funcionales, de conectividad y neuroquímicas en el cerebro años antes de que se realice el diagnóstico clínico formal de la patología (41–43). De este modo, estudios de morfometría cerebral realizados mediante imagen por resonancia magnética han mostrado alteraciones neuroanatómicas en varias estructuras que, durante el transcurso del trastorno, estarán igualmente afectadas. Ejemplo de ello son la disminución del tamaño de regiones como el hipocampo, la amígdala, el tálamo o el núcleo accumbens, así como una reducción del grosor cortical y un aumento de otras áreas, como el globo pálido o el sistema ventricular (44,45). Otros estudios han indicado alteraciones globales a nivel de la sustancia gris y blanca global (46). En ese sentido, estudios de imagen por difusión han mostrado alteraciones de la conectividad entre regiones con una implicación importante en esquizofrenia, junto con la reducción de la fracción de anisotropía de fibras cortico-talámicas y del cuerpo calloso (47,48). Estudios realizados mediante tomografía por emisión de positrones han indicado asimismo una reducción de la actividad cerebral ligada a regiones frontales del mismo (43).

1.5.1. Factores ambientales y neurodesarrollo: la importancia del “cuándo”

Como ya se ha mencionado, las alteraciones en el programa normal del neurodesarrollo que, a la larga, pueden desembocar en la aparición de esquizofrenia, son causadas por factores de riesgo disruptivos de origen tanto genético como ambiental.

Las **etapas prenatal y perinatal (Figura 1.2.)** suponen, por motivos obvios, dos de las fases del neurodesarrollo más relevantes y susceptibles de acarrear alteraciones posteriores cuando los procesos que en ellas se encuadran son modificados. Durante el primer trimestre de la gestación, el feto comienza a desarrollar desde cero su sistema nervioso. En este periodo, tiene lugar la **neurulación**, que se completa con la formación del tubo y la cresta neural y, tras la cual, se produce la **regionalización** de estas estructuras en las partes individuales y diferenciadas del cerebro y el resto del sistema nervioso (49). Por ello, cualquier factor externo que modifique de algún modo este plan normal de desarrollo en estas etapas tan tempranas suele implicar patologías muy graves o incluso letales, con un riesgo muy alto de terminar con la vida del feto antes del parto o pocos meses o años después, como es el caso de la espina bífida, la anencefalia o la hidrocefalia (50,51).

El segundo y el tercer trimestre parten de un sistema nervioso más desarrollado, pero aun tremendamente incipiente. En ambos periodos, aparecen los primeros eventos de **neurogénesis**, un proceso clave del neurodesarrollo en el que las células de las estructuras cerebrales recién formadas se diferencian en poblaciones neuronales concretas, migran a regiones cerebrales específicas y los primeros neurotransmisores empiezan a sintetizarse.

Figura 1.2.
Esquema con las etapas del neurodesarrollo en ser humano y en ratas

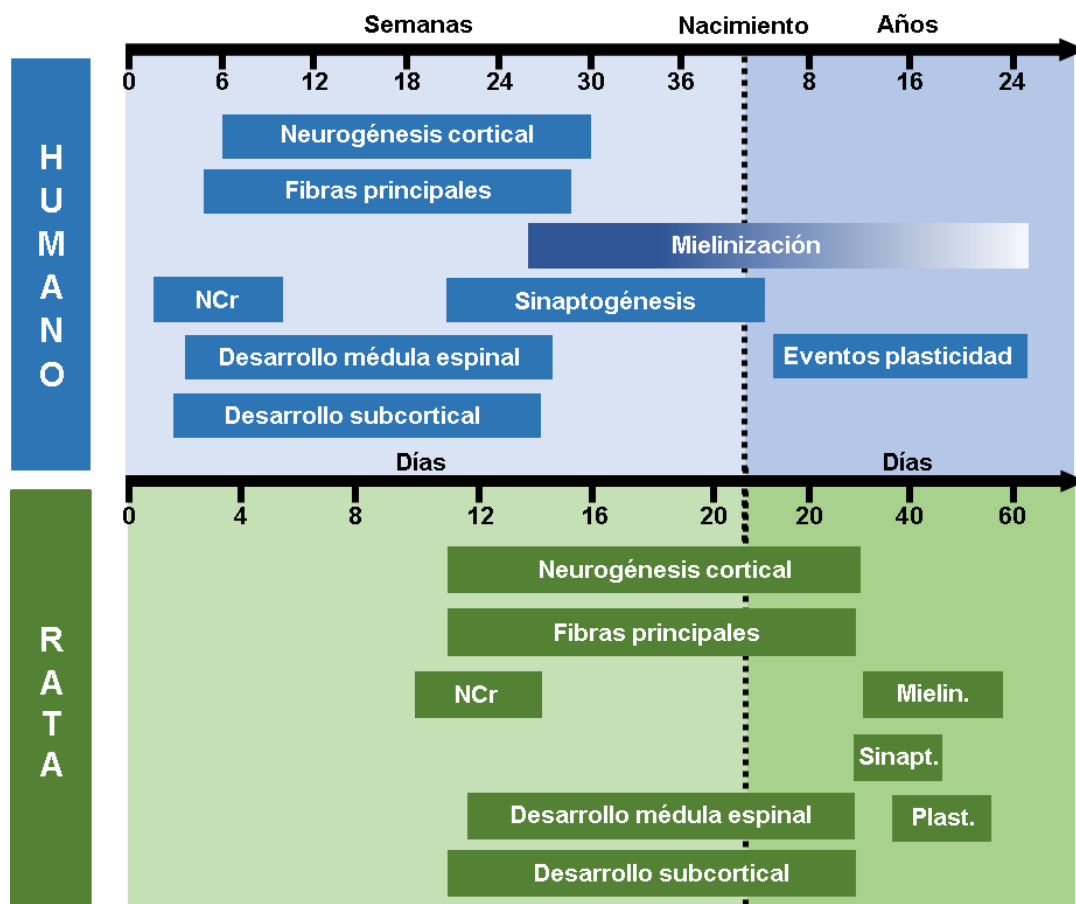


Fig. 1.2. Adaptado de (52). En la figura se representan, esquematizadas, las etapas principales del desarrollo nervioso en el ser humano y en ratas. Durante el segundo y el tercer trimestre de gestación en humanos ocurren eventos significativos de mielinización y sinaptogénesis, especialmente susceptibles a la influencia de factores externos. Abreviaturas: Mielin: mielinización, NCr: formación de los nervios craneales, Plast: eventos plasticidad, Sinapt: sinaptogénesis.

La neurogénesis comienza ya en las últimas semanas del primer trimestre de gestación y se extiende progresivamente durante el segundo trimestre hasta alcanzar su máximo durante las primeras semanas del tercer trimestre de gestación. No obstante,

algunos nichos de poblaciones neuronales específicas son capaces de inducir diferenciación neuronal durante el periodo postnatal (53). Coincidiendo con el periodo de finalización de los procesos neurogénicos, a principios del tercer trimestre, comienza otro evento clave del neurodesarrollo, la **sinaptogénesis**: con las neuronas ya diferenciadas casi en su totalidad, y con su destino intracerebral ya alcanzado, estas neuronas empiezan a realizar cambios tanto bioquímicos como morfológicos en las membranas celulares, posibilitando la creación de nuevas sinapsis y, con ello, de redes neuronales. Este proceso se extiende en el tiempo más allá del periodo prenatal, alcanzando su periodo máximo de actividad en torno a los dos años de edad (49,53). Finalmente, otro evento fundamental del neurodesarrollo, la **mielinización**, comienza en las últimas semanas de gestación, aunque su desarrollo postnatal se producirá de manera mayoritaria durante el periodo postnatal, hasta casi la edad adulta. De este modo, la irrupción de posibles factores ambientales (infecciones víricas o bacterianas, malnutrición, estrés, etc.) disruptivos en eventos clave de neurogénesis o de sinaptogénesis durante el segundo y/o el tercer trimestre de gestación podría alterar la correcta diferenciación y la migración de las neuronas, así como la futura creación de sinapsis por las mismas. Estos cambios se han ligado en numerosos artículos con el posterior desarrollo de trastornos psiquiátricos. Sobre estas alteraciones y los mecanismos que las rigen se discutirá en mayor profundidad en el epígrafe 1.4.2.

Aunque para el momento del nacimiento las estructuras cerebrales presentes en el cerebro del recién nacido son muy similares a las presentes en una persona adulta, aún es necesaria la aparición de nuevos eventos del neurodesarrollo, esenciales en la formación correcta del cerebro y del sistema nervioso. Como ya se ha mencionado en el párrafo anterior, aunque el grueso de la sinaptogénesis se realiza durante la gestación, ésta no concluye hasta pasados dos años tras el nacimiento. Otro proceso iniciado en la gestación, la mielinización, continúa de manera progresiva hasta en torno los 25 años de edad. Además de los mencionados, un evento esencial en el periodo postnatal es la **poda sináptica**. Tras el nacimiento y la finalización de la sinaptogénesis, a excepción de los pequeños nichos neuronales ya descritos, se produce a continuación la eliminación de aquellas sinapsis de uso menos frecuente, reforzando indirectamente aquellas que sí permanecen (54). Este proceso de destrucción del exceso de sinapsis creadas durante la sinaptogénesis previa se extiende en el tiempo durante la infancia y la adolescencia, alcanzando su pico justo antes de la pubertad, y durando éste hasta la edad adulta. Por ello, durante la infancia y la adolescencia existen numerosos periodos críticos del neurodesarrollo en los que la influencia de los factores ambientales ya descritos puede alterar el desarrollo cerebral correcto y desencadenar la aparición de trastornos mentales. Este riesgo se ve aumentado asimismo si se produce la conjunción de varios de estos factores en ventanas diferentes del desarrollo. En ese sentido, un número importante de estudios describe cómo la infección prenatal durante la gestación predisponía a una

mayor susceptibilidad frente a la exposición a nuevos elementos ambientales disruptivos en etapas vitales posteriores, de cara al desarrollo de trastornos psiquiátricos en edad adulta (55).

1.5.2. Inflamación y estrés oxidativo en etapas claves del neurodesarrollo

Hasta ahora, hemos visto que la conjunción entre determinados factores ambientales y genéticos en momentos clave del neurodesarrollo durante la gestación, la infancia y/o la adolescencia puede traer aparejada la aparición posterior de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, pero aún queda en el aire una pregunta: ¿cuáles son los mecanismos a través de los cuales estos factores disruptivos pueden modificar el neurodesarrollo normal? Sobre esta cuestión mucho se ha hipotetizado hasta la fecha, sin que haya un consenso absoluto sobre cuáles son los mecanismos principales que median en la aparición de esquizofrenia. Una de las conclusiones que sí se ha asentado durante las dos últimas décadas es el rol clave que parecen jugar en la etiología de este trastorno tanto la **inflamación** como el **estrés oxidativo**.

La **inflamación** es un mecanismo biológico de protección frente a elementos externos considerados por el organismo como potencialmente peligrosos y, en último término, dirigido a contribuir en los procesos iniciales de reparación de los posibles daños causados. La inflamación se puede considerar inicialmente como una respuesta positiva, pero su prolongación excesiva en tiempo y/o en intensidad puede acarrear consecuencias negativas (56). Este proceso coexiste y está íntimamente interrelacionado con otros, como el **estrés oxidativo** o la apoptosis, con un potencial intrínsecamente positivo pero cuya persistencia y desregulación prolongadas pueden implicar respuestas lesivas para el organismo que también contribuyan en la aparición de sintomatología asociada a esquizofrenia.

Como se ha descrito previamente, existen elementos ambientales que pueden desarrollar un escenario nocivo para el organismo, alterando etapas claves del neurodesarrollo. Estos elementos, en último término, podrían iniciar esta cascada de efectos deletéreos a partir de un aumento exacerbado tanto de la inflamación como del estrés oxidativo. Por ejemplo, en la etapa prenatal la infección con agentes víricos o bacterianos concretos desencadena una respuesta defensiva de inflamación por parte del sistema inmunitario materno. Esta respuesta implica la liberación de citoquinas proinflamatorias como las interleuquinas 1 β (IL1 β) y 6 (IL6) o el Interferón α (IFN α), orientadas a combatir la infección. No obstante, estas citoquinas son capaces de atravesar la placenta e interactuar de igual manera con el feto y su sistema inmunitario aún incipiente, causando un desequilibrio entre mecanismos inflamatorios y antiinflamatorios y desarrollando así un ambiente constante de inflamación, responsable de la alteración de las etapas normales

de neurodesarrollo (57). De hecho, el mecanismo de activación inmunitaria materna es uno de los que se aplica en varios modelos animales que pretenden replicar trastornos del neurodesarrollo como la esquizofrenia (58). Más adelante, en el Capítulo 3 de la Introducción, se abordará este tema en mayor profundidad.

En etapas posteriores del neurodesarrollo, durante la infancia o la adolescencia, la exposición a factores ambientales como las susodichas infecciones, o a otros no necesariamente de carácter infeccioso, también se ha relacionado con un desequilibrio de la respuesta inflamatoria que, a su vez, desembocaría en la alteración de procesos clave del desarrollo neuronal, como la finalización del proceso de mielinización de las fibras nerviosas o de la poda sináptica en regiones concretas del cerebro. Otro ejemplo es la aparición de estos elementos externos disruptivos en etapas concretas de la adolescencia en las que los procesos de neurodesarrollo mencionados coinciden con la maduración de la neurotransmisión dopaminérgica en áreas corticales específicas, cuyo desarrollo inadecuado está implicado en la aparición de parte de la sintomatología asociada a esquizofrenia (59). Además, la presencia de polimorfismos en genes concretos relacionados con inflamación se puede unir a los factores ambientales como posible desencadenante del desequilibrio inflamatorio y oxidante (60). En ese sentido, diversos estudios han indicado la presencia de alteraciones en genes relacionados con la respuesta inmunitaria como el del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), del factor nuclear κ B (NF- κ B) o de la IL-6 en pacientes con esquizofrenia (61,62).

La implicación de la inflamación y el estrés oxidativo descontrolados en la patogenia de este trastorno se manifiesta en la alteración de diferentes marcadores, tanto inflamatorios como oxidantes, en pacientes de esquizofrenia, en fases distintas del trastorno. De este modo, se ha descrito una disminución significativa de la capacidad antioxidante en el plasma de individuos tras su primer brote psicótico, con reducciones específicas de marcadores antioxidantes, como la catalasa (CAT) o la superóxido dismutasa (SOD) (63). También tras el primer brote psicótico, la disminución de glutatión (GSH), una de las moléculas de mayor importancia en la respuesta antioxidante, se ha correlacionado asimismo con una reducción a largo plazo del volumen de sustancia gris en regiones corticales, sugiriendo la más que probable relación entre el estrés oxidativo y la aparición de déficits que desemboquen en la sintomatología típica del trastorno (64). Además, varios estudios postmortem realizados a partir de cerebros de pacientes que padecían diferentes subtipos de esquizofrenia identificaron un aumento del estrés oxidativo en regiones cerebrales relacionadas con la patogenia del trastorno, como la corteza prefrontal, el núcleo caudado o el hipocampo (65). A nivel inflamatorio, se ha descrito un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias, tanto a nivel plasmático (66) como en el cerebro (67). Estudios postmortem también han mostrado un perfil proinflamatorio en cerebros de pacientes con esquizofrenia (68).

Aunque parece probado que tanto la inflamación como el estrés oxidativo juegan un rol clave en el desarrollo del trastorno, aún se desconoce cómo estos dos procesos son capaces de desembocar en la gran variedad de déficits y síntomas presentes en esquizofrenia. Son muchas las hipótesis al respecto que han explicado, al menos parcialmente, el nexo entre ambos procesos y las alteraciones presentes en el trastorno (ver **Figura 1.3.**). En ese sentido, varias de estas hipótesis coinciden en el papel fundamental de la microglía. Frente a eventos externos disruptivos, estas células, hasta ese momento en estado quiescente, inactivas, se activan al llamado estado M1 y liberarían compuestos proinflamatorios. En condiciones normales, la microglía transitaría del estado M1 al M2, destinado a la liberación de compuestos antiinflamatorios, para contrarrestar el estatus proinflamatorio anterior. Sin embargo, en condiciones de estrés prolongado, el estado M1 microglial se mantendría, provocando la liberación constante de compuestos proinflamatorios, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), sustancias reactivas del oxígeno (ROS) u otras moléculas mediadoras de inflamación o estrés oxidativo (69–71). Si este incremento se produce en etapas claves del neurodesarrollo, puede aumentar las susceptibilidades de poblaciones neuronales específicas, como es el caso de las interneuronas que expresan parvalbúmina (PVI), muy implicadas en la integración de circuitos neuronales, y cuya mayor sensibilidad a perturbaciones del ambiente inflamatorio puede dañar especialmente (72). De hecho, su alteración en fases tempranas del neurodesarrollo se ha relacionado con déficits cognitivos (73). La actividad microglial prolongada también se ha correlacionado, debido a la masiva liberación de citoquinas proinflamatorias y ROS, con una disfunción de los oligodendrocitos, las células nerviosas responsables de la creación de las vainas de mielina y, por ende, de los eventos de mielinización, etapa clave del neurodesarrollo (74). Esto explicaría, asimismo, la desmielinización y las alteraciones en la sustancia blanca que se han observado en los cerebros de pacientes con esquizofrenia temprana (75). La inflamación y el estrés oxidativo exacerbados se han relacionado también con la disfunción mitocondrial y los déficits en el metabolismo energético que éste conlleva (76). Esta correlación implicaría además eventos indeseados de apoptosis, así como una desregulación de la neurogénesis, que tendrían como resultado una incorrecta maduración de las redes neuronales en creación si el deterioro se produce en una etapa clave del neurodesarrollo. Ligado a los eventos de neurogénesis, se ha descrito una disminución asociada de neurotrofinas en estudios postmortem de pacientes de esquizofrenia, lo que podría estar relacionado con alteraciones en la conectividad sináptica durante el neurodesarrollo (77).

Los eventos de inflamación y estrés oxidativo exacerbados se han ligado asimismo con alteraciones tempranas en la **microbiota intestinal** y, a su vez, con la aparición de la sintomatología asociada a esquizofrenia, debido a su rol regulador sobre distintos componentes del sistema inmunitario y sobre la microglía (78). En ese sentido, hay cada vez

más voces que defienden el rol clave del **eje intestino-cerebro** en la etiopatogenia de la esquizofrenia y de otras patologías neurológicas (79).

Figura 1.3.

Inflamación y estrés oxidativo como factores asociados a los déficits celulares relacionados con esquizofrenia

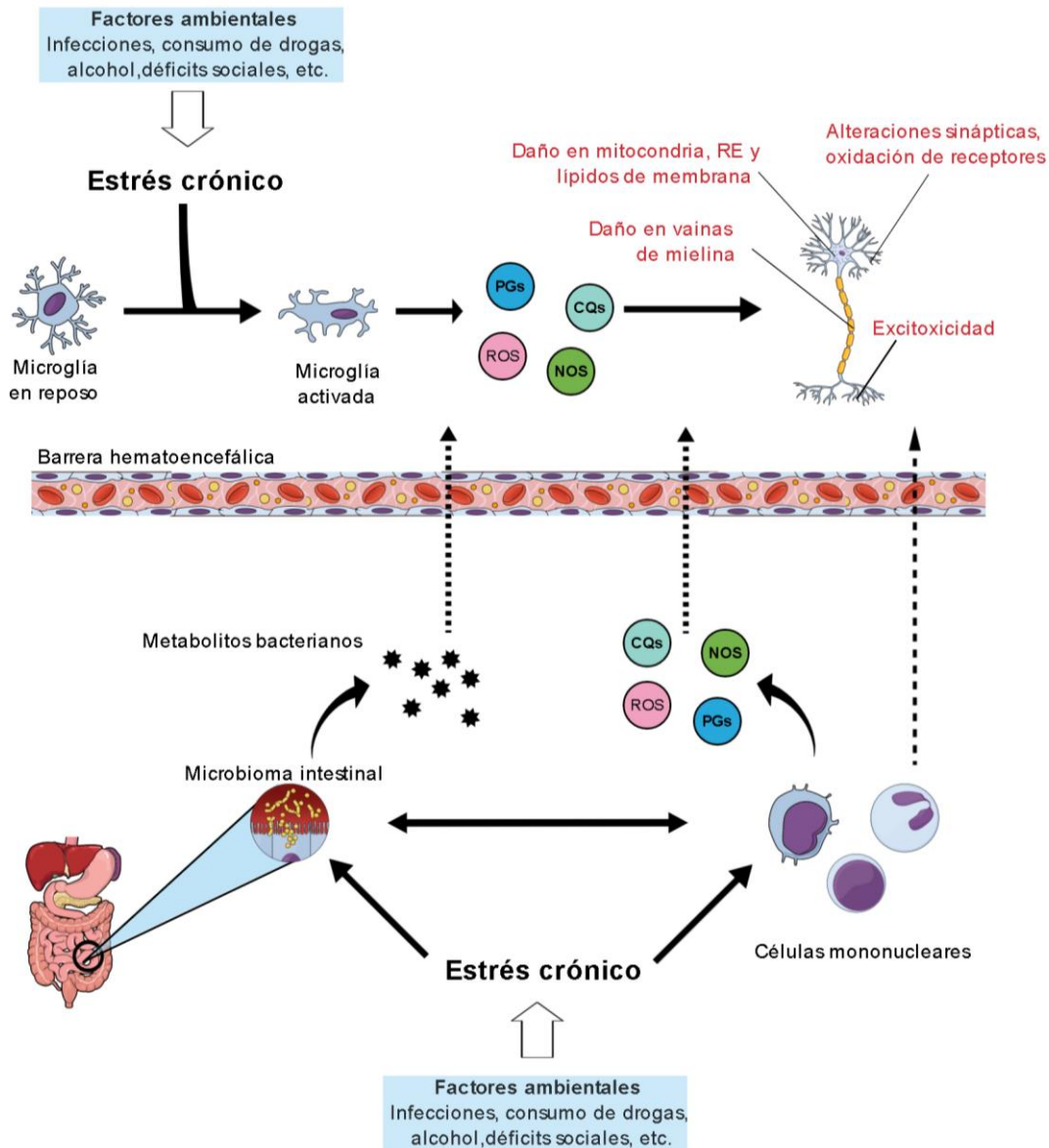


Fig. 1.3. Esquema resumen con los principales mecanismos que relacionan los factores ambientales, el aumento del estrés oxidativo y la inflamación y déficits neuronales. Ante una situación de estrés crónico, se liberan mediadores proinflamatorios como las citoquinas (CQs), las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS) y las prostaglandinas (PGs) por parte de las células inmunitarias. Estos mediadores, junto con metabolitos bacterianos producto de un desequilibrio en el eje intestino-cerebro, atraviesan la barrera hematoencefálica, con su consiguiente efecto sobre neuronas especialmente vulnerables, como las interneuronas que expresan parvalbúmina (PVI). Del mismo modo, ante una situación de estrés crónico, la microglía se activa y contribuye en la liberación de más de estos mediadores proinflamatorios.

La influencia de la microbiota bacteriana sobre el funcionamiento normal del cerebro puede ocurrir mediante múltiples y variados mecanismos. Uno de ellos es la modulación que el microbioma puede ejercer sobre el **eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA)**, implicado en la respuesta al estrés y cuyo funcionamiento incorrecto se ha relacionado con el desarrollo de la esquizofrenia (80). El microbioma puede también intervenir sobre el metabolismo del triptófano y, por tanto, indirectamente, sobre el sistema serotoninérgico de neurotransmisión, también muy implicado en este trastorno (81). Además, varios estudios han demostrado la capacidad del microbioma para directamente regular el desarrollo físico normal del cerebro. Un artículo de 2016 mostró eventos de hipermielinización en neuronas de la corteza prefrontal de ratones sin flora bacteriana (82). Otro estudio del mismo año reportó diferencias en las dendritas de neuronas del hipocampo y de la amígdala entre ratones con y sin flora bacteriana (83). Esa interacción entre el microbioma y el cerebro funciona también en sentido contrario: diversos estudios han demostrado algunos fármacos con efecto sobre el cerebro, como los antipsicóticos, pueden modular el microbioma bacteriano (84,85). Esta modulación bidireccional puede ser de gran relevancia de cara al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en esquizofrenia. En cualquier caso, más allá del rol clave del microbioma bacteriano en este trastorno, de nuevo nos encontramos con la importancia de la inflamación y el estrés oxidativo como moduladores de la acción de los diferentes componentes bacterianos y su efecto en el cerebro. Así, uno de los mecanismos está relacionado con la activación de las vías nerviosas ligadas al nervio vago, que desemboca en la modulación de células del sistema inmunitario y, a su vez, en la liberación de moléculas con potencial proinflamatorio y prooxidante (86). A su vez, se ha descrito también que muchos productos del metabolismo bacteriano con potencial proinflamatorio y prooxidantes son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar directamente sobre el cerebro (79).

Por último, la inflamación y el estrés oxidativo guardan una estrecha relación con dos de los déficits más caracterizados en esquizofrenia: las **alteraciones en los sistemas dopaminérgico** y, en menor medida, **glutamatérgico**. De hecho, la mayoría de los tratamientos antipsicóticos actuales, como veremos, actúan directamente sobre el sistema dopaminérgico, bloqueando los receptores D₂. De este modo, se ha relacionado el aumento prolongado de la inflamación con la hipofunción crónica del receptor del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), originando un aumento de la concentración de glutamato, que no puede ser correctamente procesado, en regiones corticales e hipocampales. Esto conduciría a un incremento de la excitotoxicidad y de la neurodegeneración en poblaciones neuronales concretas, como las interneuronas liberadoras de parvalbúmina, antes mencionadas (87). Además, la activación de ese receptor juega un papel clave en la liberación de compuestos antioxidantes, por lo que su hipofunción incrementaría inevitablemente tanto el estado inflamatorio inicial como el estrés oxidativo. El aumento de

la inflamación y el estrés oxidativo, debido a perturbaciones no sólo en la microglía, sino en los distintos componentes celulares del sistema inmunitario, se ha ligado también con alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica. Causaría así de modificaciones en los circuitos neuronales de regiones cerebrales como la corteza, el hipocampo, el tálamo o el cuerpo estriado (88). En último término, estas alteraciones se han sugerido como las principales responsables de la aparición de los síntomas positivos, negativos y cognitivos, característicos de la esquizofrenia. No obstante, la heterogeneidad de las perturbaciones en el sistema dopaminérgico en función del área cerebral afectada, así como la dispar eficacia de los fármacos antipsicóticos que tienen como diana este sistema, invitan a pensar en una conjunción entre los factores descritos en este punto como causa principal de estos síntomas, con un catalizador común para todos ellos: la inflamación prolongada y el estrés oxidativo consecuente de este estado (88). Las evidencias que apuntan a la implicación fundamental de la inflamación y el estrés oxidativo en la patogenia de la esquizofrenia abren la puerta a la posibilidad de un nuevo marco terapéutico en el que los fármacos antiinflamatorios y antioxidantes podrían tener un rol clave en la búsqueda de tratamientos más eficaces para combatir este trastorno.

2. Tratamientos de la esquizofrenia

2.1. Antecedentes y estado actual

Las estrategias terapéuticas focalizadas en eliminar los síntomas típicos de la esquizofrenia se basan actualmente en el uso combinado de medicación farmacológica junto con psicoterapia. La terapia farmacológica más empleada a día de hoy consiste en la administración de antipsicóticos. Los primeros fármacos de este tipo, el haloperidol y la clorpromacina, empezaron a usarse a principios de la década de los 60 (89). Estos dos compuestos neurolépticos forman parte de lo que se conoce como **antipsicóticos de primera generación**, una familia de fármacos cuyo funcionamiento se basa en el bloqueo de los receptores de dopamina D₂ (90). Uno de los principales problemas de este grupo de fármacos es su baja especificidad respecto a las vías dopaminérgicas sobre las que actúan, bloqueando los receptores D₂ en cualquiera de ellas y no únicamente en la vía mesolímbica, una de las más implicadas en la sintomatología. Esto implica un aumento de los posibles efectos secundarios asociados, como la discinesia y la rigidez muscular, resultado de la interacción con la vía nigroestriatal, e incluso una potenciación de algunos síntomas negativos y cognitivos, por su acción en la vía mesocortical (91). Casi cuarenta años después del desarrollo de la clorpromacina, se empezó a extender el uso de un nuevo fármaco, la **clozapina**, que sería el primero de los compuestos que formarían parte los llamados **antipsicóticos de segunda generación** (92). Su principal mejora respecto a la generación previa era la reducción de los síntomas negativos y cognitivos,

junto a una menos frecuente aparición de efectos secundarios. Estos fármacos, también conocidos como **antipsicóticos atípicos**, presentan un antagonismo más reducido frente a los receptores dopaminérgicos D₂, pero lo compensan con su habilidad para interactuar con otros receptores, principalmente con los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} (93). Precisamente su habilidad para afectar a un mayor rango de receptores es la causa de la aparición frecuente de otros efectos secundarios que no estaban tan extendidos con los de primera generación. De este modo, su posible interacción con receptores histaminérgicos, colinérgicos y adrenérgicos sería la responsable del desarrollo habitual de efectos metabólicos adversos, especialmente obesidad y diabetes (94). Además, la interacción con receptores D₂ –efecto compartido con los antipsicóticos de primera generación– de la vía tuberoinfundibular puede incentivar la liberación excesiva de prolactina, desembocando en eventos de hiperprolactinemia y, por tanto, en alteraciones metabólicas y endocrinas (95).

Tras esta generación de fármacos llegaron, más recientemente, los **antipsicóticos de tercera generación**, también llamados estabilizadores de la dopamina, que comprenden al aripiprazol, el bexpirozol y la cariprazina. Estos antipsicóticos, usados especialmente en los grupos de pacientes con esquizofrenia con sintomatología negativa predominante, basan su mecanismo de acción en su agonismo parcial con los receptores dopaminérgicos, en contraposición al antagonismo de las dos generaciones anteriores (96). De este modo, en situaciones de altas concentraciones extracelulares de este neurotransmisor, estos fármacos compiten con la dopamina, resultando en un antagonismo parcial del mismo, que llevaría a su vez a los beneficios clínicos observados (96). La principal ventaja de estos compuestos frente a las generaciones previas es el aumento de su efectividad para tratar los síntomas negativos, mucho mayor que sus predecesores, especialmente en comparación con la primera generación. En contraposición a sus beneficios, juega en su contra la persistencia de distintos efectos secundarios tras el tratamiento crónico (97).

Más allá de los tratamientos basados en la administración de antipsicóticos clásicos y atípicos, usados principalmente por su acción sobre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, durante los últimos años se han desarrollado nuevos compuestos que actúan sobre dianas celulares distintas. Éste es el caso de los fármacos que actúan sobre el sistema glutamatérgico, también implicado en la génesis del trastorno. Un ejemplo es la bitopertina, un inhibidor de la recaptación de la glicina, que ya ha mostrado en ensayos clínicos una mejora parcial de la sintomatología negativa (98). Otros fármacos moduladores del sistema gabaérgico, como las benzodiazepinas (99), o distintos agonistas colinérgicos, están siendo actualmente evaluados.

2.1.1. Limitaciones de los tratamientos con antipsicóticos

Las estrategias terapéuticas basadas en el uso de antipsicóticos están sujetas a varias limitaciones y contraindicaciones, varias de ellas derivadas, como ya se ha explicado, de los efectos secundarios producidos tras el consumo crónico de estos fármacos. Los efectos adversos van desde los problemas motores, la obesidad y la diabetes mencionadas anteriormente, hasta problemas cardiovasculares derivados de su uso crónico y que supone una de las principales causas de reducción de la esperanza de vida en pacientes de este trastorno. Más allá de los efectos secundarios, la principal limitación asociada a este tipo de estrategia terapéutica está relacionada con la falta de respuesta al tratamiento de un porcentaje importante de pacientes. De hecho, diferentes estudios estiman que en torno al 35 % de las personas que padecen esquizofrenia no responden correctamente al tratamiento con antipsicóticos (100). Se considera **esquizofrenia resistente al tratamiento** aquella en la que no hay remisión de los síntomas tras la prescripción de dos antipsicóticos diferentes. Por lo general, cuando esto sucede, se opta por la prescripción de la clozapina, probablemente el compuesto neuroléptico con mayor efectividad para sortear la resistencia. Sin embargo, incluso del total de pacientes resistentes al tratamiento que reciben clozapina en última instancia se estima que en torno al 30 % de ellos sigue mostrando resistencia al tratamiento (101). Además, el uso crónico de la clozapina se ha relacionado con la aparición de numerosos efectos adversos, entre los que destaca, por su gravedad, la agranulocitosis (102). Por el momento, se desconocen cuáles son las causas detrás de la resistencia diferencial a los tratamientos, pero lo que sí resulta evidente es que existen perfiles diferentes de pacientes en los que el tratamiento único con antipsicóticos se muestra como una herramienta insuficiente para paliar o eliminar los síntomas de esta patología.

Además de lo previamente descrito, otra limitación clave del tratamiento con antipsicóticos es su baja tasa de éxito para reducir los síntomas que no sean positivos. Mientras que muchos de los fármacos ya presentados sí consiguen reducir las alucinaciones visuales y auditivas, así como los trastornos disociativos del pensamiento (103,104), este porcentaje se reduce en gran medida para la sintomatología negativa y cognitiva. Antipsicóticos como la clozapina sí consiguen paliarlos en mayor medida, pero en una proporción considerablemente menor que los positivos (105-107).

2.2. Nuevas estrategias terapéuticas

El desarrollo de los antipsicóticos como terapia paliativa en esquizofrenia ha sido, sin duda, uno de los mayores hitos dentro de las estrategias terapéuticas de este trastorno, pero las limitaciones que aún presenta han incrementado, en las dos últimas décadas, el interés de los investigadores en discernir los mecanismos moleculares que

rigen esta patología. Los avances al respecto, ya descritos en puntos anteriores, permiten dibujar un escenario en el que el tratamiento de la esquizofrenia trascienda el uso de los antipsicóticos y apunte en otras direcciones que, o bien complementen, o bien sustituyan aquellas que han probado no ser completamente eficaces.

Uno de los frentes abiertos más en auge actualmente está relacionado con el desarrollo de **fármacos multidiana**. La utilización de estos compuestos, cuya principal ventaja es su interacción con varios ligandos, responde a la implicación de numerosos y diversos mecanismos en la etiopatogenia de este trastorno, asociada a su vez a la aparente variedad de perfiles de pacientes de esquizofrenia. Un compuesto multidiana permitiría interactuar con un rango superior de dianas dentro de la intrincada red de mecanismos implicados en el trastorno y, por tanto, presumiblemente, lograría un efecto más beneficioso (108). En ese sentido, la identificación, mediante técnicas genómicas como GWAS, de polimorfismos asociados a la aparición o el desarrollo del trastorno, así como de alteraciones en la expresión o transcripción génica, han puesto en la pista de posibles dianas y ligandos sobre los que estos fármacos podrían actuar. Así, unas de las estrategias que se ha extendido durante los últimos años en ésta y en otras patologías, es el uso de datos de alteraciones transcripcionales, combinado con herramientas bioinformáticas como el Connectivity Map (CMap) (109), que podrían ayudar a predecir el funcionamiento de un fármaco como tratamiento potencial y a identificar nuevos compuestos que puedan ser empleados para tal fin.

El uso de compuestos no neurolépticos para tratar los síntomas en pacientes con esquizofrenia está siendo cada vez más investigado. La compleja red de mecanismos celulares implicados en este trastorno permite abordar su tratamiento desde diferentes perspectivas. Más allá de los fármacos multi-diana, durante los últimos años se ha puesto el foco en la base inflamatoria y prooxidante de la patología. En ese sentido, son muchas los estudios que han propuesto la **utilización de fármacos antiinflamatorios y/o antioxidantes** para paliar los déficits derivados del trastorno, por el momento con resultados inconsistentes y divergentes. De hecho, se ha hipotetizado con que parte del efecto positivo de los antipsicóticos se deba a un ligero efecto antiinflamatorio (110-112). Varios de ellos muestran la capacidad de reducir tanto la presencia de marcadores de inflamación y estrés oxidativo. Sin embargo, no hay evidencias que demuestren un efecto neuroprotector real por acción sobre las células gliales afectadas, grandes responsables del estatus proinflamatorio y prooxidante (74). Además de los propios fármacos antipsicóticos, existe una gran variedad de compuestos con potencial antiinflamatorio y antioxidante que se han comenzado a testar en ensayos clínicos: fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como la **minociclina** (113), la aspirina (114) o el celecoxib (115), agentes y nutrientes con potencial antioxidante y neutralizador de las ROS, como la **N-acetilcisteína** (116), los **ácidos grasos omega-3** (117), las vitaminas C (118)

y E (119) o la melatonina (120), agentes con potencial neuroprotector, como los estrógenos (121) o la davunetida (122), e incluso algunas hierbas medicinales, como la cúrcuma (123). En la mayoría de los casos, estos compuestos, a pesar de sus notables efectos beneficiosos, presentan un potencial terapéutico más limitado, por lo que las estrategias terapéuticas no se basan, por lo general, en su administración de manera individual, sino como complemento de otras, generalmente los propios antipsicóticos. Esta estrategia no es nueva, ni mucho menos. De hecho, la resistencia al tratamiento que ya se ha mencionado se intentó paliar, en un principio, con la coadministración de diferentes antipsicóticos, intentando combinar los que presentaban mayor efectividad frente a los síntomas positivos con los que lograban paliar mejor los negativos. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron enteramente positivos y, en muchos casos, los efectos adversos se exacerbaban. Desde entonces, la combinación entre los fármacos antipsicóticos de uso habitual y otros compuestos que permitan reducir la inflamación y el estrés oxidativo es una constante en los ensayos clínicos de las últimas dos décadas (124). Estos estudios no han logrado solventar, por el momento, las limitaciones que implica el tratamiento de este trastorno, pero sí han aportado un nuevo enfoque, con resultados que, si bien no son definitivos, sí invitan a ahondar más al respecto.

Evidentemente, cada uno de los compuestos antiinflamatorios y antioxidantes mencionados presentan diferencias en cuanto a su efectividad, por la divergencia entre sus mecanismos de acción y las dianas con las que interaccionan. Lo que sí parece ser constante es la **diferente eficacia del tratamiento en función de la fase del trastorno en el que éste se aborda**. De este modo, para estrategias destinadas a reducir la inflamación y el estrés oxidativo, los tratamientos tempranos en pacientes que acaban de sufrir su primer brote o en individuos con riesgo elevado de desarrollar psicosis han mostrado ser mucho más eficaces que aquellas que se han realizado en pacientes con esquizofrenia crónica ya estabilizada (125). Este sesgo en el rendimiento de las terapias tiene sentido dada la naturaleza de la patología, con el componente de las posibles alteraciones del neurodesarrollo implicado en su etiopatogenia. Si tenemos en cuenta que tanto la inflamación como el estrés oxidativo pueden mediar en etapas muy tempranas, incluso prenatales, en el desarrollo del trastorno y que éste puede evolucionar a partir de esas alteraciones primigenias, estos resultados adquieren cierta lógica: si el estatus proinflamatorio y prooxidante se contrarresta en una fase temprana del trastorno, es más probable que el riesgo asociado a que se produzcan alteraciones, como consecuencia de la inflamación exacerbada y el estrés oxidativo, se disminuya. El tratamiento temprano de la sintomatología asociada a esquizofrenia, e incluso el abordaje preventivo, antes de que los síntomas aparezcan, está siendo objeto de debate actualmente, pero por el momento varios estudios, orientados a prevenir la aparición de déficits ya se han realizado, tanto en preclínica como en clínica, con resultados prometedores (126,127).

En definitiva, aunque el uso de antipsicóticos sigue siendo un elemento clave en el tratamiento de la esquizofrenia, el hallazgo de nuevos factores implicados en el desarrollo del trastorno, como la inflamación o el estrés oxidativo, ha permitido esbozar nuevos escenarios terapéuticos. Además, las evidencias que señalan a la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo, con una evolución que puede incluso empezar en etapas prenatales, han ampliado el horizonte de intervención, con la apertura de nuevas ventanas terapéuticas en las que es posible actuar, con el objetivo, no de paliar los síntomas, sino de prevenirlos incluso antes de que éstos se desarrollen o frenar la enfermedad.

2.2.1. N-acetilcisteína

La **N-acetilcisteína (NAC)** es un compuesto acetilado derivado del aminoácido cisteína (128) que se comenzó a emplear en la práctica clínica a mediados de la década de los 60 como fármaco mucolítico en patologías asociadas a obstrucción y congestión respiratorias, como la fibrosis quística o la bronquitis crónica (129). A partir de los 70, se estandarizó su uso para tratar intoxicaciones derivadas de la sobredosis por paracetamol (130). Desde entonces, el descubrimiento de nuevas propiedades de este fármaco ha originado que sea objeto de estudios y que se haya intentado llevar a la clínica para un gran número de patologías de orígenes muy diferentes: desde síndrome de distrés respiratorio a infecciones por el virus del VIH, entre otros. Además, la NAC es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque con diferente porcentaje de éxito en función de la vía de administración (131,132), lo que, unido a su potencial antioxidante y antiinflamatorio, le ha convertido también en un excelente candidato como estrategia terapéutica en patologías neurológicas con base oxidante-inflamatoria, como es el caso de la esquizofrenia.

La NAC es un precursor del glutatión (GSH), la molécula endógena antioxidante por excelencia en el sistema nervioso central (SNC), capaz de neutralizar tanto las ROS como las especies reactivas derivadas del nitrógeno (NOS) y, por tanto, de mantener el equilibrio homeostático celular. El GSH se sintetiza en el SNC, en un mayor porcentaje, por los astrocitos, que lo liberan al espacio extracelular, donde es degradado por acción de la γ -glutamyltranspeptidasa a un dipéptido formado por cisteína-glicina y glutamato, que a su vez es hidrolizado a cisteína y glicina, quedando estos aminoácidos a disposición de las neuronas para internalizarlos y sintetizar GSH, en un proceso de transporte celular activo dependiente de Na^+ . Este proceso es fundamentalmente dependiente de la disponibilidad de los sustratos, siendo generalmente la cisteína el factor limitante. La NAC no es dependiente de ningún sistema de transporte activo para entrar en la célula, por lo que es capaz de entrar directamente en la neurona, donde es hidrolizado y libera

cisteína, facilitando así la síntesis neuronal de GSH (131,133). Además, un porcentaje de la NAC administrada es hidrolizado de manera extracelular, entrando, a través del sistema de transporte activo, como cisteína directamente. El GSH, una vez sintetizado, es capaz de neutralizar las ROS mediante su acción directa con estas sustancias, en un proceso catalizado por la glutatión peroxidasa (para un resumen detallado del proceso, ver **Figura 1.4.**).

Figura 1.4.
Mecanismos neuroprotectores de la N-acetilcisteína

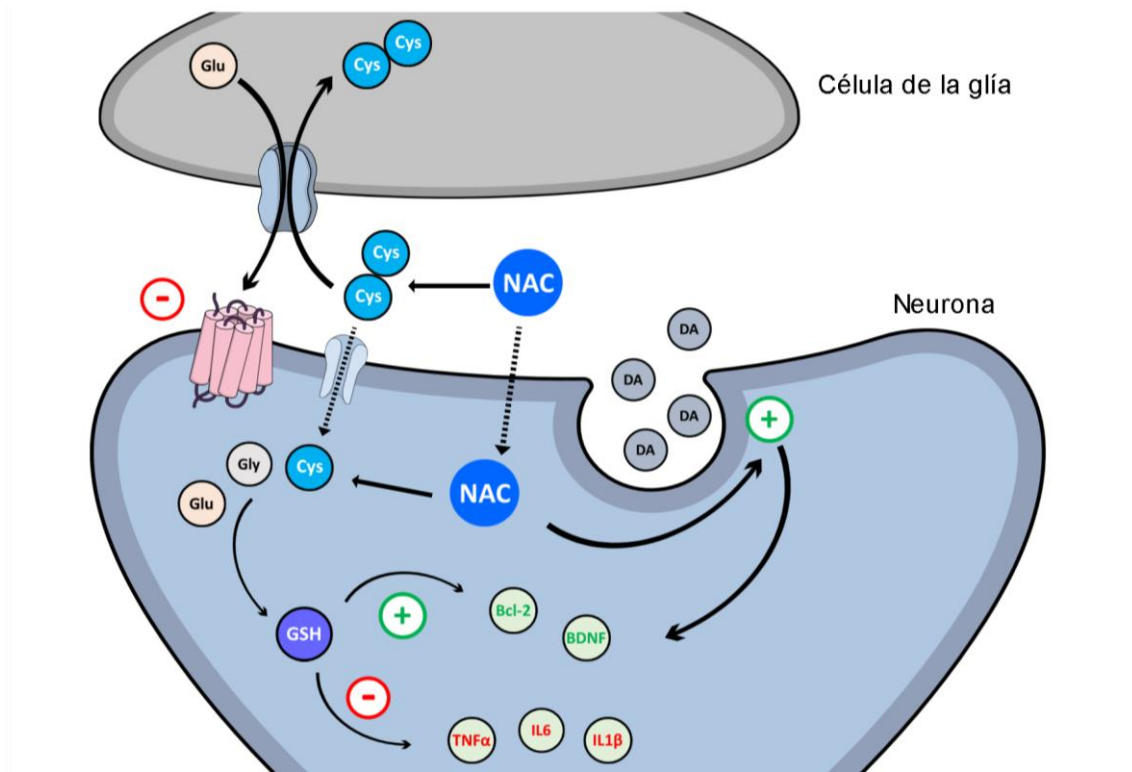


Fig. 1.4. Esquema con los mecanismos moleculares de la NAC centrado en su potencial efecto neuroprotector. La NAC potencia la neurotransmisión dopaminérgica y elimina el exceso de glutamato extracelular mediante la inhibición de los receptores de este neurotransmisor en los terminales sinápticos. La NAC promueve la síntesis intraneuronal de GSH, que colabora en la síntesis de mediadores neurotróficos (Bcl-2, BDNF) y en la inhibición de mediadores proinflamatorios (TNF α , IL6, IL1 β).

La NAC también tiene un efecto directo sobre dos sistemas de neurotransmisión muy implicados en la etiopatología de la esquizofrenia: los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico. La liberación de cisteína extracelular por parte de la NAC tendría también un efecto en la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica debido a su acción con los intercambiadores glutamato-cisteína localizados en las células gliales. Estos transportadores, en una situación de exceso de cisteína extracelular, son capaces de internalizar este aminoácido, en forma de dímero, en un proceso en el que, a su vez,

liberan glutamato al espacio extracelular. El glutamato libre interaccionaría con los receptores inhibitorios metabotrópicos de glutamato, en los terminales de las neuronas glutamatérgicas, reduciendo así la liberación, por parte de estas células, de glutamato, e inhibiendo las sinapsis resultado de esa liberación (134). A su vez, varios estudios han mostrado una hipotética promoción de la liberación de dopamina en varias regiones cerebrales tras la administración de NAC (135,136).

Finalmente, la NAC ha probado ser eficaz contrarrestando los incrementos exacerbados de mediadores proinflamatorios y prooxidantes, como ciertos tipos de citoquinas. De hecho, la NAC ha sido propuesta como potencial tratamiento frente a la tormenta de citoquinas provocada por el virus responsable de la COVID-19 (137). En varios estudios, tanto en modelos animales como en clínica, la NAC ha logrado reducir los niveles de varias citoquinas proinflamatorias, como son IL-6, TNF- α o IL-1 β (138-141).

Por todo ello, debido a la implicación de procesos proinflamatorios y prooxidantes, la NAC se ha valorado como un excelente candidato en el tratamiento de la esquizofrenia. En modelos animales que replican una o varias características propias de este trastorno son varios los beneficios que se han asociado a la administración de la NAC. Así, el tratamiento con NAC fue capaz de revertir los déficits de GSH en la corteza frontal y el estriado en dos estudios con un modelo animal inducido por la administración de ciclohexano (142,143). En un modelo de aislamiento social, la NAC logró revertir el aumento de compuestos proinflamatorios y prooxidantes, como el TNF- α o el IFN γ (144), además de restituir los niveles de dopamina y serotonina en corteza frontal y estriado. En ese mismo modelo, la NAC redujo la hipersensibilidad a anfetaminas en ratones previamente sometidos a aislamiento social (145). La NAC fue capaz también de revertir los déficits en la inhibición del prepulso, característicos tanto en pacientes de esquizofrenia como en la mayoría de los modelos que replican parcialmente el trastorno, (144,146-148) e incluso de prevenirlos (149). A nivel conductual, la NAC pudo revertir también las alteraciones en la memoria de trabajo (142,144,150). Por último, entre otros beneficios destacados de la NAC se encuentra el rescate de las interneuronas liberadoras de parvalbúmina, especialmente sensibles al daño oxidativo (151), o incluso su prevención, anticipándose a su pérdida (149,152).

A nivel clínico, son ya numerosos –más de 20, actualmente– los ensayos que se han llevado a cabo testando los beneficios de la NAC desde el primero que se realizó, en 2008 (153). Por lo general, la NAC en coadyuvancia con la farmacología antipsicótica de uso habitual por el paciente mostró ser eficaz disminuyendo la sintomatología negativa, valorada mediante la escala PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) (154-157) y, en algunos casos, la cognitiva (158,159). No obstante, otro ensayo realizado en pacientes con psicosis temprana no logró replicar los beneficios mostrados en cuanto a la regulación de los síntomas negativos. Aun así, en ese mismo estudio sí se reportó un

incremento del GSH tanto en cerebro como en plasma (159). En cuanto a los síntomas positivos, valorados también mediante la escala PANSS, la mayoría de ensayos no encontraron una mejora significativa tras el tratamiento con NAC, con algunas excepciones (160,161). Además, varios casos clínicos mostraron una disminución de la sialorrea derivada del uso habitual de la clozapina tras el tratamiento con NAC (162). Por último, varios ensayos también encontraron un aumento de la integridad de la sustancia blanca correlacionado con el aumento de GSH en corteza prefrontal (163), así como un incremento de la conectividad funcional en la corteza cingulada anterior (164) y una disminución de los niveles de glutamato en esa misma región (165).

2.2.2. Ácidos grasos Omega-3

Los **ácidos grasos omega-3 (OM3)** son un grupo heterogéneo de ácidos grasos con un doble enlace entre el tercer y el cuarto átomo de carbono. Dentro de esta categoría se encuadran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus sigla en inglés): ácido docosapentanoico (DPA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA), ácido linolénico (ALA) y ácido estearidónico (SDA) (166).

El interés en estas moléculas se ha disparado durante los últimos años debido a sus múltiples efectos sobre la salud y la prevención de patologías de muy diversa índole. Tanto el ALA como el DHA son ácidos grasos de cadena larga, por lo que no pueden sintetizarse *de novo* y sólo pueden obtenerse a través de la dieta (166). El resto de PUFAs puede sintetizarse de manera endógena a partir del ALA, que actúa como su precursor. La ruta de síntesis de los PUFAs se muestra esquematizada en la **Figura 1.5**. Tanto el ALA como los demás PUFAs se pueden obtener de manera exógena a partir de la dieta, siendo especialmente ricos en alguno o en varios de estos ácidos grasos el pescado blanco, como el bacalao o la sardina, algunos cereales y algunos frutos secos.

Los PUFAs, más allá de su utilización, más reciente, como parte de diferentes estrategias terapéuticas, son componentes esenciales de las membranas celulares, lo que les dota de una importancia estructural y fisiológica fundamental. De hecho, en el cerebro, el 60% de los lípidos de membrana son fosfolípidos, de los cuales la mayoría son ácidos omega-3 PUFAs, mientras que el resto son ácidos grasos omega-6 (OM6) (167). Concretamente, el DHA supone el 40% de los fosfolípidos del cerebro (168), lo que invita a pensar en un rol clave de esta molécula a nivel neuronal. De hecho, se ha hipotetizado sobre su posible implicación en procesos relacionados con la regulación de receptores de varios neurotransmisores, así como con la modulación de las sinapsis (169).

En esquizofrenia son varias las evidencias que apuntan a alteraciones, a nivel neuronal, en las proporciones de estos ácidos grasos. De hecho, incluso se ha hipotetizado que un posible desequilibrio de DHA y ácido araquidónico durante el desarrollo cerebral

(OM3 y OM6, respectivamente), que daría como resultado una deficiencia de omega-3, sería responsable de daños corticales y su incorrecta maduración funcional, incrementando el riesgo de desarrollar esquizofrenia (170). Además, en edad adulta, la esquizofrenia se ha correlacionado con una disminución de los PUFAs tanto en eritrocitos como en células nerviosas (171). Estos bajos niveles de PUFAs estarían asociados con la aparición de síntomas tanto positivos como negativos (172,173) e inversamente correlacionados con la severidad de los mismos (174).

Figura 1.5.
Mecanismos neuroprotectores de los ácidos omega-3

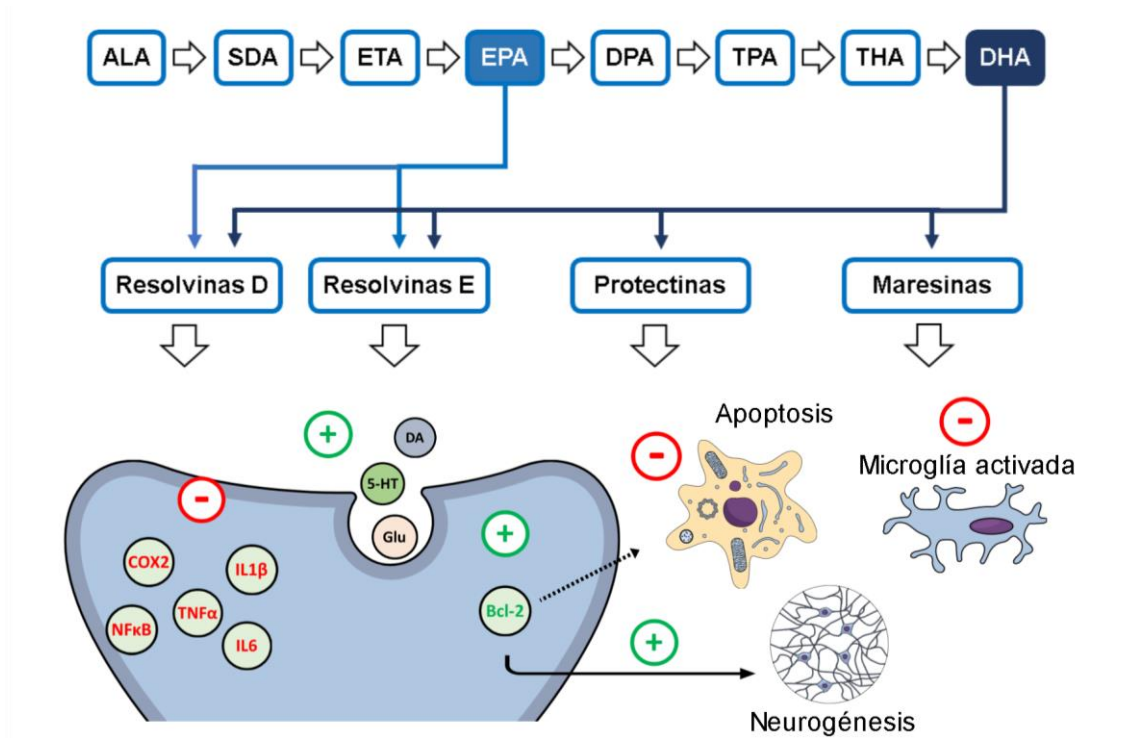


Fig. 1.5. Esquema con los mecanismos moleculares de los ácidos omega-3 con potencial efecto neuroprotector. A partir de los diferentes ácidos grasos, especialmente EPA y DHA, se sintetizan las resolvinas D y E, las protectinas y las maresinas que, entre otras funciones, son capaces de inhibir la liberación de mediadores pro-inflamatorios a nivel neuronal, así como de la microglía activada y de mediadores proapoptóticos. A su vez, son capaces también de potenciar la neurotransmisión glutamatérgica, serotoninérgica y dopaminérgica y la neurogénesis.

Existen varias hipótesis que explican el déficit de estos ácidos grasos en este trastorno. Entre ellas, se ha descrito una posible hiperactivación de la fosfolipasa A2 (PLA2), una enzima capaz de hidrolizar ácidos grasos. De hecho, se ha reportado un incremento significativo de esta enzima en individuos con riesgo alto de sufrir psicosis y en pacientes de primer episodio (175). Otra posible explicación es, de nuevo, el incremento del

estrés oxidativo y, por ende, de la inflamación inherente a la etiopatogenia de la esquizofrenia. El gran consumo de oxígeno que es llevado a cabo por el cerebro (casi un 20% del total) hace más sensible a sus células frente a desequilibrios que impliquen un aumento del estrés oxidativo, siendo especialmente susceptibles los PUFAs a este daño oxidativo. En ese sentido, la administración de PUFAs ha probado ser eficaz potenciando las defensas antioxidantes (176) e inhibiendo las citoquinas proinflamatorias (177).

Por todo lo descrito, los PUFAs llevan años siendo utilizados como complemento a los tratamientos convencionales frente a la esquizofrenia. En modelos animales los PUFAs han mostrado su eficacia revirtiendo o previniendo muchos de los déficits asociados a este trastorno. De este modo, varios estudios han mostrado un efecto neuroprotector de los PUFAs en varios modelos animales asociados a la esquizofrenia, previniendo el daño en regiones cerebrales específicas, especialmente en el hipocampo y el cuerpo estriado (178-180) con, incluso, una disminución de la apoptosis celular (178) y un aumento de la plasticidad sináptica (181). Los PUFAs también mostraron ser efectivos reduciendo los niveles de distintos marcadores proinflamatorios y prooxidantes, como MDA, iNOS, TNF- α , NF κ B o IL-6 (181-183). Además, a nivel conductual, los PUFAs fueron eficaces revirtiendo los déficits de memoria, ansiedad y de respuesta al sobresalto (178-180,182,184).

En el ámbito clínico, el número de ensayos que se ha llevado a cabo es relativamente abundante -45- en comparación con otros compuestos probados en este trastorno, principalmente por ser un componente común de la dieta con un perfil de reacciones adversas muy bajo. En la mayoría de ellos, los PUFAs fueron administrados en coadyuvancia con su tratamiento antipsicótico habitual. Además, aunque algunos fueron realizados en psicosis temprana o personas en riesgo extremo, la amplia mayoría de los ensayos se realizó en pacientes con esquizofrenia ya estabilizada.

Los resultados muestran, por lo general, un efecto beneficioso sobre la sintomatología positiva, más visible en pacientes con esquizofrenia crónica (185,186) que en aquellos en fases más tempranas del trastorno, aunque un ensayo con pacientes en etapas anteriores mostró también la eficacia del uso de los PUFAs como complemento (187). Los síntomas generales, medidos por la subescala específica de PANSS, también mostraron una mejora significativa en varios ensayos (185,186,188-190). Por otra parte, la sintomatología negativa no mejoró de una manera tan evidente, con alguna excepción, principalmente en fases tempranas del trastorno (187,190).

2.2.3. Minociclina

La **minociclina** (7-dimetilamino-6-dimetil-6-desoxitetraclina) es un antibiótico semisintético perteneciente a la segunda generación de la familia de las tetraciclinas.

Debido a su alta efectividad frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, especialmente *Staphylococcus aureus*, su uso está actualmente aprobado para tratar infecciones bacterianas comunes, como el acné o la periodontitis. Sin embargo, si este fármaco ha atraído la atención de la comunidad científica durante los últimos años ha sido principalmente por sus propiedades no antibióticas. A causa de su tamaño reducido (495 KDa) y su alta solubilidad, la minociclina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica en un porcentaje relativamente elevado, considerablemente mayor que el de otros miembros de su misma familia, como la doxiciclina (113). Esta habilidad se une a su potencial como agente regulador de la inflamación y el estrés oxidativo para convertir a la minociclina en un fármaco a tener en cuenta también en patologías neurológicas de origen inflamatorio.

El potencial antiinflamatorio y antioxidante de la minociclina (**Figura 1.6.**) deriva principalmente, aunque no solamente, de su capacidad para inhibir la microglía. Recordemos que tanto la esquizofrenia como otros trastornos del neurodesarrollo presentan un entorno de hiperactivación microglial que es en parte causa y en parte consecuencia de los eventos de inflamación y estrés oxidativo exacerbados. En ese sentido, la minociclina es capaz de inhibir la proliferación y la activación de la microglía silente al fenotipo M1, reduciendo de este modo la liberación de moléculas proinflamatorias y prooxidantes, como el factor α de necrosis tumoral (TNF- α), el interferón γ (IFN- γ), las IL-6 y IL-1 β , las prostaglandinas (PGE) o la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (191,192). Como consecuencia de su acción sobre la microglía, también se ha descrito un posible efecto reductor de la excitotoxicidad causada por un exceso de glutamato extracelular (193). Además de su acción sobre la microglía, la minociclina podría actuar directamente sobre diferentes componentes del sistema inmunitario, impidiendo la liberación de compuestos proinflamatorios y prooxidantes (194). La minociclina ejercería su potencial antioxidante también mediante su acción directa sobre iNOS, impidiendo la generación de óxido nítrico y, por tanto, reduciendo la liberación de compuestos relacionados con un incremento del estrés oxidativo. De manera indirecta, la minociclina parece que también podría promover la reducción de la inflamación y el estrés oxidativo por su potencial como agente antiapoptótico y neurotrófico (195).

Por todas estas propiedades, se han investigado, durante las dos últimas décadas, los posibles beneficios que la minociclina podría aportar al campo de la psiquiatría. De hecho, hasta la fecha se han realizado 17 ensayos clínicos con este fármaco en coadyuvancia al tratamiento habitual en esquizofrenia, depresión, trastorno bipolar o trastorno del espectro autista, entre otros (113). En esquizofrenia, las ventajas clínicas que podía ofrecer el uso de la minociclina se comenzaron a vislumbrar de un modo, en cierta manera, serendípico, tras la publicación, por parte de un grupo de científicos japoneses, de un caso clínico de un hombre con esquizofrenia crónica que, a causa de una infección

bacteriana concomitante, se le recetó minociclina. Tras su uso durante dos semanas, además de la remisión de la infección, mostró una mejora significativa en varios síntomas relacionados con su trastorno psiquiátrico, como las alucinaciones. Finalizada la administración del antibiótico, los síntomas volvieron a empeorar, para remitir cuando el tratamiento con minociclina fue retomado (196).

Figura 1.6.
Mecanismos neuroprotectores de la minociclina

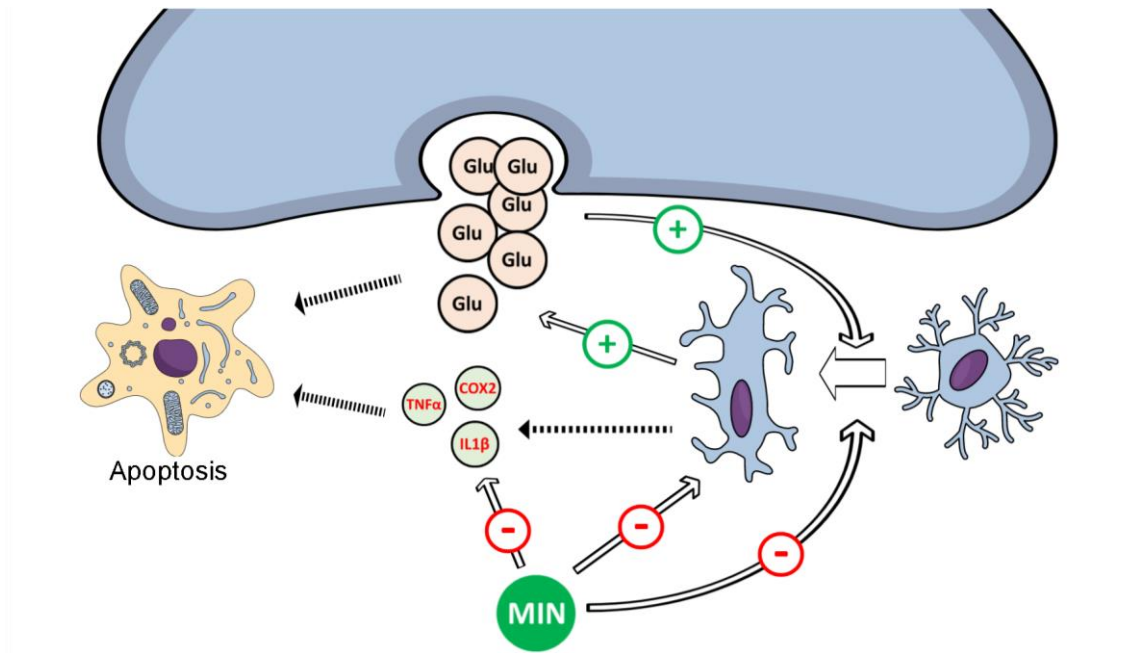


Fig. 1.6. Esquema con los mecanismos moleculares de la minociclina con potencial efecto neuroprotector. Se destaca por encima del resto el efecto inhibitorio que ejerce la minociclina sobre la microglía activada, impidiendo de este modo el exceso de glutamato extraneuronal que puede llevar a excitotoxicidad neuronal, así como la liberación de mediadores proinflamatorios. Además, la reversión de estos procesos lleva a su vez, de una manera indirecta, a la reducción de los procesos apoptóticos.

Los primeros estudios con modelos animales relacionados con esquizofrenia corroboraron los buenos resultados mostrados en el caso clínico: varios reportaron una disminución de distintos déficits conductuales característicos de estos modelos, como la hiperlocomoción o la disminución de la inhibición del prepulso y de la memoria visuoespacial (126,197-199). Los efectos inhibitorios de la minociclina sobre la microglía del hipocampo y la corteza prefrontal también fueron demostrados en un modelo animal de doble impacto (126).

En el escenario clínico, los primeros ensayos también mostraron un potencial efecto beneficioso de la minociclina en coadyuvancia con distintos fármacos antipsicó-

ticos, mayoritariamente risperidona y clozapina. Concretamente, la minociclina se mostró particularmente efectiva actuando sobre los síntomas negativos (200-203) y sobre varios dominios de los síntomas cognitivos (204). Algunos estudios también describieron una remisión parcial de la sintomatología positiva, aunque en menor medida que la negativa o la cognitiva (205,206). No obstante, a pesar de los resultados prometedores, el ensayo más grande realizado hasta la fecha, con 207 pacientes con esquizofrenia temprana como participantes, no mostró ninguna mejora clínica como resultado de la administración de la minociclina (207), ni siquiera la remisión de los déficits volumétricos en áreas cerebrales de sustancia gris que se observaba en otro ensayo (206). A pesar de estos resultados, se realizó otro ensayo, más modesto en proporción, que sí replicó los resultados previos, además de mostrar una disminución de los compuestos proinflamatorios IL-6 e IL-1 β como resultado de la administración de la minociclina (208).

3. Modelos animales asociados a esquizofrenia

La investigación científica en trastornos humanos necesita de modelos animales que, aunque limitados, sean apropiados para la enfermedad humana que pretenden replicar. Esto no es una excepción en el caso de los trastornos psiquiátricos, aunque sí supone una dificultad añadida por la complejidad de parte de la sintomatología a reproducir. Además de la naturaleza intrínsecamente humana de muchas de las manifestaciones clínicas, como es el caso de las alucinaciones o varios síntomas cognitivos, otros factores como la heterogeneidad de los síntomas, del curso clínico del trastorno o de los factores causativos responsables de su aparición, suponen un complicado añadido de cara a su replicación en animales. A esto se añade la dificultad de adaptar un trastorno con un alto componente cognitivo en especies con un desarrollo cognitivo menor que el humano. De este modo, los modelos animales actuales asociados a esquizofrenia no están orientados a mimetizar completamente el trastorno, por la inviabilidad de replicar absolutamente el trastorno en una especie no humana, sino que están dirigidos a reproducir hipótesis mecanísticas y/o causativas más específicas, relacionadas parcialmente con las presentes en el trastorno psiquiátrico humano. Por lo general, para que un modelo animal sea representativo de la enfermedad que pretende replicar se entiende que debe cumplir tres aspectos: validez aparente, validez de constructo y validez predictiva. La **validez aparente** hace referencia a la similitud fenomenológica entre el modelo y el trastorno humano. En esquizofrenia, debido a la naturaleza de los síntomas, este aspecto supone uno de los más conflictivos, por la dificultad de interpretarlos en especies no humanas. No obstante, algunos modelos son capaces de reproducir algunos déficits conductuales que sí están asociados a los presentes en el trastorno. Es el caso de la hiperactividad locomotora, relacionada con la sintomatología positiva, la preferen-

cia de sucrosa o la interacción social, relacionadas con los síntomas negativos, la inhibición latente o la memoria, relacionadas con los síntomas cognitivos, o la inhibición del prepulso, ligado a los déficits sensorimotores. La **validez de constructo** indica el nivel de homología que existe en los mecanismos que conducen a los déficits asociados. En el caso de la esquizofrenia esto conlleva también una seria dificultad, principalmente debido a que ni siquiera en humanos existe un consenso claro al respecto, con una certeza parcial de mecanismos que pueden estar relacionados con la aparición de los síntomas. No obstante, algunos modelos sí muestran algunas de las características fisiopatológicas que, sabemos, presentan los pacientes con esquizofrenia. Ejemplo de ello son las alteraciones en biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo, déficits en los niveles de algunos neurotransmisores y variaciones morfométricas en el cerebro, principalmente a nivel cortical y de los ventrículos. Por último, la **validez predictiva** se refiere al potencial del modelo como herramienta capaz de ayudar a predecir la eficacia de nuevos agentes terapéuticos en humanos. De nuevo, en esquizofrenia, en este caso nos chocamos con la dificultad para encontrar manifestaciones aparentes y mensurables con facilidad que correlacionen con las observadas en humanos. A pesar de la complejidad comparativa, sí existen algunos componentes conductuales, estructurales y moleculares que pueden ser replicados en animales.

Por tanto, es evidente que un modelo animal no va a ser capaz nunca de mimetizar el amplio abanico de alteraciones y síntomas presentes en esquizofrenia (es complicado encontrar una homogeneidad incluso entre humanos), pero lo que sí han conseguido muchos modelos es replicar una parte concreta del trastorno, que puede facilitar la comprensión de los mecanismos que rigen la patología humana y la búsqueda de nuevas herramientas con las que encararla.

3.1. Modelos genéticos, farmacológicos e inducibles por lesión

Los **modelos genéticos** implican la mutación, normalmente una delección, de un gen relacionado con algún proceso presente en la etiopatogenia del trastorno, generalmente ligados a la plasticidad sináptica, la neurogénesis o la neurotransmisión dopaminérgica o glutamatérgica. Ya se presentó anteriormente un estudio de GWAS en el que se identificaron 108 loci mutados en pacientes con esquizofrenia (13). De éstos, muchos de ellos se han utilizado para desarrollar modelos animales con déficits específicos. Probablemente el modelo más usado es el que implica la mutación en el gen *Disc1*, que codifica para la proteína DISC1, implicada en la expresión de varias proteínas sinápticas y en el desarrollo neuronal pre- y postnatal (209). La delección del gen *22q11.2* implica también la alteración neuroanatómica, con variaciones a nivel cortical y subcortical y un

considerable aumento de los ventrículos, así como déficits conductuales (210). La mutación heterocigótica condicionada en el gen de la neuregulina-1 (*Nrg-1*) produce una alteración de la señalización en el binomio formado por la proteína NRG-1 y su receptor, ErbB4, que propicia la aparición de déficits conductuales consistentes con los presentes en el trastorno humano, así como una reducción de la densidad de espinas sinápticas en las neuronas piramidales del hipocampo (211). Dos proteínas relacionadas con la formación y el mantenimiento de las sinapsis neuronales, la disbindina y la reelina, también se han modificado para producir fenotipos asociados a la esquizofrenia (212,213).

Si los modelos genéticos estaban relacionados con alteraciones en genes específicos relacionados con funciones concretas alteradas que tenían un correlato con el trastorno humano, en el caso de los modelos farmacológicos o los inducidos por lesión, esa alteración se realiza de manera directa, o bien mediante la administración de un fármaco que dañe esa función específica, o bien mediante la lesión de una región cerebral concreta. Por lo general, en lo que respecta al abordaje farmacológico de este tipo de modelos, la mayoría se basa en la administración de compuestos antagonistas no competitivos del receptor NMDA, como la fenciclidina, la ketamina y el MK-801, o de potenciadores de la dopamina, como las anfetaminas o la apomorfina (214-218).

3.2. Modelos del neurodesarrollo

Como ya se ha descrito, en los trastornos del neurodesarrollo, como es el caso de la esquizofrenia, las alteraciones en fases tempranas del desarrollo nervioso pueden producir perturbaciones a largo plazo. Esta base es la que se ha empleado para la generación de un gran número de modelos animales de este trastorno. La afectación externa, por distintos medios que pretenden replicar aquellos que ocurren en un entorno humano, de fases concretas del neurodesarrollo lleva en muchos modelos animales a desencadenar una serie de déficits consistentes con los observados en humanos. Estos modelos presentan varias ventajas respecto a los ya presentados, especialmente los inducidos mediante lesión o farmacológicamente. En estos últimos, aunque a nivel mecánico pueden aportar una ayuda muy importante, existe una carencia evidente de validez etiológica, con la consiguiente falta de cambios sutiles a lo largo de varios sistemas neuronales que reflejen de una forma más precisa la patogenia del trastorno. En contraposición a éstos, los modelos animales del neurodesarrollo sí presentan una mayor correlación etiológica, pueden replicar el comienzo progresivo y tardío de los síntomas, y pueden actuar afectando a más de un sistema neuronal al mismo tiempo. No obstante, algunos de los modelos de este tipo están relacionados con los ya presentados, con mutaciones o intervenciones en etapas clave del neurodesarrollo temprano. Muchos modelos están basados en la **generación de estrés en la madre durante la gestación**. Este

estrés puede lograrse por distintos medios, como puede ser a partir de la restricción de su movimiento, la malnutrición, incidiendo en un déficit nutricional de proteínas o de vitamina D. La exposición a un estrés variable durante la gestación, con la finalidad de impedir la adaptación al mismo, también se ha usado de manera frecuente (219,220).

Otro tipo de modelo del neurodesarrollo se basa en la ya mencionada correlación entre la infección vírica o bacteriana durante fases específicas de la gestación y el desarrollo, a largo plazo, de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia. En ese sentido, el llamado **modelo de estimulación inmunitaria materna (MIS)**, consistente en la infección con un agente viral, como el virus humano de la influenza (221), o con compuestos de carácter inmunógeno, como el lipopolisacárido (LPS) o el ácido poliinosínico:policitidílico (Poly I:C) (222), se usa con frecuencia como réplica del proceso que tiene lugar en humanos. En estos modelos se han reportado también déficits neuroanatómicos y conductuales a largo plazo en la descendencia, de los que se hablará más en detalle en el punto siguiente, por su relevancia en esta Tesis.

Por último, el siguiente paso que se ha dado en este tipo de modelos está relacionado con los llamados **modelos de doble impacto**, consistente en la concurrencia de dos factores, en distintas etapas del neurodesarrollo, generalmente el periodo prenatal y la adolescencia, con el fin de potenciar los posibles efectos deletéreos a largo plazo. Así, es común utilizar un modelo que combine la metodología de los modelos MIS con la exposición a estrés durante la adolescencia, en el periodo prodrómico (126). En esta Tesis, no obstante, nos centraremos en el modelo de estimulación inmunitaria materna inducido mediante la administración de Poly I:C.

3.3.1. Modelo de estimulación inmunitaria materna: inducción mediante Poly I:C

El modelo de estimulación inmunitaria materna (MIS), como ya se ha presentado, se basa en la asociación entre infecciones durante el periodo prenatal y el desarrollo a largo plazo de sintomatología asociada a trastornos del neurodesarrollo, como es el caso de la esquizofrenia. Esta inducción se puede realizar mediante la infección por agentes virales reales, de forma controlada, o por miméticos virales, sin potencial infeccioso. Ambos métodos presentan tanto ventajas como desventajas a la hora de replicar el trastorno humano. Por una parte, la inducción del modelo con virus reales permite obtener una respuesta inmunitaria más traslacional, semejante a la que acontece en humanos, con una activación inmunitaria mucho más amplia, que implica tanto la respuesta innata como la adquirida. Por otra parte, la generación del modelo MIS mediante virus con capacidad infecciosa añade un componente mayor de entropía que el logrado mediante la utilización de compuestos sin potencial infeccioso, como el Poly I:C o el LPS.

El uso del Poly I:C y el LPS permite conseguir una respuesta inmunitaria más controlada en el tiempo, con la posibilidad de hacerla restrictiva a una ventana más concreta del desarrollo prenatal. La administración tanto de Poly I:C como de LPS durante la gestación va acompañada por la aparición de alteraciones del sistema inmunitario en la madre, que va acompañado de la liberación de citoquinas proinflamatorias, durante un periodo de, como máximo, 48 horas tras la administración (222). Esta concreción temporal en la respuesta inmunitaria ha posibilitado la creación de distintos modelos basados en la estimulación inmunitaria materna según la ventana temporal en la que se realiza la administración. De este modo, el LPS o el Poly I:C pueden incrementar el riesgo de desarrollar sintomatología asociada, no solo a esquizofrenia, sino también a otros trastornos del neurodesarrollo, como el autismo, en función del momento de la administración (223).

Las ventanas de intervención abarcan toda la gestación, pero las más comunes en modelos murinos son en la gestación temprana (días 8.5–9.5), a mitad de gestación (12.5–13.5 o 14.5–15.5) o a finales (16.5–18.5) (52,224). Para modelizar sintomatología asociada a la esquizofrenia, en modelos en ratón la más empleada es la primera, mientras que en rata se utiliza con más frecuencia la ventana que abarca los días 14.5–15.5. No obstante, todas las ventanas implican procesos embrionarios complejos cuya modificación acarreará alteraciones a largo plazo, aunque éstas varíen entre sí.

Además de las diferencias ya comentadas entre la generación del modelo con virus reales o miméticos, existen también contrastes entre el modelo inducido por Poly I:C y otros compuestos, como el LPS. El mecanismo de acción es una de estas diferencias: el Poly I:C y el LPS interactúan con dos receptores que, si bien pertenecen a la misma familia (Toll-like receptors, TLR), son distintos (TLR4 y TLR3, respectivamente) (223). Sin embargo, la distinción principal la encontramos en su estructura molecular. El Poly I:C, a diferencia del LPS, es un mimético viral de doble cadena, lo que se asemejaría en mayor medida a una infección viral, desencadenando una respuesta más robusta y con una implicación más elevada de la ruta del interferón (225). Además, la expresión de TLR3 es mayor en la placenta que la de TLR4 (226). El **Poly I:C** es un análogo sintético de un ARN de doble cadena formado por homopolímeros de inosina y citidina. El Poly I:C interactúa con las células uniéndose a los receptores TLR3 (**Figura 1.7.**), implicados en la respuesta inmunitaria innata en mamíferos, y desencadenando una respuesta proinflamatoria que implica la activación de las vías de señalización mediadas por el Factor de Regulación del Interferón (IRF3) y NF- κ B (225). Esta cascada de señalización resulta en la expresión de citoquinas proinflamatorias que alcanzan diferentes dianas celulares, como las neuronas o la glía. Esta respuesta inmunitaria, al estar mediada por los TLR3, se asemeja a la producida, en humanos, por virus como el de la influenza o el herpesvirus simple, ambos asociados al desarrollo de trastornos como la esquizofrenia cuando

la infección se produce durante la gestación (227). Si el pico de respuesta inmunitaria frente a esta infección ocurre durante la gestación, como es el caso en el modelo inducido por Poly I:C, las citoquinas proinflamatorias, principalmente IL-6, IL-1 β y TNF- α (222), pueden cruzar en exceso a través de la barrera placentaria e interactuar con el feto, cuyo sistema inmunitario, aún incipiente, no está preparado para responder correctamente a un entorno proinflamatorio agudo, inestabilizando el precario equilibrio de citoquinas en un cerebro que se encuentra aún en fases tempranas del desarrollo.

Figura 1.7.
Mecanismo de acción del Poly I:C

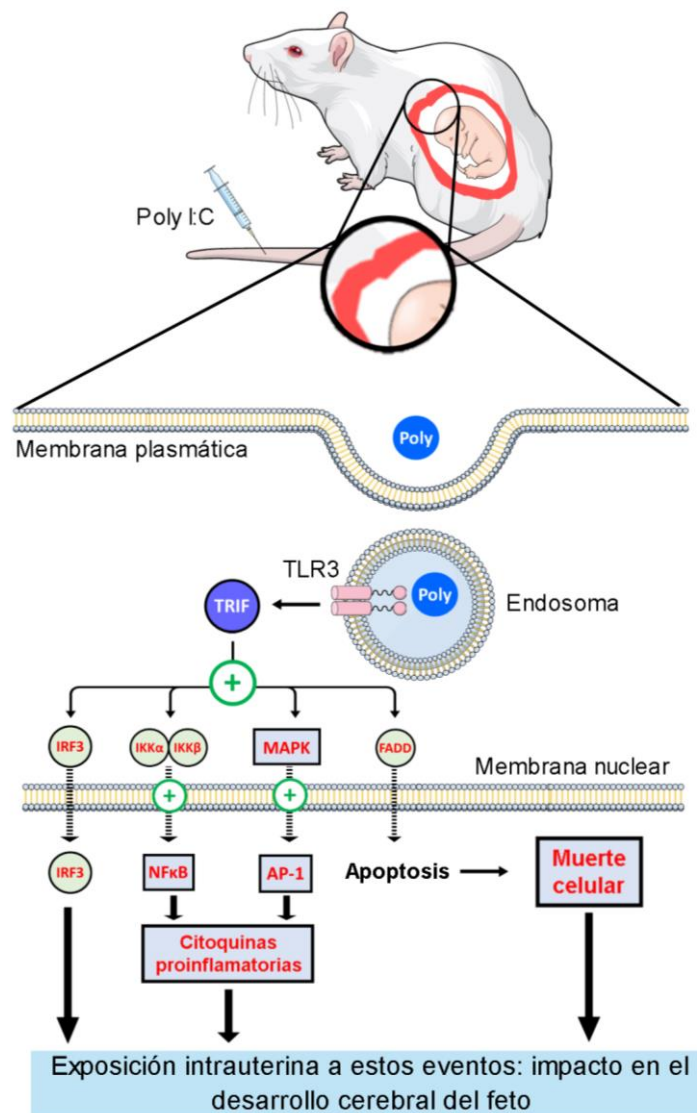


Fig. 1.7. Esquema con el mecanismo de acción del ácido Poly I:C. Tras ser administrado a la madre gestante, es endocitado, interacciona con los receptores TLR3 endosomales, activando una serie de rutas celulares relacionadas con procesos proinflamatorios, prooxidantes y proapoptóticos. En este proceso, se liberan mediadores proinflamatorios que atraviesan la barrera placentaria y desencadenan la respuesta del sistema inmunitario fetal aún incipiente con, de nuevo, la liberación de mediadores proinflamatorios, prooxidantes y proapoptóticos. La exposición temprana a estas moléculas causa alteraciones en el desarrollo cerebral del feto que, a largo plazo, pueden desencadenar trastornos mentales, entre ellos la esquizofrenia.

Los déficits que la administración del Poly I:C en este modelo puede desencadenar en animales adultos abarcan un amplio abanico de síntomas neuroanatómicos, moleculares y conductuales. No obstante, como ya se mencionado, la aparición de unos u otros es muy variable, dependiendo de la ventana temporal de exposición al inmunógeno, con otros factores, como la especie, la cepa o incluso el sexo, jugando también un rol importante. A nivel de morfología cerebral se ha indicado una disminución del volumen cortical e hipocampal, así como un aumento del tamaño de los ventrículos (58). También se han mostrado anomalías en la integridad de la sustancia blanca y en la neurogénesis (228). Algunos estudios han reportado a su vez un incremento de la actividad microglial, en línea con lo planteado en la génesis del modelo y del trastorno humano (229), así como alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica, glutamatérgica y gabaérgica (230-232). A nivel molecular, las alteraciones principales están relacionadas con el incremento de la concentración de citoquinas proinflamatorias en distintas regiones cerebrales (233). Por último, a nivel conductual, se han reportado déficits en la inhibición del prepulso, en los comportamientos de carácter social y en la memoria, con un aumento de la ansiedad, de la hiperactividad y de síntomas ligados a depresión (52).

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la **evaluación de tres compuestos con potencial antiinflamatorio y antioxidante, la N-acetilcisteína, los ácidos omega-3 y la minociclina, como estrategias preventivas frente a la aparición de sintomatología asociada a la esquizofrenia**. Para ello, se empleó el modelo murino de estimulación inmunitaria materna, un modelo que presenta muchos de los déficits presentes en el trastorno humano y que, por tanto, posee una gran validez como herramienta predictiva en la eficacia de diferentes tratamientos.

Otro objetivo de esta Tesis es **evaluar el potencial preventivo de estos compuestos antiinflamatorios y antioxidantes en dos ventanas terapéuticas previas a la aparición de los síntomas: la periadolescencia y la gestación**. En el primer caso se identificó el efecto de los tres fármacos de estudio y, en el caso de la gestación se puso a prueba la eficacia de la N-acetilcisteína durante dos ventanas temporales diferentes en este periodo. La caracterización del potencial preventivo de las diferentes estrategias se realizó a varios niveles: bioquímico, neuroanatómico y conductual.

Por último, haciendo uso de las herramientas bioinformáticas proporcionadas por la base de datos Connectivity Map y a partir de datos transcriptómicos procedentes tanto del campo preclínico como del clínico se realizó un análisis aproximativo con el objetivo de **encontrar fármacos, actualmente aprobados para otras patologías, cuyo uso pudiese ser potencialmente beneficioso para tratar la esquizofrenia o incluso prevenir su aparición**.

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental de esta Tesis Doctoral se dividió en tres secciones: **Estudio I, Estudio II y Estudio III.**

El **Estudio I** tuvo como objetivo la valoración de la eficacia preventiva de la **N-acetilcisteína** (NAC), el **ácido graso omega-3** (OM3) y la **minociclina** (MIN) tras su administración durante la **periadolescencia** en el modelo murino de estimulación inmunitaria materna asociado a esquizofrenia (MIS, de sus siglas en inglés: maternal immune stimulation).

Para la realización del **Estudio II** se seleccionó el compuesto que ofreció los mejores resultados en la primera parte, la **N-acetilcisteína**, con el objeto de analizar en mayor profundidad su potencial como estrategia preventiva en el modelo MIS mediante su administración en una nueva ventana terapéutica más temprana: la **gestación**.

Por último, el **Estudio III** estuvo dirigido a la identificación de nuevos fármacos y compuestos con un potencial efecto beneficioso en el tratamiento o la prevención de la esquizofrenia, utilizando para ello datos transcriptómicos ya publicados y haciendo uso de la base de datos CMap.

1. Estudios I y II: Estrategias preventivas frente a la aparición de síntomas asociados a esquizofrenia durante la periadolescencia y la gestación

Un resumen gráfico detallado con los diseños de los estudios I y II se puede ver en la Figura 2.1.

1.1. Animales de estudio

Para la realización de ambos estudios se utilizaron ratas Wistar macho. Todos los animales fueron estabulados de 2 a 4 por cubeta, y mantenidos a una temperatura constante ($24 \pm 0.5^\circ\text{C}$), en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, con acceso libre tanto a la comida (pienso convencional para roedores) como al agua. Todos los procedimientos fueron se realizaron conforme a la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas 2010/63 EU y fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del Hospital Gregorio Marañón (número ES280790000087).

En el Estudio I, los animales se dividieron en dos para la realización de las diferentes pruebas: por un lado, 73 animales, a los que se efectuaron la prueba de comportamiento en las instalaciones de la Universidad de Cádiz y, por otro lado, 102 animales, a los que se realizaron las pruebas de imagen y las valoraciones bioquímicas en tejido fresco en las instalaciones del Hospital Gregorio Marañón.

En el caso del Estudio II, tanto las pruebas conductuales como el resto de valoraciones *in vivo* se realizaron en el Hospital Gregorio Marañón. 68 animales se emplearon para este fin.

Figura 2.1.

Diseño experimental de los Estudios I y II

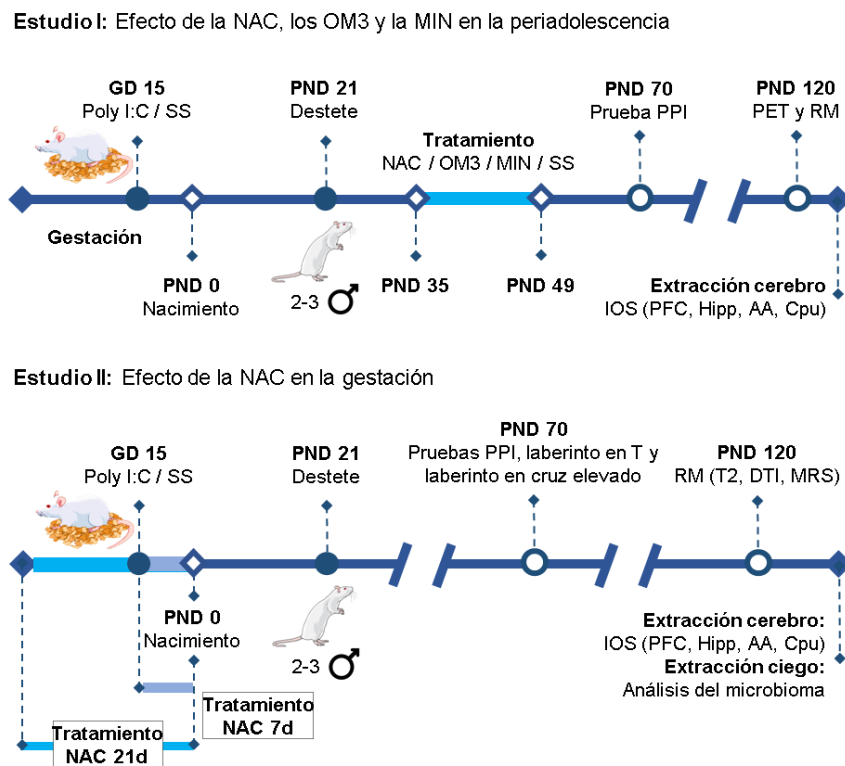


Fig. 2.1. Esquema con las diferentes etapas experimentales para los Estudios I y II. En el Estudio I, se indujo el modelo administrando Poly I:C i.v. en el día 15 de gestación. Tras el destete, se seleccionaron 2-3 machos por camada y se separaron según su grupo de estudio. Entre los días 35 y 49 (periadolescencia) se administraron los diferentes tratamientos (N-acetilcisteína, ácidos omega-3 o minociclina) o suero salino, como control. En PND 70 se realizó la prueba conductual de inhibición prepulso. En PND 120 se adquirió la imagen de resonancia magnética para realizar estudios estructurales, así como la imagen de PET. Después de la imagen, los animales se sacrificaron y se extrajo el cerebro para realizar un estudio de marcadores de inflamación y estrés oxidativo en cuatro estructuras cerebrales. En el Estudio II, el modelo se indujo del mismo modo que en el I. El tratamiento con N-acetilcisteína se realizó durante toda la gestación (NAC21d) o desde la administración del Poly I:C hasta el parto (NAC7d). Tras la selección de 2-3 machos por camada (PND 21) se realizaron las pruebas de comportamiento en PND 70. Además de la prueba PPI, se realizaron el laberinto en T y el laberinto en cruz elevado. En día 120, se adquirió la imagen de resonancia magnética, incluyendo estudios estructurales, de difusión y de espectroscopia. Tras la imagen se extrajo el cerebro para el análisis de marcadores de inflamación y estrés oxidativo, así como el ciego, para el análisis de la microbiota bacteriana.

1.2. Administración de compuestos

En ambos estudios, la generación del modelo de estimulación inmunitaria materna se produjo mediante la administración de Poly I:C (4 mg/kg) (P0913. Lote 096M4023V, Sigma-Aldrich, Alemania.) a un grupo de ratas Wistar gestantes, a través de la vena lateral de la cola, en el día 15 de gestación. Otro grupo de animales recibió la misma dosis de suero salino como control. Las inyecciones se realizaron con los animales previamente anestesiados con sevoflurano (3%, inducción; 1.5%, mantenimiento en O₂ al 100%). Todos los análisis y valoraciones posteriores se llevaron a cabo en 2 ó 3 machos de cada una de las camadas resultantes, seleccionados aleatoriamente tras el destete (día 21 tras el nacimiento).

En el Estudio I, la N-acetilcisteína, el ácido graso omega-3, la minociclina y el suero salino (grupo control) se administraron diariamente durante la periadolescencia (del día 35 al 49 tras el nacimiento). La N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich, A9165) se administró por vía intraperitoneal (150 mg/kg/día). El ácido graso omega-3 (Laboratorios KAL, 340 mg/ml) se administró mediante una sonda gástrica, por vía oral (0.80 g/kg/día). Por último, la minociclina (Sigma, M9511) se administró por vía intraperitoneal (30 mg/kg/día). De este modo, los animales de este estudio se dividieron en 8 grupos según su fenotipo (Salino - **Sal** o Poly I:C - **MIS**) o el tratamiento administrado (N-acetilcisteína - **NAC**, ácido graso omega 3 - **OM3**, minociclina - **MIN**, o salino - **VH**).

En el Estudio II, se administró la N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich, A9165) (500 mg/kg) diluida en el agua de la bebida en dos ventanas temporales durante la gestación: durante toda la gestación (21 días) o desde la inyección intravenosa del Poly I:C o el suero salino hasta el momento del parto (del día 15 al 21; 7 días). Además, se realizó un control de la ingesta de agua de todos los animales para calcular la dosis ingerida de NAC para cada uno de ellos. La dosis de NAC ingerida por cada animal fue similar en todos los grupos (dosis mínima: 518 mg/kg, dosis máxima: 552 mg/kg). Los animales de este estudio se dividieron en 6 grupos de acuerdo a su fenotipo (Salino - **Sal** o Poly I:C - **MIS**) o al tratamiento recibido (NAC durante 7 días - **NAC7d**, NAC durante 21 días - **NAC21d** o agua - **VH**).

1.3. Pruebas de comportamiento

Se realizaron tres pruebas de comportamiento: la prueba de inhibición prepulso (PPI), el laberinto en T y el laberinto en cruz elevado. Mientras que el PPI fue común a ambos estudios, el laberinto en T y el laberinto en cruz elevado se realizaron únicamente en el Estudio II.

1.3.1. Prueba de inhibición del prepulso

La inhibición del prepulso de la respuesta al sobresalto (PPI) es una reducción de la magnitud del sobresalto cuando un estímulo potencialmente sorprendente es precedido por otro estímulo más débil y no sorprendente. En la prueba de la PPI se mide el porcentaje de inhibición del sobresalto frente a un estímulo acústico imprevisto, precedido por otro estímulo acústico de menor intensidad. Para la medición del PPI se utilizó el sistema de Respuesta Startle junto con el software MONRS de cuantificación, todo ello de CIBERTEC, España.

La prueba de inhibición del prepulso (PPI) se realizó en el día 70 (edad adulta temprana). Los animales se introdujeron en la cámara, donde permanecieron durante 10 minutos, con ruido blanco de fondo (70 dB), como forma de aclimatación a la cámara. Tras este periodo de tiempo, se produjo una secuencia de 5 estímulos (pulso principal, 120 dB). Después, los animales fueron expuestos a 10 secuencias de estímulos que constaron, en este orden, del pulso principal (120 dB), el pulso principal (120 dB) precedido por tres prepulsos de diferente intensidad (74, 80 y 86 dB) y un control negativo sin estímulo acústico, en el que sólo sonaba el ruido blanco de fondo. Finalmente, se produjo de nuevo una secuencia de 5 pulsos principales de 120 dB. Los prepulsos y el pulso principal tuvieron una duración de 40 milisegundos y el intervalo entre prepulso y pulso fue de 100 milisegundos. El intervalo entre pulsos varió aleatoriamente entre 10 y 20 segundos, con el objeto de evitar la habituación de los animales.

1.3.2. Laberinto en T

La prueba del laberinto en T se emplea para evaluar funciones cognitivas como la memoria de trabajo en roedores. El laberinto (CIBERTEC, España) consta de dos brazos perpendiculares que se cruzan formando una T. El brazo principal mide 50 cm, mientras que los laterales, 40 cm. El ancho en todo el laberinto es de 10 cm y la altura, de 20 cm.

Para la realización de la prueba, se colocó al animal en el extremo del brazo de salida, de cara a la pared. Después de 30 segundos de habituación, se levantó la compuerta que separaba el brazo de salida de los dos brazos laterales. Tras la elección de uno de los dos brazos por parte del animal, se colocó la compuerta en este brazo, impidiendo la salida del animal, y permitiendo la exploración exclusiva de ese brazo durante 20 segundos. Este protocolo se repitió 5 veces para cada animal, dejando 5 minutos de intervalo entre prueba y prueba. Entre cada uno de los ensayos, el laberinto se limpió con una solución de ácido acético al 0.1% para evitar cualquier rastro de olor.

Cada uno de los intentos sucesivos fue grabado con una cámara de vídeo (Panasonic, HC-V180) colocada en un sistema de sujeción anclado al techo de manera perpendicular al laberinto para su posterior análisis y cuantificación.

1.3.3. Laberinto en cruz elevado

La prueba del laberinto en cruz elevado se utiliza para evaluar los niveles de ansiedad en roedores. El laberinto (CIBERTEC, España) consta de dos brazos perpendiculares de igual tamaño que se cruzan formando una cruz. Ambos brazos se encuentran situados a una altura de 50 cm sobre el suelo y, mientras que uno de ellos está rodeado (con excepción de la zona central) de paredes de 40 cm de alto (brazo cerrado), el otro no cuenta con paredes (brazo abierto).

Los animales del Estudio II realizaron la prueba del laberinto en cruz elevado el día 85. Para ello, se colocó al animal en la intersección entre los brazos cerrados y los abiertos (zona neutra), siempre mirando en posición opuesta a la que se encontraba el operador. El animal permaneció en el laberinto un periodo de 5 minutos. Se limpió el laberinto con una solución de ácido acético al 0.1% entre animal y animal.

Cada uno de los intentos sucesivos fue grabado con una cámara de vídeo (Panasonic, HC-V180) colocada en un sistema de sujeción anclado al techo de manera perpendicular al laberinto para su posterior análisis y cuantificación.

1.4. Pruebas de imagen

Los estudios de neuroimagen se realizaron en el día 120 (edad adulta), con el objetivo de realizar una valoración del estado morfométrico (a tres niveles: imagen en T2 para volumetría, imagen por difusión (DTI) y espectroscopía (MRS)) y metabólico (imagen PET) del cerebro.

1.4.1. Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y Tomografía Computarizada (CT)

Los animales se anestesiaron mediante sevoflurano inhalado. Después, se les inyectó vía intravenosa 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa (¹⁸FDG), un radiotrazador de uso frecuente en clínica para evaluar el metabolismo de la glucosa. 45 minutos después de la exposición a la ¹⁸FDG, los animales se escanearon durante otros 45 minutos en un escáner PET/CT ARGUS para pequeño animal (SEDECAL, España).

Las imágenes de PET se reconstruyeron con un algoritmo 2D-OSEM (234) (1.45 mm FWHM, tamaño de vóxel de $0.3875 \times 0.3875 \times 0.775 \text{ mm}^3$, ventana de energía de 400–700 keV) y corregidas para el decaimiento y el tiempo muerto.

Las imágenes de CT se adquirieron con el mismo escáner mencionado antes, con los siguientes parámetros: 340 mA, 40 KV, 360 proyecciones, 8 disparos y resolución de 200 μm . Las imágenes se reconstruyeron mediante un algoritmo Feldkamp (tamaño de vóxel isotrópico = 0.121 mm) (235).

1.4.2. Imagen por resonancia magnética (MRI)

Los animales, previamente anestesiados con sevoflurano inhalado, se escanearon mediante un escáner Biospec 70/20 de 7T con antena de volumen y superficie específicas para rata (Bruker, Alemania).

Para los análisis de volumetría y morfometría cerebral, se adquirieron imágenes coronales ponderadas en T2 con los siguientes parámetros: TE = 33 milisegundos, TR = 3732 milisegundos, 2 repeticiones, anchura de corte = 0.4 mm. El tamaño de la matriz fue 256×256 vóxeles y el tamaño de campo (FOV), $3.5 \times 3.5 \text{ cm}^2$.

Para los estudios de DTI, se realizó una secuencia SE-EPI (TR = 2000 milisegundos, TE = 26.55, 3 repeticiones), con gradientes de difusión aplicados en 27 direcciones (valor $b = 1000 \text{ segundos/mm}^2$). Se adquirieron 35 cortes cerebrales, con un grosor de 0.4 mm. El tamaño de la matriz fue 128×128 vóxeles y el tamaño de campo (FOV), $35 \times 35 \text{ mm}$.

Por último, los estudios de ^1H -MRS se adquirieron con una secuencia PRESS mono-vóxel (TR = 2500 milisegundos, TE = 16.5, puntos de adquisición = 2048, ancho de banda de la adquisición = 3301.06 Hz), siendo la corteza frontal y el hipocampo dorsal las regiones cerebrales de interés. El volumen del vóxel en cada una de las dos áreas fue de 1.5 mm^3 , ajustándose a la estructura anatómica. Se adquirieron 128 repeticiones con supresión de la señal de agua y, además, se adquirió también una imagen sin supresión de agua como ajuste interno, de cara a la cuantificación de los resultados.

1.5. Determinaciones bioquímicas

La valoración de los marcadores bioquímicos de estrés oxidativo e inflamación se realizó en cuatro regiones del cerebro, previamente congelado a -80°C tras su extracción: amígdala, hipocampo, corteza prefrontal y caudado-putamen.

1.5.1. Western-Blot

A partir de los extractos citosólicos de las regiones cerebrales de interés, se midió la expresión de dos mediadores proinflamatorios (iNOS y COX2) y antioxidantes (KEAP1, HO1, NQO1) (236). Los niveles de proteínas se midieron mediante el método de Bradford.

Las proteínas se cargaron en el gel de electroforesis de poliacrilamida y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μm (BIORAD) con un sistema de transferencia semi-seco. Se bloqueó la membrana con suero fetal bovino (BSA) (Sigma, España) al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se incubaron durante la noche con anticuerpos anti-iNOS de conejo (sc-650, 1:750 BSA 2%; SCBT), anti-COX2 de cabra (sc-1747, 1:750 BSA 2.5%; SCBT), anti-KEAP1 de ratón (MAB3024, 1:1000; R&D), anti-HO1 de conejo (ab68477, 1:1000; Abcam), anti-NQO1 de cabra (sc16464, 1:750 BSA 1%; SCBT) y anti- β -actina de ratón (A5441, 1:10.000; Sigma). Los anticuerpos primarios se incubaron durante 1.5 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano. La unión de las proteínas con sus respectivos anticuerpos se detectó mediante el Sistema Fc Odyssey (LI-COR, Alemania). Todos los western-blots se realizaron al menos 3 veces en ensayos diferentes.

1.5.2. Peroxidación lipídica (MDA)

La peroxidación lipídica se determinó mediante el test del ácido tiobarbitúrico para malondialdehído (MDA) siguiendo las instrucciones detalladas por el fabricante, así como en el protocolo de Das & Ratty (237).

1.5.3. Actividad del factor nuclear derivado de eritroide 2 (NRF2)

La actividad del factor nuclear derivado de eritroide 2 (NRF2), una molécula implicada en la neutralización de radicales libres prooxidantes, se midió a partir de extractos nucleares derivados de tejido cerebral mediante un kit comercial basado en la técnica del ELISA (600590, Cayman Chemical, Estonia).

1.5.4. Actividad enzimática antioxidante y niveles de glutatión

Las muestras de tejido cerebral se sonicaron en 400 μl de una solución de suero salino-fosfato (pH = 7) con varios inhibidores de la proteasa (Complete-Roche). Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C. En

los sobrenadantes resultantes se determinó la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) (K028-H1, Arbor Assay, EEUU), catalasa (CAT) (K033-H1, Arbor Assay, EEUU), glutatión peroxidasa (GPx) (703, 102, Cayman Chemical, Estonia), así como los niveles de glutatión (GSH) (K006-H1, Arbor Assay, EEUU).

1.6. Análisis de la microbiota fecal

El análisis de la microbiota fecal se realizó con el objetivo de evaluar los taxones bacterianos diferenciales entre los distintos grupos.

A partir de 200 mg del contenido fecal de cada ciego, previamente congelado a -80°C, se realizó la extracción de 200 µl de ADN genómico (ADNg) usando el Kit E.Z.N.A.®DNA Stool (Ref. D4015-02, VWR, Madrid, España). Las muestras de ADNg se cuantificaron mediante un BioPhotometer® (Eppendorf, Madrid, España) y sus concentraciones se diluyeron a 6 ng/µl. Las muestras diluidas se emplearon para amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo el protocolo del kit Ion 16™ Metagenomics (Thermo Fischer Scientific, Madrid, España) (238).

Los productos de amplificación de la PCR se utilizaron para crear una librería, mediante el kit Ion Plus Fragment Library para el sistema AB Library Builder™ (Cat. No. 4477597, Thermo Fischer Scientific, Madrid, España) con indexación de las muestras realizado mediante el kit Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-96 (Cat. No. 4474517, Thermo Fischer Scientific, Madrid, España). La preparación del template se realizó a partir del Sistema ION One Touch™ 2 y del kit ION PGM™ Hi-Q™ OT2 (Cat. No. A27739, Thermo Fischer Scientific, Madrid, España). Después, se realizó la secuenciación metagenómica mediante el kit ION-PGM™ Hi-Q™ Sequencing (Cat. No. A25592, Thermo Fischer Scientific, Madrid, España) en el sistema ION PGM™. Los chips empleados fueron el ION 314™ v2, 316™ v2 y 318™ v2 (Cat. No. 4482261, 4483188, 4484355, Thermo Fischer Scientific, Madrid, España), con varias muestras codificadas por cada chip.

1.7. Procesamiento y cuantificación de los datos

1.7.1. Cuantificación y análisis de las pruebas de comportamiento

Para la prueba del PPI, se calculó el porcentaje de inhibición prepulso de la respuesta al sobresalto mediante la siguiente fórmula:

$$100 - \left(\frac{\text{prepulso} + \text{pulso}}{\text{pulso}} \times 100 \right)$$

“Prepulso + Pulso” hace referencia a la respuesta de sobresalto de los 10 ensayos del PPI para cada intensidad, mientras que “Pulso” indica la respuesta de sobresalto frente a los 10 pulsos principales de los 10 ensayos.

Para la prueba del laberinto en T, se cuantificó el número de alternancias entre brazo izquierdo y derecho en ensayos consecutivos. Además, se midió el tiempo que el animal empleó realizando actividades de acicalamiento (grooming), o en estado de congelamiento (freezing).

Por último, para la prueba del laberinto en cruz elevado, se cuantificaron el número de entradas en brazos cerrados y en brazos abiertos y el número de veces que el animal se asomó fuera del laberinto en los brazos abiertos. También se midieron el tiempo en brazos cerrados y en brazos abiertos, así como el empleado realizando actividades de acicalamiento o en congelamiento.

1.7.2. Cuantificación y análisis de las pruebas de imagen

1.7.2.1. Tomografía por emisión de positrones (PET)

El post-procesamiento y la normalización en intensidad de las imágenes de PET se realizaron como se describe en (234). Todas las imágenes de PET se registraron al mismo espacio estereotáctico, una imagen CT de referencia obtenida a partir de las imágenes CT individuales de cada animal, usando los algoritmos descritos en (234) mediante el software Multimodal Workstation (MMWKS). La finalidad de este tratamiento de las imágenes fue posibilitar la realización de un estudio comparativo vóxel a vóxel de las imágenes, asegurando así la colocalización de cada vóxel en todas las imágenes (Figura 2.2.).

Figura 2.2.

Procesamiento de imágenes PET: registro espacial rígido

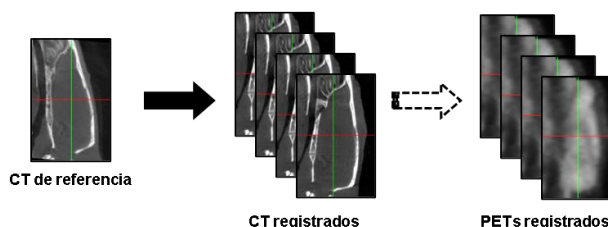


Fig. 2.2. Las imágenes CT obtenidas se registraron al mismo espacio que un CT de referencia. Después, cada imagen de PET se registró a su CT pre-registrado, usando para ello registro rígido basado en información mutua.

Las imágenes registradas se suavizaron con un filtro Gaussiano isotrópico de FWHM (Full Width Half Maximum) de 2.5 mm, y se enmascararon mediante la aplicación de una máscara de cerebro completo realizada a partir de una imagen de RM, con el objetivo de eliminar los vóxeles extracerebrales. Finalmente, se realizó una normalización en intensidad usando el método *data-driven* descrito en (239). Esta estrategia, basada en una metodología iterativa, se efectuó normalizando en intensidad a un grupo de vóxeles de regiones cerebrales que no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

1.7.2.2. Imagen por Resonancia Magnética (MRI)

1.7.2.2.1. Análisis de la morfometría vóxel a vóxel y de la volumetría en imágenes T2

Las imágenes de RM ponderadas en T2 se emplearon para realizar un análisis de la morfometría cerebral basada en vóxel (VBM), así como un análisis volumétrico a partir de la segmentación de regiones de interés (ROIs).

Para el análisis de morfometría basada en vóxel (VBM), se siguió el protocolo previamente descrito en (240) y que se puede ver, resumido, en la Figura 2.3. Brevemente, las imágenes en T2 se corrigieron usando un algoritmo de campo N4 y redimensionadas con un factor de escala de 10. Después, usando el software SPM, las imágenes se alinearon al atlas para cerebro de rata Wistar de Valdés–Hernández (241) y se recortaron al espacio del template (vóxel isotrópico de 1.25 mm). Los datos obtenidos se utilizaron después para crear un template específico para rata usando el script de ANTs de construcción de templates con el template previo de cerebro de rata Wistar (241). Este template nuevo se realineó al template original de Valdés–Hernández y, posteriormente, las imágenes recortadas se normalizaron al template customizado usando herramientas de registro optimizadas de ANTs. Una vez tuvimos todas las imágenes en el espacio del template de rata Wistar, se segmentaron la sustancia gris (Grey matter, “GM”), sustancia blanca (White matter, “WM”) y líquido cefalorraquídeo (Cerebrospinal Fluid, “CSF”) usando para ello herramientas de SPM y tomando como base mapas probabilísticos procedentes del atlas de rata Wistar. Después, las imágenes segmentadas se modularon usando los determinantes Jacobianos de la normalización espacial. Finalmente, las imágenes ya moduladas se suavizaron con un filtro Gaussiano isotrópico de 10 mm de FWHM de cara a ser usadas en los análisis estadísticos.

Para el análisis de ROIs, primero se registraron las imágenes T2 a un mismo espacio estereotáctico, como se ha descrito para las imágenes PET, usando el software Multimodal Workstation (MMWKS). Después, se realizó la segmentación manual de 6 ROIs de interés comunes en el Estudio I y en el Estudio II: cerebro completo, corteza prefrontal, corteza completa, hipocampo, ventrículos y cerebelo. Además, en el Estudio

Il se realizó también la segmentación manual del cuerpo calloso, por su interés en el estudio de los cambios volumétricos ocurridos en éste área y su comparación con los estudios de DTI.

Figura 2.3.

Diagrama de flujo del procesado de imágenes estructurales para el análisis de VBM

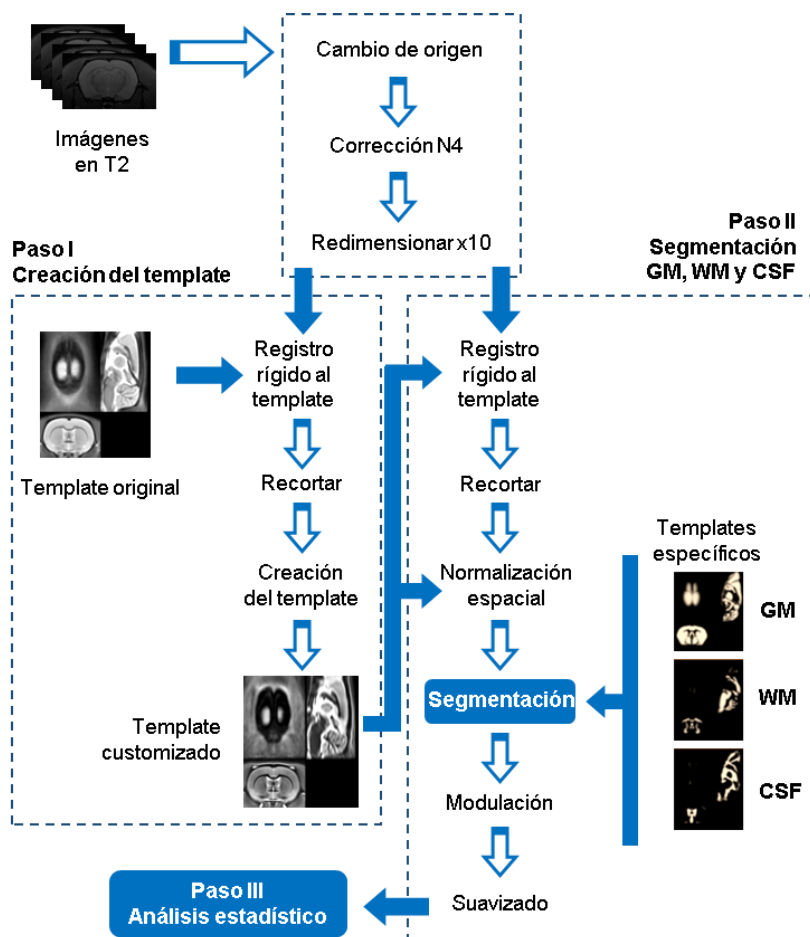


Fig. 2.3. Las imágenes T2 fueron preprocesadas y registradas a un template original (241). A partir de éstas, se creó un template customizado para cada imagen. Las imágenes preprocesadas previas se sometieron a un registro rígido y a una normalización espacial usando este template como base. Después se obtuvo, para cada una de las imágenes, un mapa probabilístico concreto de sustancia gris (GM), sustancia blanca (WM) y líquido cefalorraquídeo (CSF). Estas imágenes se modularon y suavizaron para realizar, posteriormente, los análisis estadísticos correspondientes a partir de ellas.

1.7.2.2.2. Análisis de la fracción de anisotropía y la difusividad media en imágenes de DTI

A partir de las imágenes de DTI, se analizaron la **fracción de anisotropía (FA)** y la **difusividad media (MD)** en tres regiones cerebrales: cuerpo calloso, corteza prefrontal e

hipocampo. Para ello, se realizó la segmentación manual de las tres regiones en los mapas paramétricos correspondientes utilizando el software ImageJ (FIJI).

1.7.2.2.3. Análisis de metabolitos de interés a partir de imagen de MRS

Las imágenes de espectroscopía (ejemplo en la Figura 2.4.) se analizaron usando el software LCModel, que calcula el mejor ajuste de nuestras imágenes a otras imágenes de espectroscopía modelo (espectros de metabolitos) mediante una combinación lineal. En este set, incluimos 19 potenciales metabolitos: alanina (Ala), aspartato (Asp), creatina (Cr), ácido gamma-aminobutírico (GABA), glicina (Gly), glucosa (Glc), glutamato (Glu), glutamina (Gln), glutatión (GSH), glicerofosocolina (GPC), guanidoacetato (Gua), fosfo-rocolina (PCh), mio-inositol (mIns), lactato (Lac), N-acetilaspártato (NAA), N-acetil-aspartilglutamato (NAAG), fosfocreatina (PCr), escilo-inositol (eIns) y taurina (Tau). También se incluyen los espectros de distintos lípidos (Lip) y macromoléculas (MM). No obstante, solamente aquellos metabolitos con una **Cota Inferior de Cramer-Rao (CRLB) menor del 20%**, que corresponde con el error estimado de concentración (0.2 mmol/g), se incluyeron en el análisis cuantitativo. En algunos casos, los metabolitos con resonancia solapada se muestran como la suma de ambos metabolitos.

Figura 2.4.

Ejemplo de espectro obtenido mediante el software de análisis LCModel

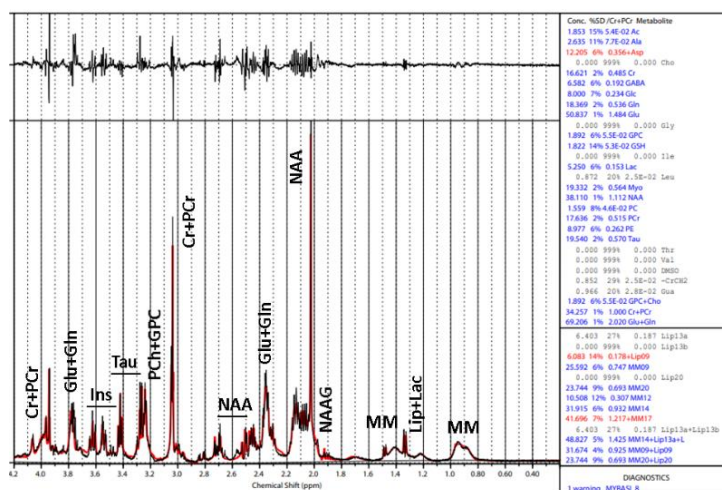


Fig. 2.4. Imagen de espectroscopia obtenida con LCModel, con algunos de los picos más destacados rotulados con su pico correspondiente.

1.7.3. Cuantificación y análisis de marcadores bioquímicos

Las imágenes digitales de los Western Blots se analizaron mediante densitometría (ImageJ, NIH). Los valores se normalizaron al control de carga (β -actina) y se expresaron

como porcentaje de variación respecto a este control. Los datos de los ensayos de actividad enzimática se normalizaron al contenido en proteína de cada muestra. Los resultados se expresaron en U/mg de proteína en el caso de las enzimas y en $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína en el caso del GSH.

1.7.4. Análisis filogenético de la microbiota fecal

Para la realización de los análisis filogenéticos se utilizó el software ION Reporter (versión 5.6, Life Technologies Holdings Pte Ltd, Singapur), que incluye los porcentajes de cada taxón bacteriano para cada secuenciación metagenómica, lo que permitió comparar frecuencias entre ratas individuales y grupos. Los análisis se llevaron a cabo mediante el software QIIME-2 (242).

1.8. Análisis estadístico y representación de los datos

Los análisis estadísticos de los estudios vóxel a vóxel (PET y RM) se efectuaron usando el software estadístico SPM12 (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Cognitive Neurology, Londres, Reino Unido). Los grupos se compararon usando un ANOVA de 2 vías. Para el caso de las imágenes de PET, los resultados se obtuvieron estableciendo un umbral de $p_{\text{unc}} < 0.05$ de significación a nivel de vóxel y de cluster (número de vóxeles por cluster $[k] > 50$). Para el caso de las imágenes de RM, los resultados se obtuvieron estableciendo un umbral de $p_{\text{unc}} < 0.01$ de significación a nivel de vóxel, corregida a nivel de cluster mediante FDR ($k > 1000$).

Para el resto de análisis de imagen, los análisis de las pruebas de comportamiento y de los marcadores bioquímicos, se realizaron ANOVAs de 2 vías (excepto la prueba del PPI –ANOVA de medidas repetidas–), seguidos del test *post-hoc* de Bonferroni. Previamente, se realizó la comprobación de la normalidad y la homocedasticidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente. Aquellos datos no normales u homocedásticos fueron sometidos a transformaciones para alcanzar la normalidad o la homocedasticidad. En aquellos parámetros que tras las transformaciones no alcanzaron valores normales ni homocedásticos fueron analizados mediante el test de Kruskal–Wallis (KW) y el test *post-hoc* de Dunn. Además, estos tests fueron utilizados en todos los análisis de microbiota por presentar mayoritariamente distribuciones no normales. Los datos se representaron como promedio \pm SEM. Para el análisis estadístico se empleó el software estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics 20), mientras que para la representación gráfica de los datos se usó el software GraphPad Prism (versión 7, GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU).

2. Estudio III: Análisis bioinformático de fármacos con uso potencial en el tratamiento de la esquizofrenia

2.1. Definición de las firmas transcripcionales asociadas a esquizofrenia

Las firmas transcripcionales relacionadas con esquizofrenia se definieron a partir de datos de RNA-seq de cinco estudios diferentes previamente publicados: el primero, un estudio *in vitro*, en el que células microgliales en cultivo se expusieron a Poly I:C (243). El segundo, un análisis a partir de la microglía extraída del cerebro de ratas de un modelo de MIS inducido con Poly I:C similar al utilizado por nosotros en los estudios I y II (244). Los tres estudios restantes se realizaron a partir de muestras clínicas procedentes de la corteza dorsolateral frontal (DLPFC) de pacientes con esquizofrenia (245–247). Para la definición de las firmas transcripcionales se utilizaron los 50–100 genes más upregulados en los pacientes con esquizofrenia, en comparación con los sujetos sanos, siguiendo las pautas preestablecidas por estudios precedentes (248).

2.2. Cálculo de los “scores” de similitud utilizando el Connectivity Map (CMap)

Las firmas transcripcionales asociadas a esquizofrenia, previamente definidas, se utilizaron como input en la herramienta de consulta (“query”) del software Connectivity Map (CMap) (<https://clue.io>), con el objetivo de obtener “scores” de similitud con las firmas transcripcionales ya contenidas en el CMap de fármacos, categorías de CMap y sobreexpresión y depleción de genes (249). Los parámetros utilizados fueron “Gene expression (L1000)”, “Touchstone”, “individual query”, “version 1.0” y “compute with sig_fastgutc_tool”. Los “scores” se descargaron como un archivo de texto (.txt) sobre el que se realizaron los análisis posteriores en Microsoft Excel (Versión 2202). Específicamente, los resultados de fármacos y categorías de CMap se filtraron en base a su “score”, con especial interés en los “scores” más negativos (de una escala del –100 al 100), ya que representan aquellos fármacos y categorías con una firma transcripcional opuesta a la de esquizofrenia y, por tanto, se podrían relacionar con un perfil reversor. Se consideraron como “scores” significativamente negativos aquellos entre –90 y –100.

2.3. “Drug Set Enrichment Analysis”

Para realizar el análisis, se utilizó el método de “gene set enrichment analysis” (análisis de enriquecimiento de un set de genes) o GSEA implementado en el paquete de R *fgsea* (250), de manera similar a la descrita en estudios previos (248,251), modificado para producir un “drug set enrichment analysis” (análisis de enriquecimiento de un set de fármacos) o DSEA. Las familias de fármacos se definieron en base a su mecanismo de

acción, cuya anotación estaba incluida en la categoría de descripción del archivo descargado del CMap. El análisis computacional se realizó mediante R (versión 3.6.3, 2020-02-29). Una muestra del código empleado se puede ver en el Anexo A.

-3-

RESULTADOS

1. Estudio I: Tratamiento preventivo con NAC, omega-3 o minociclina durante la periadolescencia

1.1. Inhibición del prepulso

Como primer paso tras el tratamiento preventivo con los tres compuestos durante la periadolescencia, procedimos a evaluar la respuesta de inhibición prepulso de los animales (Figura 3.1.).

Figura 3.1.

Cambios conductuales valorados mediante la prueba de la inhibición prepulso

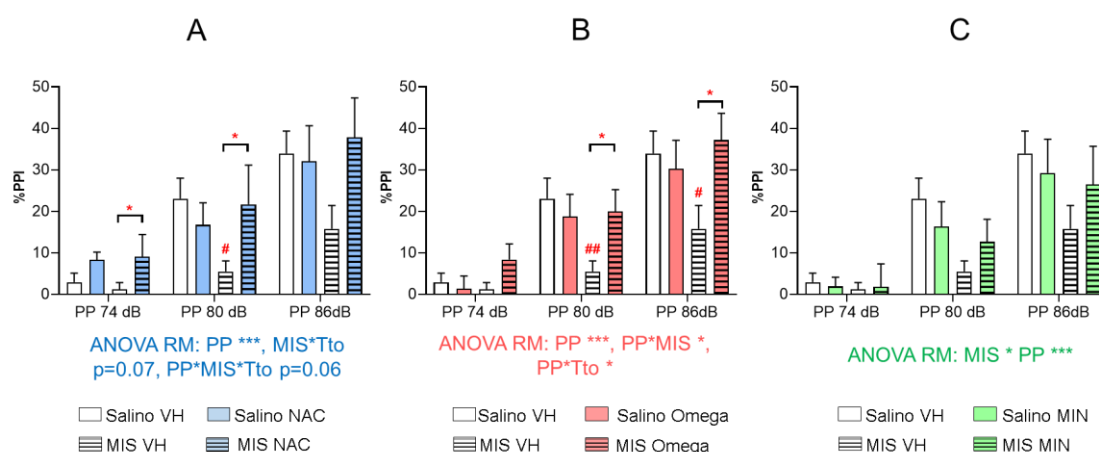


Fig. 3.1. Representación del porcentaje de inhibición prepulso (PPI) y el efecto de la N-acetilcisteína (A), los ácidos omega-3 (B) y la minociclina (C) en los animales control (Salino) y en los animales del modelo inducido por Poly I:C (MIS). Cada columna representa la media \pm SEM de la PPI (%) para la intensidad de cada prepulso (PP 74, 80 y 86 decibelios) de 6-13 animales (Salino VH 11, Salino NAC 8, Salino Omega 10, Salino MIN 6, MIS VH 13, MIS NAC 7, MIS Omega 10, MIS MIN 6). Debajo de cada Figura se muestran los resultados significativos, o cerca de la significación estadística, del análisis del ANOVA de medidas repetidas. PP: Prepulso. MIS*Tto: interacción entre los factores MIS y tratamiento. PP*MIS: interacción entre los factores prepulso y MIS. PP*Tto: interacción entre los factores prepulso y tratamiento. PP*MIS*Tto: interacción entre los factores prepulso, MIS y tratamiento [$*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$]. Sobre las columnas se muestran los resultados del test post-hoc de Bonferroni [$\# p < 0.05$, $## p < 0.01$ vs. Salino VH; $* p < 0.05$ vs. MIS VH].

Los resultados mostraron la disminución de la inhibición prepulso en los animales MIS, si bien los análisis estadísticos no fueron estadísticamente significativos en el caso de la comparativa con la minociclina, aunque se observa la misma tendencia (Fig. 3.1C). En todos los casos, el tratamiento con cualquiera de los tres compuestos previno este

déficit, si bien, en el caso de la minociclina, ésta fue únicamente parcial y sin llegar a alcanzar los valores de los animales control ni la significación estadística en el test post hoc de Bonferroni para ninguno de los tres prepulsos. En el caso de los animales tratados con NAC (**Figura 3.1A**) y con omega-3 (**Figura 3.1B**), la prevención sí fue completa, alcanzando valores similares a los de los animales sanos. Por último, los animales control tratados con los tres compuestos no mostraron prácticamente diferencias con los animales sin tratar, salvo en el caso de los que recibieron minociclina, que registraron una leve disminución, si bien ésta no fue estadísticamente significativa.

1.2. FDG-PET y metabolismo de glucosa cerebral

Tras la realización de la prueba de inhibición prepulso, ya en edad adulta, evaluamos el metabolismo cerebral de glucosa mediante ^{18}F FDG-PET como medida indirecta de la actividad cerebral. En la **Figura 3.2.** se muestran los resultados más significativos. Los resultados completos se muestran en el Anexo B.

Figura 3.2.

Cambios en el metabolismo cerebral de glucosa medidos mediante ^{18}F FDG-PET

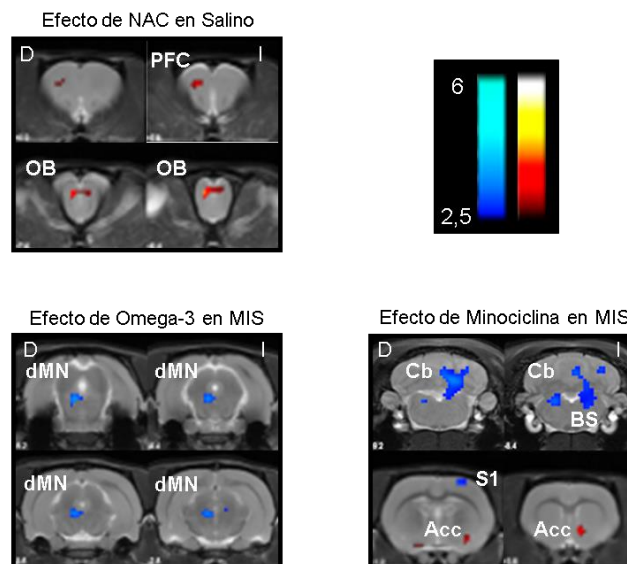


Fig. 3.2. La figura muestra los cambios más destacados en el metabolismo de glucosa derivados del tratamiento con NAC, Omega-3 y minociclina. Concretamente, se muestra el efecto de la NAC en los animales Salino, así como el de los Omega-3 y la minociclina en los animales del modelo MIS. Las imágenes PET se representan sobre una imagen de resonancia magnética para facilitar la localización de los cambios y muestran el incremento (rojo) o la disminución (azul) de la captación de glucosa a consecuencia de los distintos tratamientos. Las barras de colores representan los valores de T. Abreviaturas.: Acc: núcleo accumbens, BS: tronco cerebral, Cb: cerebelo, D: derecha, dMN: núcleo mesencefálico profundo, I: izquierda, OB: bulbo olfatorio, PFC: corteza prefrontal, S1: corteza somatosensorial primaria.

En nuestro modelo no observamos diferencias significativas entre los animales sanos y los patológicos con el umbral estadístico seleccionado. Si hacemos este umbral menos restrictivo ($p < 0.05$) sí observamos, en los animales MIS, una leve disminución del metabolismo cerebelar en el hemisferio derecho, así como un ligero aumento en regiones del hipocampo izquierdo.

A diferencia de lo observado en el modelo, los tratamientos sí variaron en mayor medida el metabolismo cerebral, aunque no a gran escala. Con una $p < 0.01$, la NAC indujo un leve aumento de la actividad cerebral en regiones del bulbo olfatorio y de la corteza prefrontal. No obstante, no hubo cambios significativos en los animales MIS. Por otra parte, tanto el omega-3 como la minociclina no modificaron la actividad cerebral en los animales salino. Sin embargo, en los animales MIS, el omega-3 sí provocó una ligera disminución del metabolismo de la glucosa a nivel mesencefálico; mientras que la minociclina disminuyó considerablemente el metabolismo de glucosa en áreas del cerebelo y del tronco cerebral, así como más levemente en la corteza somatosensorial primaria del hemisferio izquierdo. Además, la minociclina aumentó la actividad metabólica, de manera muy leve, en el núcleo accumbens izquierdo.

1.3. Volumetría y morfometría cerebral mediante imagen por resonancia magnética

1.3.1. Volumetría mediante regiones de interés

Como primera parte del estudio neuroanatómico, evaluamos mediante el estudio de regiones de interés segmentadas manualmente el volumen de cinco regiones cerebrales (corteza completa, corteza prefrontal, hipocampo, ventrículos y cerebelo), así como del cerebro completo.

En primer lugar, atendiendo a las diferencias entre los animales Salino VH y MIS VH, podemos observar cambios aparentes en todas las estructuras. No obstante, el análisis del ANOVA solamente revela un efecto estadísticamente significativo en el **hipocampo** y en los **ventrículos**, que se encuentran reducido y aumentado, respectivamente. El test post-hoc no muestra diferencias en ese sentido, aunque casi corrobora las encontradas en hipocampo, donde casi se roza la significación estadística. Además, el volumen cerebral total parece sufrir una muy leve reducción en los animales MIS, algo observable del mismo modo en la corteza completa, la corteza prefrontal, el cerebelo y, en mayor medida, en el hipocampo. No obstante, salvo en el caso de esta última región, sin significación estadística ni en el caso del ANOVA ni en el caso del test post-hoc de Bonferroni.

El tratamiento con la NAC (Figura 3.3.) no reveló apenas cambios, ni en los animales sanos ni en los patológicos. Como resultado del ANOVA sí encontramos un efecto del tratamiento en el caso del hipocampo. A parte de este cambio, existen tendencias a un incremento de regiones como la corteza prefrontal y el cerebelo en los animales MIS tratados con NAC. De manera opuesta, encontramos una reducción en el volumen del cerebro completo, la corteza total, la corteza prefrontal y el hipocampo en los animales sanos. No obstante, no encontramos un efecto significativo ni de la interacción en la prueba del ANOVA ni de este efecto en los animales Salino como resultado del test post-hoc de Bonferroni.

Figura 3.3.
Efecto de la N-acetilcisteína en la volumetría de seis regiones cerebrales

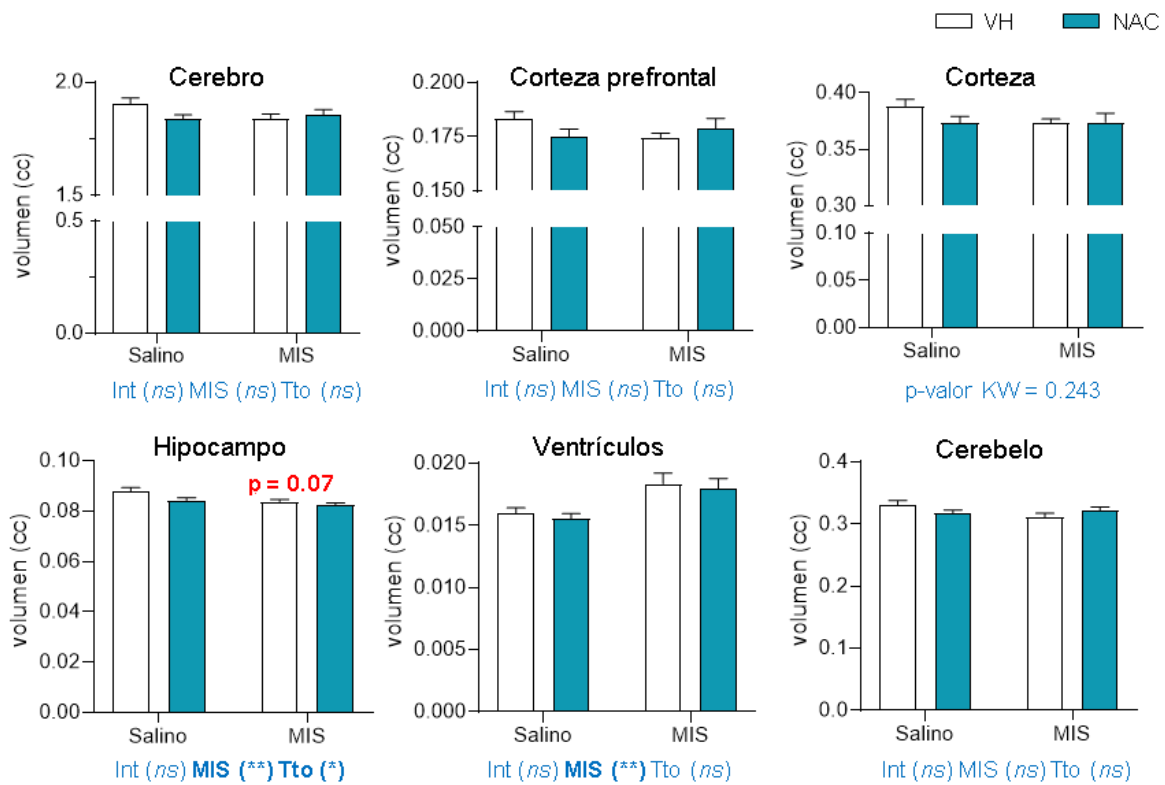


Fig. 3.3. Alteraciones en la volumetría de los animales Salino y MIS tras el tratamiento con NAC (Salino VH 11, Salino-NAC 12, MIS-VH 13, MIS-NAC 14). Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo en cada estructura. Debajo de las gráficas se muestra el resultado del ANOVA de 2 vías para cada estructura normal y homocedástica (Int = efecto de la interacción; MIS = efecto del modelo MIS; Tto = efecto del tratamiento con Omega-3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Los resultados del test post-hoc de Bonferroni se muestran sobre la barra correspondiente ($p = 0.07$ vs. Salino VH). La corteza se analizó mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Los omega-3 (Figura 3.4.) reversion la disminución hipocampal causada por MIS, al aumentar el tamaño de esta región hasta valores próximos a los de los animales control ($p = 0.058$). También en el hipocampo encontramos una interacción en el ANOVA,

producida por este incremento del volumen en los animales MIS tratados y la reducción en los animales Salino también tratados. Además, encontramos un incremento del volumen cerebral, cerebelar y cortical en los animales MIS tratados con omega-3, aunque éste no es significativo ni en el análisis del ANOVA ni de Bonferroni. No hay cambios aparentes en los animales control para ninguna estructura cerebral salvo el hipocampo.

Figura 3.4.

Efecto de los ácidos omega-3 en la volumetría de seis regiones cerebrales

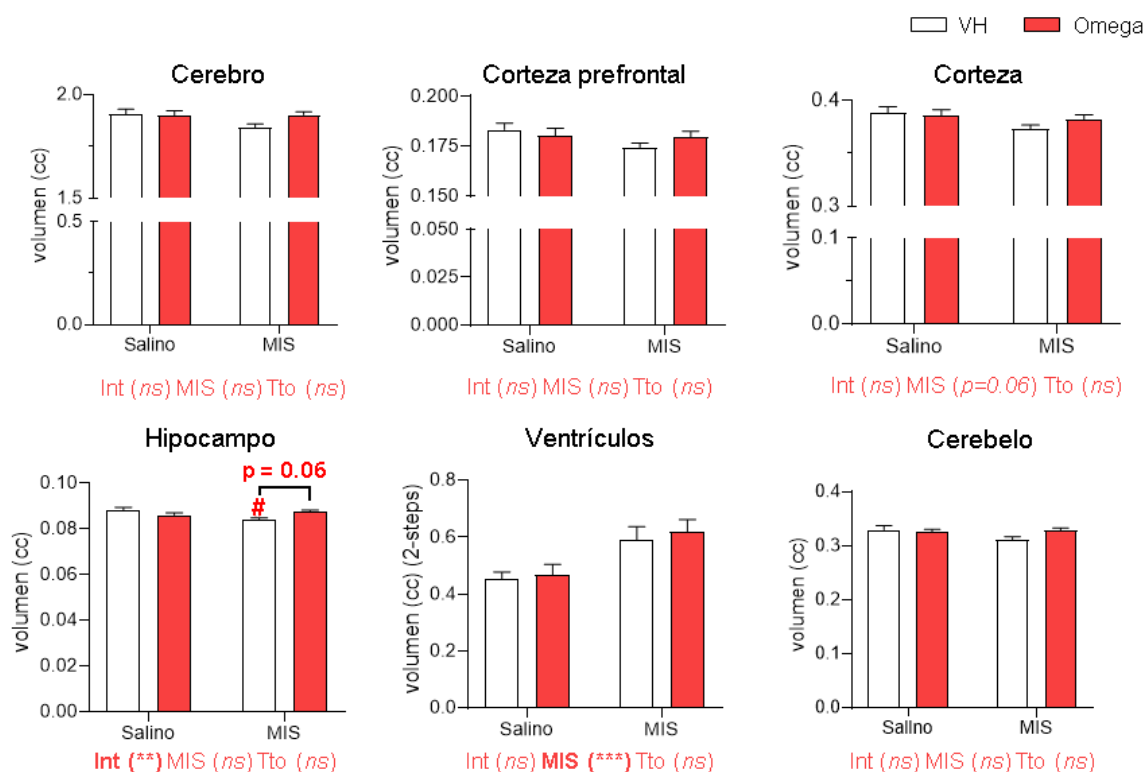


Fig. 3.4. Alteraciones en la volumetría de los animales Salino y MIS tras el tratamiento con Omega-3 (Salino-VH 11, Salino-Omega 12, MIS-VH 13, MIS-Omega 14). Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo en cada estructura. Debajo de las gráficas se muestra el resultado del ANOVA de 2 vías para cada estructura normal y homocedástica (Int = efecto de la interacción; MIS = efecto del modelo MIS; Tto = efecto del tratamiento con NAC; *** $p < 0.001$). Los resultados del test post-hoc de Bonferroni se muestran, en caso de ser significativo, sobre la barra correspondiente (# $p < 0.05$ vs. Salino VH).

Por último, el efecto principal de la **minociclina (Figura 3.5.)** lo encontramos a nivel de la corteza prefrontal, donde es capaz de prevenir la disminución de volumen en los animales del modelo MIS. El análisis del ANOVA no mostró ningún efecto aparente del tratamiento, aunque sí observamos una interacción en el hipocampo, en el mismo sentido que la ya mencionada en los animales tratados con omega-3. Más allá de estos cambios, encontramos tendencias al incremento de volumen en los animales MIS tratados con minociclina en el caso del cerebro y la corteza completos y del cerebelo, aunque en ninguno de los casos esto se ve refrendado por la significación estadística. En los

animales control tampoco observamos ninguna modificación, salvo un leve aumento de los ventrículos, tampoco apoyado en significación estadística.

Figura 3.5.

Efecto de la minociclina en la volumetría de seis regiones cerebrales

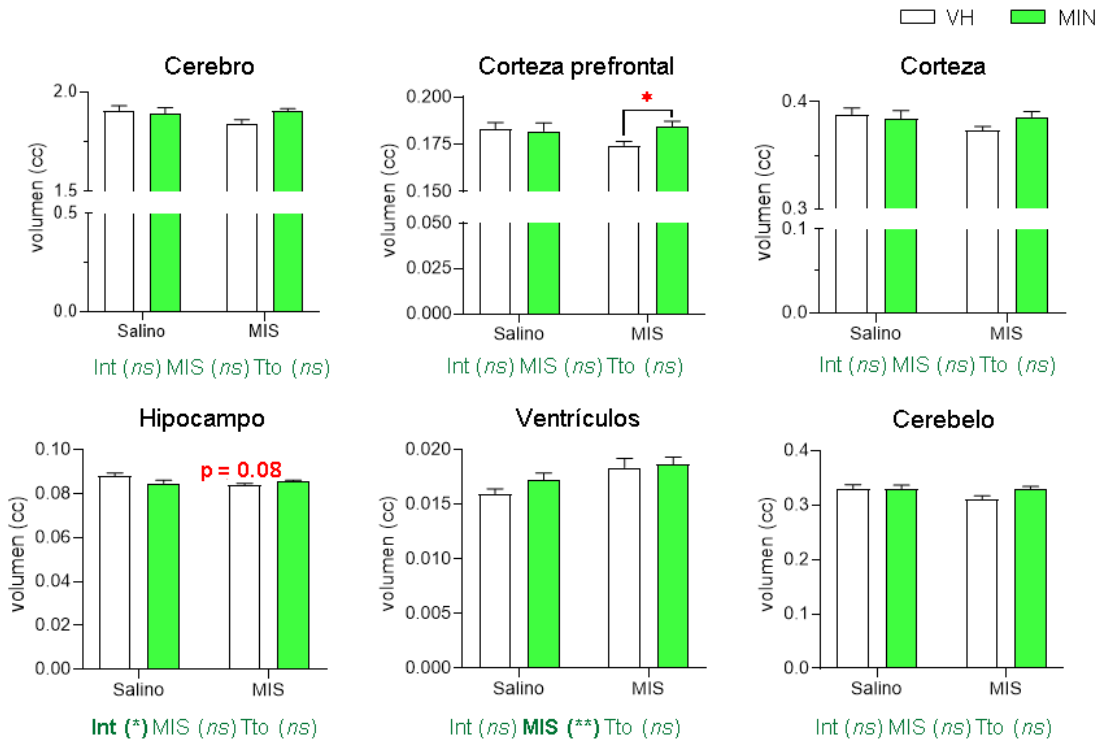


Fig. 3.5. Alteraciones en la volumetría de los animales Salino y MIS tras el tratamiento con minociclina (Salino-VH 11, Salino-Min 12, MIS-VH 13, MIS-Min 14). Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo en cada estructura. Debajo de las gráficas se muestra el resultado del ANOVA de 2 vías para cada estructura normal y homocedástica (Int = efecto de la interacción; MIS = efecto del modelo MIS; Tto = efecto del tratamiento con MIN; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Los resultados del test post-hoc de Bonferroni se muestran, en caso de ser significativo, sobre la barra correspondiente (* $p < 0.05$ vs. MIS VH; $p = 0.08$ vs Salino VH).

1.3.2. Morfometría cerebral basada en vóxel (VBM)

Además del ya citado estudio de las regiones de interés, enfocado en estructuras cerebrales concretas, realizamos otra aproximación a partir de las mismas imágenes de resonancia magnética en T2, basada en la búsqueda automática de alteraciones morfo-métricas en el cerebro, separando entre sustancia gris, sustancia blanca y líquido cefalorraquídeo.

1.3.2.1. Sustancia gris

Los animales MIS no mostraron prácticamente diferencias en regiones de sustancia gris (Figura 3.6. y Anexo C) respecto a los animales control. Únicamente evidenciaron una leve expansión a nivel del hipocampo izquierdo en su parte ventral y en el bulbo olfatorio. No obstante, con un umbral estadístico menos restrictivo ($p < 0.05$ a nivel de cluster) sí observamos una contracción considerable de varias regiones cerebelares y del hipocampo dorsal en ambos hemisferios en los animales MIS, más acorde a lo esperado.

Figura 3.6.

Efecto de la N-acetilcisteína, los omega-3 y la minociclina en la morfometría de la sustancia gris

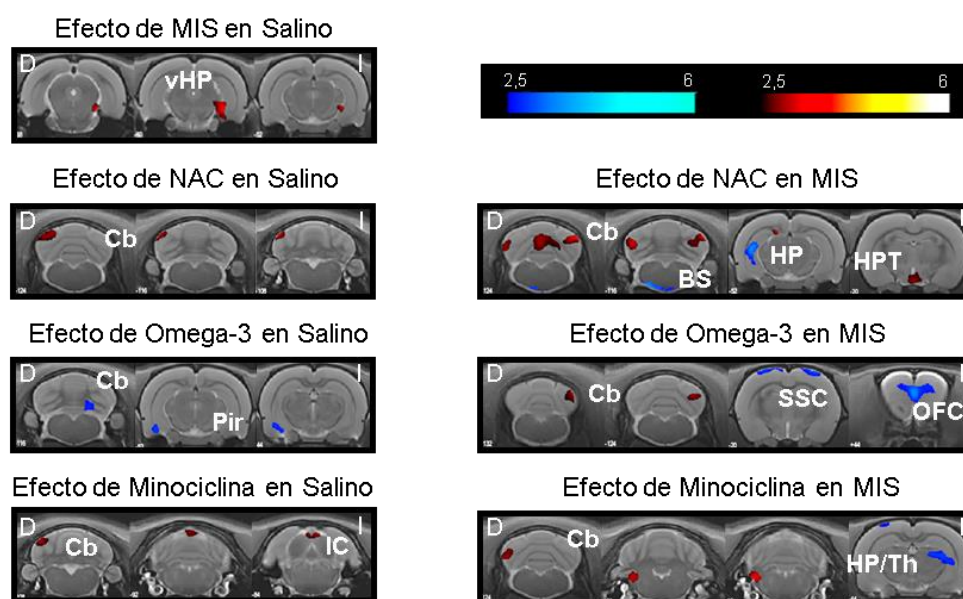


Fig. 3.6. Alteraciones en la morfometría de la sustancia gris causadas por el tratamiento preventivo con NAC, OM3 o MIN (Salino-VH 11, Salino-NAC 12, Salino-Omega 12, Salino-Min 12, MIS-VH 13, MIS-NAC 14, MIS-Omega 14, MIS-Min 14). Los resultados de VBM se muestran como un mapa de T probabilístico representado sobre una imagen de resonancia magnética donde los colores cálidos indican un aumento de la densidad de la sustancia gris y los colores fríos indican una disminución de la misma. Las barras de colores muestran los valores de T. Abreviaturas: BS: tronco cerebral, Cb: cerebelo, D: derecha, HP: hipocampo, HPT: hipotálamo, I: izquierda, IC: colículo inferior, OFC: corteza orbitofrontal, Pir: corteza piriforme, SSC: corteza somatosensorial, Th: tálamo, vHP: hipocampo ventral.

El tratamiento con **NAC** no provocó apenas cambios en los animales Salino, más allá de un leve agrandamiento a nivel cerebelar, alcanzando prácticamente el colículo inferior de ambos hemisferios. En cambio, en los animales MIS sí produjo cambios más notables: de manera considerable, produjo un agrandamiento hipotalámico y de varias regiones del cerebelo y en el colículo inferior, del mismo modo que en los animales salino. Además, NAC causó una leve contracción en el hipocampo derecho, así como en el tronco cerebral. Otros efectos menores aparecen recogidos en el **Anexo C**.

El tratamiento con **Omega-3** no produjo demasiados cambios en los animales Salino, salvo leves contracciones en regiones de pequeño tamaño en la corteza piriforme y el cerebelo. En los animales MIS, los cambios tampoco fueron demasiado significativos. Además del agrandamiento a nivel cerebelar mostrado antes para el tratamiento con NAC, menos marcado en este caso, estos animales evidenciaron una, a priori, inesperada contracción a nivel de la corteza orbitofrontal y de la corteza somatosensorial.

Por último, el tratamiento con **minociclina** durante la adolescencia causó el agrandamiento de regiones cerebelares y del colículo inferior en los animales sanos. En los animales MIS, estos cambios se mantuvieron tras el tratamiento con minociclina, especialmente a nivel del cerebelo, en el hemisferio derecho. Además, estos animales mostraron leves contracciones de áreas corticales, así como en tálamo e hipocampo.

1.3.2.2. Sustancia blanca

Los animales MIS evidenciaron varias reorganizaciones de fibras cerebrales (**Figura 3.7.** y **Anexo C**). A nivel del cuerpo caloso, se observaron diferentes cambios en las fibras en función del hemisferio y de su disposición longitudinal. Así, estos animales presentaron aumentos de la densidad de la sustancia blanca del cuerpo caloso en su parte más rostral y reducciones en la más caudal. Además, el modelo MIS mostró un ensanchamiento a nivel de fibras en regiones hipotalámicas y del tracto espino-cerebelar y una contracción a nivel cerebelar.

El tratamiento con **NAC** produjo una retracción leve de la cápsula externa en los animales no patológicos. Por otra parte, en los animales MIS produjo la reorganización del cuerpo caloso, también de manera opuesta en función de la región implicada. Además, NAC revirtió el aumento de la densidad de sustancia blanca a nivel de hipotálamo, así como la retracción de fibras cerebelares.

Los ácidos **omega-3** apenas alteraron la organización de las fibras en los animales salino, a excepción de un ligero aumento de la densidad de las fibras de la comisura del lemnisco lateral y de la fimbria hipocampal. En el caso de los animales MIS, el efecto fue similar al producido por NAC, afectando al cuerpo caloso en las dos direcciones y revirtiendo los efectos provocados por MIS a nivel de hipotálamo y cerebelo.

El tratamiento con **minociclina** tampoco provocó una gran reordenación de fibras en los animales sanos, salvo una ligera retracción de la cápsula externa y del extremo más caudal del cuerpo caloso en el hemisferio derecho, y un incremento de la densidad de la sustancia blanca a nivel cerebelar. De nuevo, en los animales MIS, la minociclina produjo una reversión del aumento de densidad de las fibras en el hipotálamo, así como

de la contracción de las mismas en regiones del cerebelo. Asimismo, también fue responsable de ligeras retracciones en áreas específicas y muy localizadas del cuerpo calloso.

Figura 3.7.

Efecto de la N-acetilcisteína, los omega-3 y la minociclina en la morfometría de la sustancia blanca

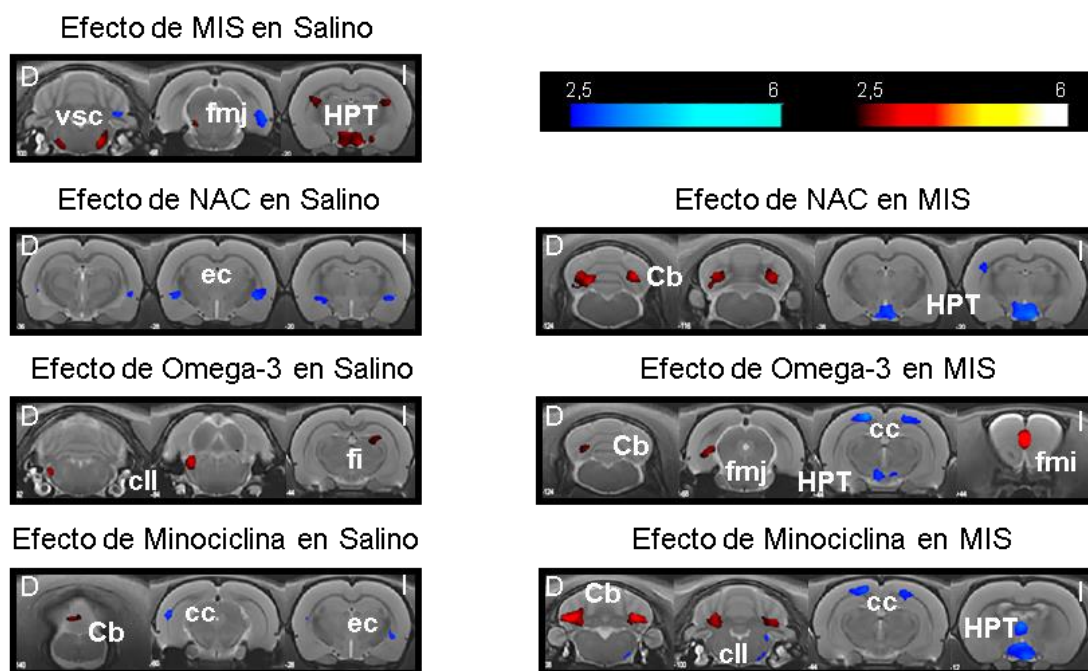


Fig. 3.7. Alteraciones en la morfometría de la sustancia blanca causadas por el tratamiento preventivo con NAC, Omega-3 o MIN (Salino-VH 11, Salino-NAC 12, Salino-Omega 12, Salino-Min 12, MIS-VH 13, MIS-NAC 14, MIS-Omega 14, MIS-Min 14). Los resultados de VBM se muestran como un mapa de T probabilístico representado sobre una imagen de resonancia magnética donde los colores cálidos indican un aumento de la densidad de la sustancia blanca y los colores fríos indican una disminución de la misma. Las barras de colores muestran los valores de T. Abreviaturas: Cb: cerebelo, cc: cuerpo calloso, cll: comisura del lemnisco lateral, D: derecha, ec: cápsula externa, fi: fimbria, fmi: fórceps menor del cuerpo calloso, fmj: fórceps mayor del cuerpo calloso, HPT: hipotálamo, I: izquierda, vsc: tracto espinocerebral ventral.

1.3.2.3. Líquido cefalorraquídeo

Los animales MIS sin tratar presentaron un aumento notable de la densidad en áreas con líquido cefalorraquídeo (CSF) en comparación con los animales control. Este efecto se hizo especialmente visible a nivel del tercer ventrículo (**Figura 3.8.** y **Anexo C**).

El aumento en el sistema ventricular fue completamente revertido por los tres tratamientos (**NAC, omega-3 y minociclina**), de manera especialmente notoria en el caso de la NAC. Este fármaco, además, produjo este mismo efecto también en los animales control, junto con la también contracción a nivel del ventrículo olfatorio. Además, en los animales MIS, la NAC también fue responsable de la retracción a nivel del acueducto de

Silvio y del cuarto ventrículo, con un muy leve incremento de la densidad a nivel del ventrículo lateral derecho.

Figura 3.8.

Efecto de la N-acetilcisteína, los omega-3 y la minociclina en la morfometría del líquido cefalorraquídeo

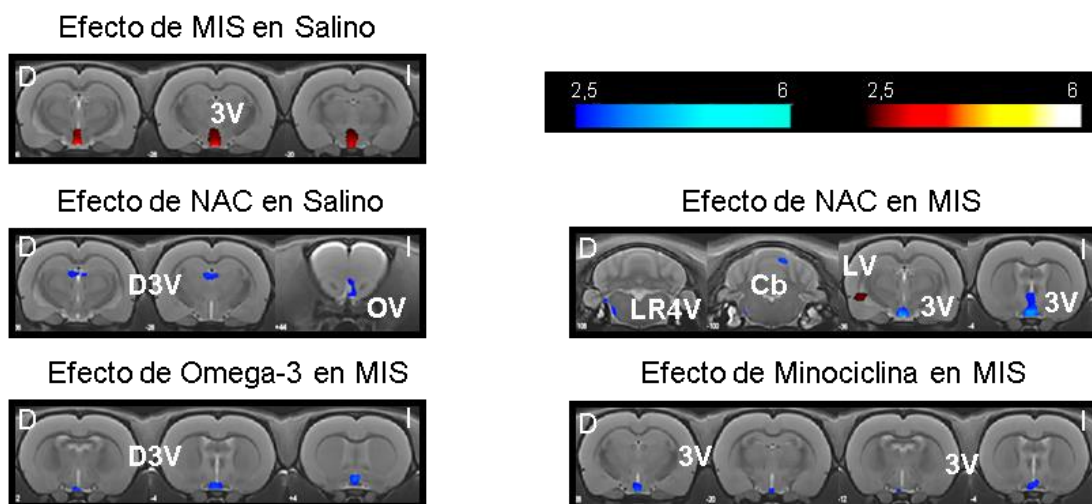


Fig. 3.8. Alteraciones en la morfometría del líquido cefalorraquídeo causados por el tratamiento preventivo con NAC, Omega-3 o MIN (Salino-VH 11, Salino-NAC 12, Salino-Omega 12, Salino-Min 12, MIS-VH 13, MIS-NAC 14, MIS-Omega 14, MIS-Min 14). Los resultados de VBM se muestran como un mapa de T probabilístico representado sobre una imagen de resonancia magnética donde los colores cálidos indican un aumento de la densidad de áreas con líquido cefalorraquídeo y los colores fríos indican una disminución de la misma. Las barras de colores muestran los valores de T. Abreviaturas: 3V: 3^{er} ventrículo, Cb: cerebelo, D: derecha, D3V: 3^{er} ventrículo dorsal, I: izquierda, LR4V: receso lateral del 4^o ventrículo, LV: ventrículo lateral, OV: ventrículo olfatorio.

1.4. Estudio de marcadores de oxidación e inflamación

Tras la adquisición de ambas modalidades de imagen, los animales se sacrificaron para extraer el cerebro, con el objetivo de evaluar en cuatro regiones (corteza prefrontal, hipocampo, amígdala y caudado-putamen) el efecto de los tres tratamientos preventivos en la modulación de diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo (IOS) en el modelo MIS. En las **Figuras 3.9., 3.10., 3.11. y 3.12.** se encuentran agrupados algunos de los cambios más relevantes encontrados para cada una de las estructuras cerebrales. El resto de resultados, no representados en la figura, así como los resultados del ANOVA de 2 vías, se muestran en los **anexos D-I.**

1.4.1. Corteza prefrontal

En la corteza prefrontal (**Figura 3.9.**) el ANOVA reveló diferencias entre los animales Salino y MIS en iNOS, MDA, CAT, KEAP1, NRF2, GSH_{total}, GSH_{libre} y GSSG. A su vez, esos análisis mostraron un efecto del tratamiento con NAC en iNOS y KEAP1. El tratamiento con omega-3 tuvo también un efecto modulador sobre iNOS y KEAP1, además de sobre GPx y GSH_{libre}. Por último, el ANOVA mostró un único efecto del tratamiento con minociclina sobre HO1, aunque rozó la significación estadística en el caso, de nuevo, de iNOS ($p = 0.053$).

Figura 3.9.

Alteraciones de varios marcadores de IOS en la corteza prefrontal

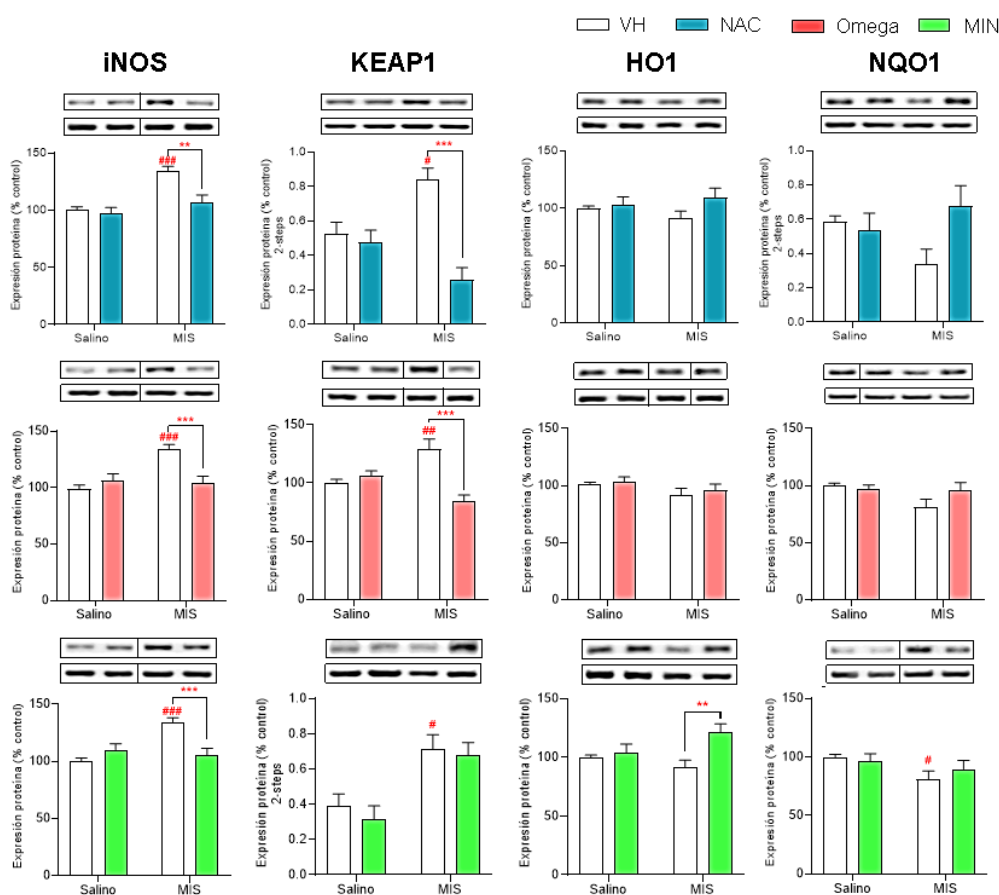


Fig. 3.9. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes derivados del tratamiento preventivo con NAC, OM3 o MIN en la corteza prefrontal de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestra iNOS, un marcador proinflamatorio, y KEAP1, HO1 y NQO1, marcadores de estrés oxidativo. Las bandas representativas de los cuatro marcadores (bandas superiores) y del control de carga, β -actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs Salino VH; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs MIS VH).

Yendo a resultados más concretos, uno de los más destacados es el incremento muy significativo de iNOS en los animales MIS, casi completamente prevenido por todos los tratamientos en los animales de este modelo. Además, ninguno de los tres tratamientos ejerció un efecto modulador sobre este marcador. En esta región, observamos también un incremento de KEAP1 en los controles MIS, de nuevo prevenido por los tratamientos preventivos con NAC y omega-3, pero no con minociclina. Por otra parte, las moléculas antioxidantes HO1 y NQO1 sufrieron una disminución leve en los animales MIS, pero sin llegar a alcanzar valores estadísticamente significativos. Esta ligera reducción de la expresión de la proteína fue revertida por los tres tratamientos, a excepción de omega-3 y HO1. La minociclina se mostró particularmente efectiva aumentando el porcentaje de expresión de HO1 en la corteza prefrontal, llevando los indicadores de este marcador incluso por encima del expresado por los animales no patológicos. Del resto de resultados en esta estructura cerebral, destaca el incremento considerable de la molécula prooxidante MDA en los animales MIS respecto a los animales control. Este incremento no pudo ser revertido por ninguno de los tres tratamientos, aunque los tres lograron reducir muy ligeramente la concentración del mismo respecto a su control MIS patológico.

1.4.2. Hipocampo

En el hipocampo (**Figura 3.10.**) el ANOVA únicamente mostró diferencias debidas al modelo en dos marcadores, SOD y GSSG. A su vez, el tratamiento con NAC reveló modulaciones en otros dos marcadores: COX2, KEAP1. El tratamiento con omega-3 mostró un efecto significativo sobre iNOS, KEAP1, GSH_{total} y GSSG. Finalmente, la minociclina ejerció un efecto modulador en KEAP1, NQO1, GPx, GSG_{total} y GSSG.

Por otra parte, aunque los análisis estadísticos con el ANOVA no corroboraron mayoritariamente estas diferencias, se aprecia una tendencia similar en iNOS, con un incremento en los animales MIS que los tratamientos parcialmente previenen en los animales de este modelo, aunque a una escala considerablemente menor que los cambios observados en la corteza prefrontal. Otro resultado relevante es el encontrado en la expresión de KEAP1, una molécula que, si bien no presenta diferencias entre los animales control Salino y MIS, al contrario de lo observado antes en la corteza prefrontal, es modulada por todos los tratamientos en el hipocampo. Además, curiosamente, los análisis post-hoc revelan un efecto más pronunciado en los animales sanos y no tanto en los patológicos. En cuanto a las moléculas antioxidantes HO1 y NQO1, no se encontraron diferencias reseñables entre los animales sanos y los animales MIS. Tampoco parece haber un efecto de los tratamientos sobre estos marcadores en esta región, a excepción

de la minociclina, que sí incrementó la expresión de ambos. Por último, aunque no encontramos diferencias entre los controles Salino y MIS, tanto omega-3 como minociclina redujeron considerablemente, y en contra de lo esperado, los valores de GSH total, de GPx y de GSSG en los animales MIS (ver **Anexos G e I**).

Figura 3.10.
Alteraciones de varios marcadores de IOS en el hipocampo

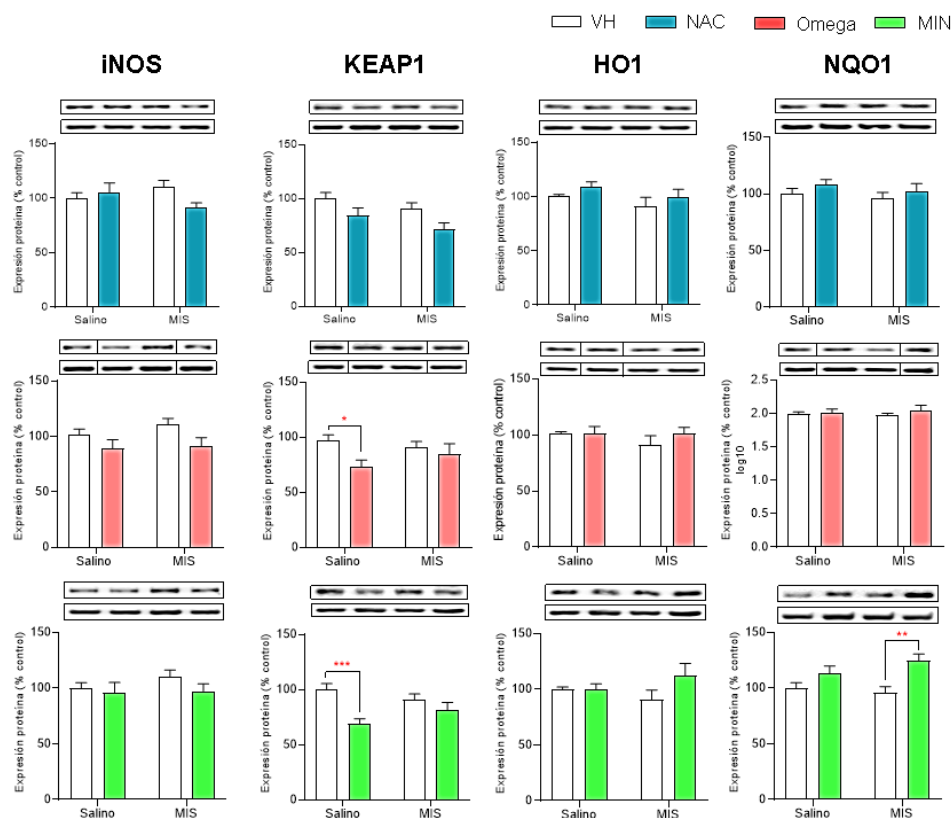


Fig. 3.10. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes derivados del tratamiento preventivo con NAC, OM3 o MIN en el hipocampo de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestra iNOS, un marcador proinflamatorio, y KEAP1, HO1 y NQO1, marcadores de estrés oxidativo. Las bandas representativas de los cuatro marcadores (bandas superiores) y del control de carga, β -actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs MIS VH).

1.4.3. Amígdala

En el análisis de ANOVA en la amígdala (**Figura 3.11.**) encontramos cambios en iNOS, COX2, KEAP1, HO1, SOD, CAT, GSH_{total}, GSH_{libre} y GSSG entre animales Salino y MIS. La NAC mostró un efecto modulador sobre COX2, HO1, NQO1, NRF2 y SOD. Este análisis reveló también un efecto del tratamiento con omega-3 en HO1, NQO1 y GPx. Por último, el tratamiento con minociclina mostró ser eficaz modulando COX2, HO1 y GSSG.

Figura 3.11.
Alteraciones de varios marcadores de IOS en la amígdala

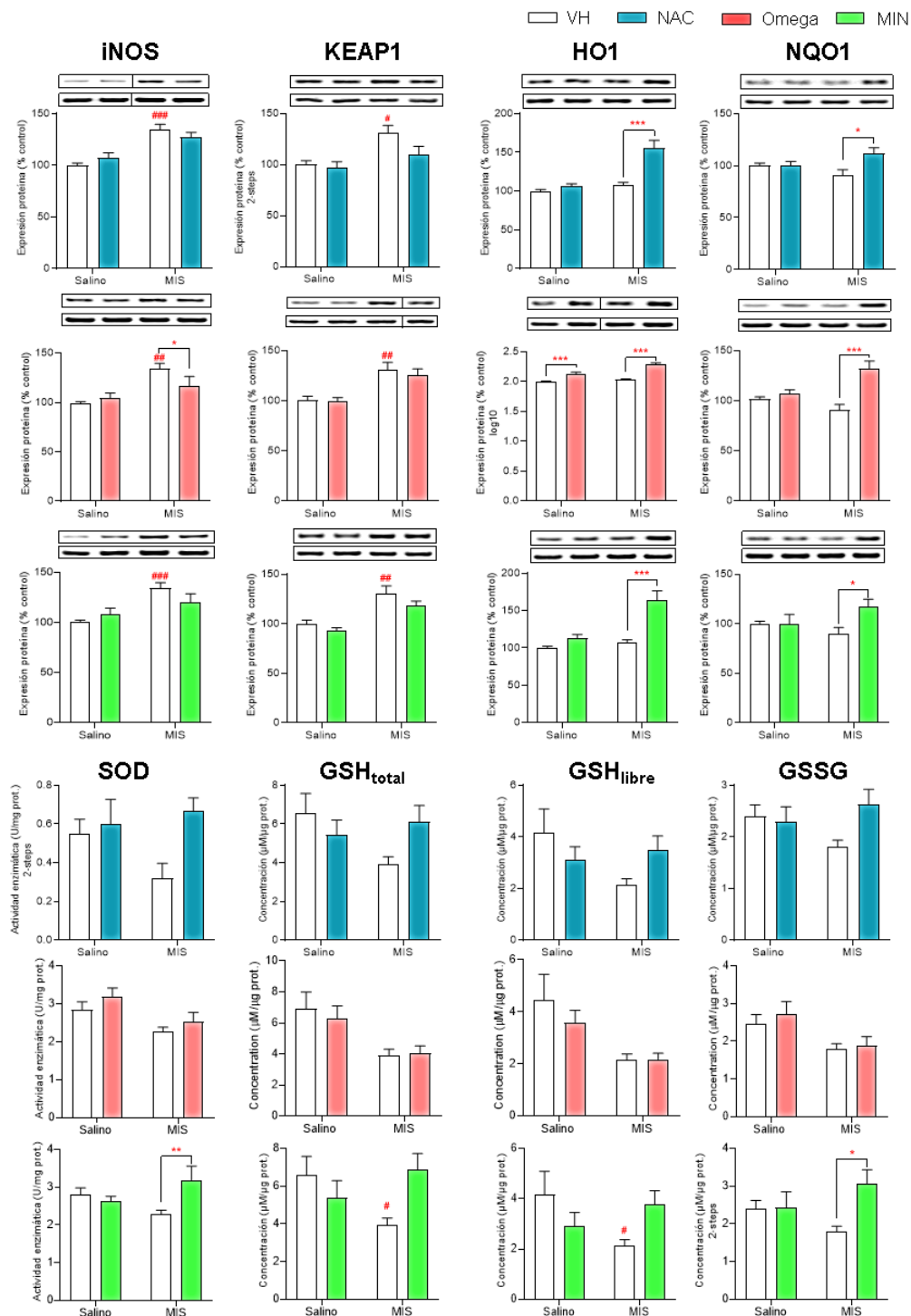


Fig. 3.11. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes tras el tratamiento preventivo con NAC, OM3 o MIN en la amígdala de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestran iNOS, un marcador proinflamatorio, SOD, una enzima con capacidad antioxidante, y KEAP1, HO1, NQO1, GSH total y libre y GSSG, marcadores de estrés oxidativo. Las bandas representativas de iNOS, KEAP1, HO1 y NQO1 (bandas superiores) y del control de carga, β -actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs Salino VH; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs MIS VH).

En lo relativo a los análisis post-hoc grupo a grupo, queda patente el gran número de cambios encontrado, tanto a nivel del modelo, como provocado por los tres tratamientos. De nuevo, iNOS se muestra muy sobreexpresado en los animales MIS. Este incremento no es completamente prevenido por ninguno de los tratamientos, aunque omega-3 sí parece mostrar una mayor efectividad que NAC y minociclina. Lo mismo ocurre con KEAP1, sobreexpresado en los animales MIS, y con una leve reducción de su expresión en los animales MIS tratados, pero lejos de revertir el incremento. El caso opuesto ocurre con HO1 y NQO1: aunque los animales MIS no muestran diferencias respecto a los controles Salino, el tratamiento con los tres compuestos causa un aumento notable de la expresión de ambos marcadores, por encima de los valores de expresión mostrados por los animales control. Además, en el caso de HO1, omega-3 logra incrementar su expresión tanto en animales sanos como patológicos. Los animales MIS presentan también una reducción de la actividad enzimática de la molécula antioxidante SOD, que es revertida mediante el tratamiento con NAC y minociclina en los animales de este modelo. También podemos observar una reducción de los niveles de GSH total, GSH libre y GSSG en los animales MIS, parcialmente restaurados por NAC y minociclina. Los animales MIS evidenciaron un aumento de la expresión de COX2, aunque éste no pudo ser revertido por ningún tratamiento.

1.4.3. Caudado-putamen

En el caudado-putamen (**Figura 3.12.**) los análisis del ANOVA mostraron diferencias entre los animales Salino y MIS en iNOS, KEAP1, CAT, SOD, GPx, GSH_{total}, GSH_{libre} y GSSG. A su vez, el tratamiento preventivo con NAC reveló un efecto en HO1 y CAT, con omega-3 en HO1 y con minociclina en iNOS yHO1.

En esta estructura encontramos, por lo general, menos cambios entre los grupos que los revelados en corteza prefrontal y amígdala. Probablemente el cambio más relevante es el encontrado en HO1, un marcador que, aunque no muestra apenas diferencia entre los animales Salino y MIS, sí se ha visto incrementado por los diferentes tratamientos, tanto en animales sanos como patológicos, algo especialmente visible con el tratamiento con omega-3. La minociclina logra esta prevención de manera más notable en los animales MIS tratados. La NAC, por su parte, incrementa levemente la expresión de este marcador tanto en Salino como en MIS, aunque ese aumento no alcanza la significación estadística. Más allá del HO1, los tratamientos no modifican en gran medida ninguno de los marcadores. No obstante, la minociclina se mostró especialmente eficaz previniendo las alteraciones encontradas en iNOS y SOD en los animales MIS tratados, algo que la NAC y los omega-3 no han logrado.

Figura 3.12.

Alteraciones de varios marcadores de IOS en el caudado-putamen

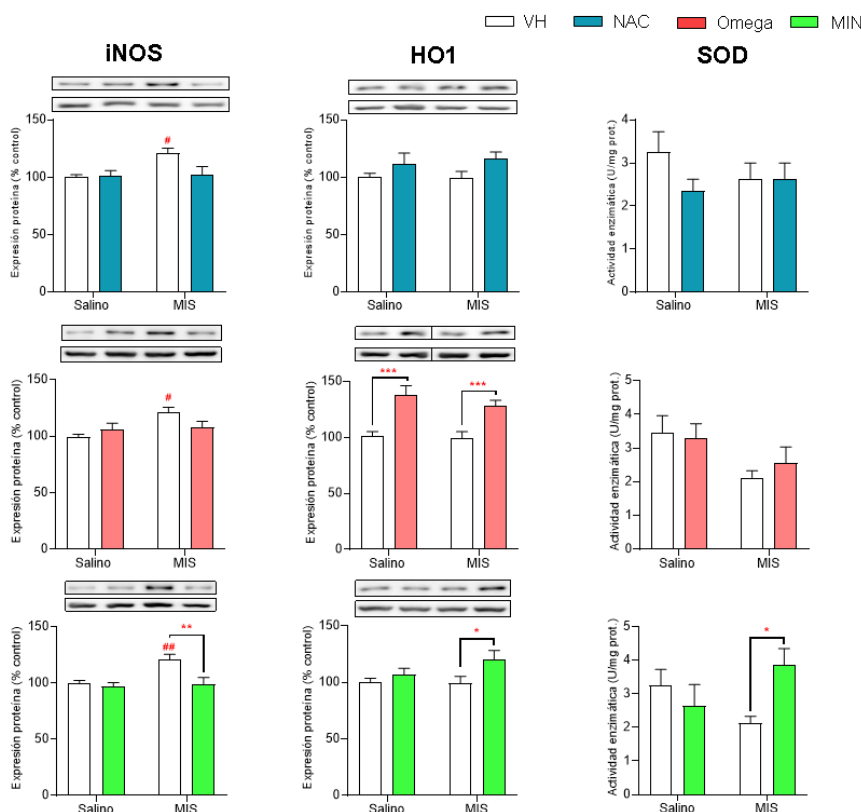


Fig. 3.12. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes tras el tratamiento preventivo con NAC, OM3 o MIN en el caudado-putamen de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestran iNOS, un marcador proinflamatorio, SOD, una enzima con capacidad antioxidante, y HO1, marcador de estrés oxidativo. Las bandas representativas de iNOS y HO1 (bandas superiores) y del control de carga, β -actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs Salino VH; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs MIS VH).

2. Estudio II: Tratamiento preventivo con NAC durante la gestación

2.1. Evaluación de la conducta: inhibición del prepulso, memoria de trabajo y ansiedad

2.1.1. Inhibición prepulso

La prueba del PPI volvió a mostrar un claro déficit de los animales MIS a la hora de inhibir correctamente el prepulso, corroborable estadísticamente tanto en el análisis de ANOVA como en el post-hoc de Bonferroni, de manera especialmente notable para los prepulsos de mayor intensidad (**Figura 3.13.**). Por su parte, la NAC mostró una eficacia desigual a la hora de revertir este déficit en los animales MIS. Los animales tratados durante 7 días revirtieron parcialmente el déficit en los animales MIS, pero sin llegar a

los niveles de los animales control. Además, en el caso del prepulso de 74 dB, los animales MIS tratados durante 7 días con NAC parecen sufrir un incremento del déficit, aunque éste no llegue a ser estadísticamente significativo. En el caso de los animales salino, el tratamiento preventivo durante 7 días no parece tener efecto, salvo en el prepulso de 80 dB, donde, sorprendentemente, los animales sufren un empeoramiento en su capacidad de inhibir el prepulso. Sin embargo, este déficit es restablecido en el prepulso de 86 dB. Por otra parte, tanto el ANOVA como el test de Bonferroni corroboran que el tratamiento con NAC durante 21 días sí logra completar la prevención del déficit en los animales MIS que no consigue el tratamiento durante 7 días. En el caso de los tres prepulsos, los animales MIS NAC21d presentan un mayor porcentaje de inhibición que sus controles MIS sin tratar, llegando incluso a valores de inhibición superiores a los mostrados por los animales sanos en el caso del prepulso de 86 dB.

Figura 3.13.

Cambios conductuales valorados mediante la prueba de la inhibición del prepulso

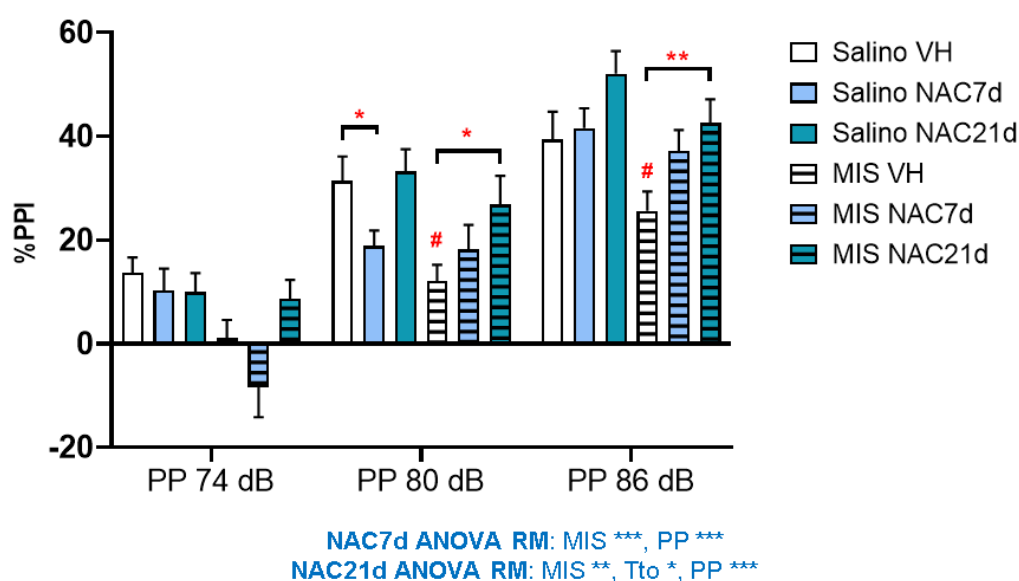


Fig. 3.13. Cada columna representa la media \pm SEM de la PPI (%) para la intensidad de cada prepulso (PP 74, 80 y 86 decibelios) de 7-12 animales (Salino-VH 8, Salino-NAC7d 10, Salino-NAC21d 12, MIS-VH 7, MIS-NAC7d 10, MIS-NAC21d 12). Debajo de la figura se muestran los resultados significativos, o cerca de la significación estadística, del análisis del ANOVA de medidas repetidas, tanto para el tratamiento durante 7 días como para el de 21. PP : prepulso [$*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$]. Encima de cada columna de la figura se muestran los resultados del test post-hoc de Bonferroni [$\# p < 0.05$ vs. Salino VH; $* p < 0.05$, $** p < 0.01$ vs. MIS VH].

2.1.2. Laberinto en T

En la prueba del laberinto en T evaluamos el número de alternancias entre el brazo izquierdo y derecho que realiza cada animal en ensayos sucesivos como medida indirecta de la memoria de cada uno de ellos: la no alternancia entre brazo e izquierdo en ensayos consecutivos se considera un indicativo de déficit de memoria de trabajo. Los resultados de esta prueba (**Figura 3.14.** y **Anexos J y K**) no permiten, sin embargo, indicar un déficit en la capacidad de alternar entre un brazo y otro por parte de los animales MIS, que muestran unos niveles de alternancia similares a su control. El ANOVA no mostró diferencias debidas ni al efecto del Poly I:C ni a los tratamientos, en ninguna de las ventanas. Además, el análisis post-hoc corroboró la ausencia de diferencias entre grupos: el tratamiento con NAC, en ambas ventanas temporales, no modificó este comportamiento ni en animales sanos ni en los patológicos.

Figura 3.14.

Cambios conductuales valorados mediante la prueba del laberinto en T

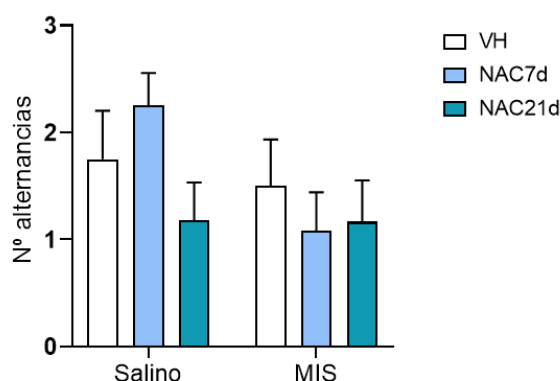


Fig. 3.14. Número de alternancias media por grupo como medida indirecta del estado de la memoria de trabajo y cómo es afectada por el tratamiento preventivo con NAC en los animales control (Salino) y en los animales MIS. Cada columna representa la media \pm SEM de las alternancias por grupo de 8-12 animales (Salino VH 8, Salino NAC7d 12, Salino NAC21d 12, MIS VH 11, MIS NAC7d 12, MIS NAC21d 12). No existen diferencias significativas entre los grupos en el test post-hoc de Bonferroni.

2.1.3. Laberinto en cruz elevado

La prueba del laberinto en cruz elevado se usa comúnmente para evaluar los niveles de ansiedad en roedores. Esta prueba se basa en la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos. Por ello, los animales con mayores niveles de ansiedad tienden a permanecer más tiempo en los brazos cerrados que en los abiertos. Este resultado se corrobora de manera muy clara (**Figura 3.15.** y **Anexos J y K**) en los animales MIS. El

porcentaje de tiempo que estos animales permanecen en los brazos cerrados es significativamente mayor que el de los animales salino. En consecuencia, los animales salino permanecieron más tiempo en brazos abiertos que los animales MIS, algo que se pudo corroborar en el ANOVA (**Anexos J y K**). Además, tanto este análisis como el test post-hoc entre grupos revelaron que los animales MIS se asomaron significativamente menos al exterior de los brazos abiertos que los animales control. Este importante incremento de los niveles de ansiedad en los animales MIS desaparece completamente tras el tratamiento preventivo con NAC, independientemente de la ventana temporal de administración. Tanto los animales MIS tratados durante 7 días como los tratados durante 21 reducen de manera drástica el porcentaje de tiempo en brazos cerrados y aumentan significativamente el permanecido en abiertos. Además, incrementan de igual manera el número de veces que se asoman al exterior. Los análisis de ANOVA y Bonferroni corroboraron de manera contundente el efecto preventivo del tratamiento con NAC.

Figura 3.15.

Cambios conductuales valorados mediante la prueba del laberinto en cruz elevado

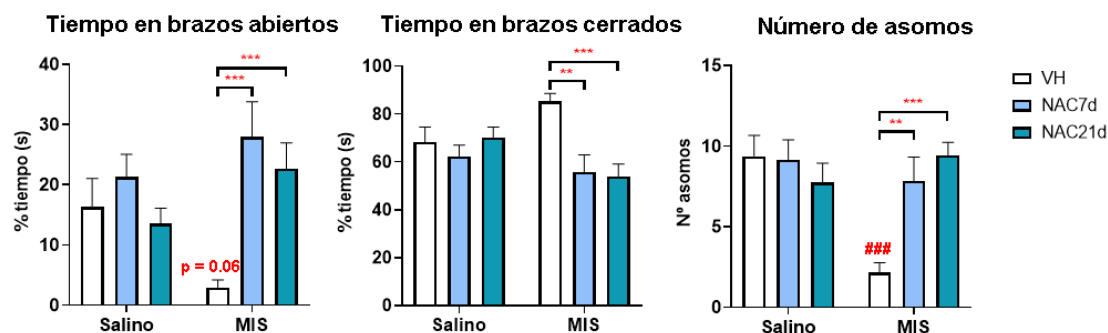


Fig. 3.15. Representación del tiempo que permanecieron los animales en los brazos cerrados y en los abiertos, así como del número de veces que se asomaron a la zona exterior del laberinto, como medida indirecta de los niveles de ansiedad y cómo son afectados por el tratamiento preventivo con NAC durante la gestación en los animales control (Salino) y en los animales del modelo MIS. Cada columna representa la media \pm SEM por grupo de 8-12 animales (Salino-VH 8, Salino-NAC7d 12, Salino-NAC21d 12, MIS-VH 12, MIS-NAC7d 12, MIS-NAC21d 12). En la figura se muestran los resultados del test post-hoc de Bonferroni [### $p < 0.001$, $p = 0.06$ vs. Salino VH; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. MIS VH].

2.2. Imagen por resonancia magnética

2.2.1. Volumetría mediante regiones de interés

En el estudio de las regiones de interés (**Figura 3.16.** y **Anexos J y K**) se incluyeron las mismas estructuras previamente analizadas en el Estudio I: cerebro completo, cor-

teza, corteza prefrontal, hipocampo, ventrículo y cerebelo, incluyendo además una séptima, el cuerpo caloso, de cara a obtener, junto con el estudio de imagen por difusión, una visión global de esta estructura.

Los resultados del ANOVA (**Anexos J y K**) revelaron diferencias significativas entre los animales Salino y MIS en todas las estructuras salvo la corteza total. No obstante, estas diferencias no se observaron entre estos animales en el ANOVA realizado incluyendo a los animales tratados durante 21 días. En este análisis, el tratamiento con NAC durante 7 días indujo diferencias en la corteza completa y la prefrontal, en hipocampo, en cuerpo caloso y en el cerebelo. También se observó una interacción en los ventrículos y el cuerpo caloso. Por otra parte, el tratamiento durante toda la gestación fue capaz de modular el hipocampo y el cuerpo caloso, con un mayor número de interacciones que el tratamiento más corto (cerebro completo, hipocampo, cuerpo caloso y cerebelo).

Figura 3.16.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la volumetría de siete regiones cerebrales

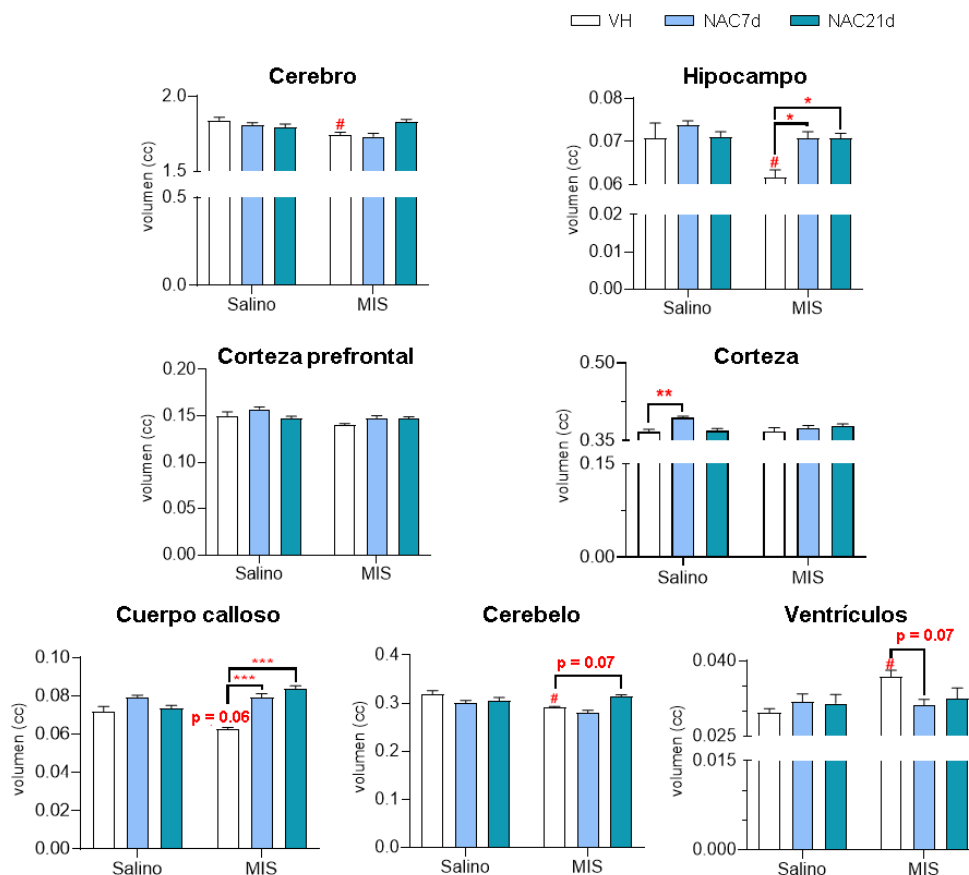


Fig. 3.16. Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la volumetría cerebral de los animales Salino y MIS (6 – 12 animales/grupo). Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo en cada estructura. Los resultados del test post-hoc de Bonferroni se muestran, en caso de ser significativos, sobre la barra correspondiente (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs Salino VH; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $p = 0.06$, $p = 0.07$ vs. MIS VH).

Atendiendo a los resultados grupo a grupo, los animales MIS sin tratar muestran una reducción estadísticamente significativa en el hipocampo y el cerebelo –y casi significativa en el cuerpo calloso–, así como un aumento, también estadísticamente significativo, en el tamaño de los ventrículos, en comparación con los animales Salino.

A diferencia del Estudio I, donde la NAC se administró durante la periadolescencia, sin inducir cambios de gran envergadura, en este caso, tanto el tratamiento durante la gestación durante 7 días como el de 21 logran revertir muchos de los déficits observados en los animales MIS. De este modo, los análisis post-hoc de Bonferroni corroboraron el efecto preventivo de la NAC en ambas ventanas temporales modulando el volumen alterado del hipocampo, el cuerpo calloso y los ventrículos en los animales MIS. En el caso del cerebelo, el tratamiento de 21 días previno casi completamente el déficit de los animales MIS, aunque sin alcanzar el umbral estadístico ($p = 0.07$). En el caso de la corteza y la corteza prefrontal no hay cambios en los animales tratados, salvo un aumento del tamaño cortical en los animales salino que fueron tratados durante 7 días. Por último, existe un leve incremento del tamaño del cerebro completo en los animales MIS tratados durante 21 días, aunque no es estadísticamente significativo.

2.2.2. Morfometría cerebral basada en vóxel

Del mismo modo que en el Estudio I, en este Estudio también se evaluaron los diferentes cambios morfométricos en sustancia gris, sustancia blanca y líquido cefalorraquídeo (**Figura 3.17.** y **Anexo L**).

2.2.2.1. Sustancia gris

En el análisis de la sustancia gris (**Figura 3.17A** y **Anexo L**), el primer cambio notable respecto al Estudio I es el mayor impacto de ambos tratamientos con NAC de cara a generar cambios en la morfología cerebral, del mismo modo que mostramos previamente con el tamaño de distintas regiones de interés. Así, observamos cambios a una escala mucho mayor en numerosas estructuras tras los tratamientos. Tanto la administración de NAC en la gestación durante 7 días como durante 21 produjo en los animales salino y en los MIS un importante agrandamiento de áreas amplias del cerebelo, de los colículos superior e inferior y del hipotálamo. En los animales MIS, el tratamiento con NAC también fue responsable de un aumento a nivel de corteza prefrontal y tálamo. El tratamiento con NAC produjo también la contracción de varias regiones, como el caudado-putamen, aunque a un menor nivel que los agrandamientos ya descritos. El resto de cambios se pueden consultar en el Anexo M.

Figura 3.17.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la morfometría cerebral

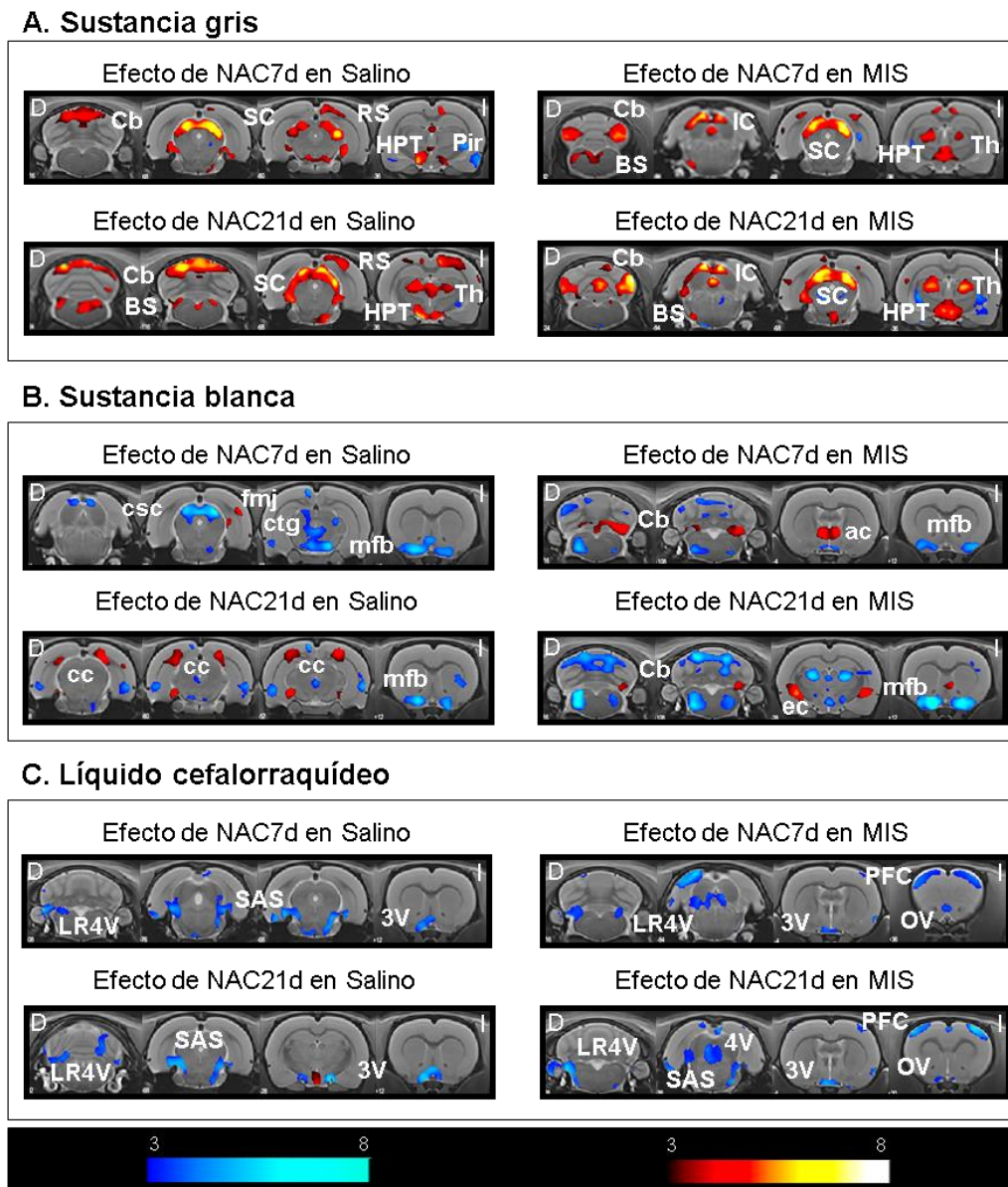


Fig. 3.17. Alteraciones en la morfometría de la GM, la WM y el CSF en los animales Salino y MIS tras el tratamiento con NAC (Salino VH: 7, Salino NAC7d: 12, Salino NAC21d: 12, MIS VH: 6, MIS NAC7d: 12, MIS NAC21d: 12). Los resultados de VBM se muestran como un mapa de T probabilístico representado sobre una imagen de resonancia magnética donde los colores cálidos indican un aumento de la densidad de GM, WM o CSF y los colores fríos indican una disminución. Las barras de colores muestran los valores de T. Abreviaturas: 3V: 3^{er} ventrículo, 4V: 4^o ventrículo, ac: comisura anterior, BS: tronco cerebral, Cb: cerebelo, cc: cuerpo calloso, csc: comisura del colículo inferior, ctg: tracto tegmental central, D: derecha, ec: cápsula externa, fmj: fórceps mayor del cuerpo calloso, HPT: hipotálamo, I: izquierda, IC: colículo inferior, LR4V: receso lateral del 4^o ventrículo, mfb: fascículo presencefálico medial, PFC: corteza prefrontal, OV: ventrículo olfatorio, Pir: corteza piriforme, RS: corteza retrosplenial, SAS: espacio subaracnoideo, SC: colículo superior, Th: tálamo.

2.2.2.2. Sustancia blanca

En la sustancia blanca (**Figura 3.17B y Anexo L**) se mantienen los cambios a gran escala producidos por la NAC administrada durante la gestación, también de mucha más envergadura que los encontrados en el Estudio I. Estos cambios, además, se encuentran en muchos casos localizados en regiones cercanas a los ya vistos para sustancia gris. Esto puede verse en las importantes reducciones que observamos, en los animales tratados, en regiones fibrilares cercanas a los colículos, en el cerebelo y en el hipotálamo. Otra región que sufre bastantes transformaciones por el efecto de la NAC es el cuerpo calloso, con cambios morfométricos diferentes en función de a qué altura en el eje longitudinal del cerebro se encuentre. A menor escala, existen más modificaciones, que se pueden consultar en el Anexo M.

2.2.2.3. Líquido cefalorraquídeo

En el líquido cefalorraquídeo (**Figura 3.17C y Anexo L**) se mantiene la tendencia general, con cambios a mucha mayor escala que en el Estudio I, a causa de la administración de la NAC. A nivel general, tanto el tratamiento con NAC durante 7 días como durante 21 produjo una contracción significativa de los ventrículos, especialmente del tercero y del cuarto, aunque también hay contracciones importantes a nivel de los ventrículos laterales y los olfatorios, así como del espacio subaracnoideo.

2.2.3. Estudio de imagen por difusión

El estudio de imagen por difusión se realizó con el objetivo de determinar si existían cambios microestructurales en diferentes regiones del cerebro, debido a la posibilidad que esta técnica ofrece de cara a determinar la organización y orientación de las fibras nerviosas (252). Para ello, evaluamos la fracción de anisotropía (FA) y la difusividad media (MD) en tres regiones cerebrales: cuerpo calloso, corteza prefrontal e hipocampo (**Figura 3.18. y Anexos J y K**).

La FA hace referencia a cómo de dominante es la dirección del movimiento del agua en un tejido, en este caso, los axones neuronales, en un vóxel concreto de la imagen. A mayor FA, siendo el máximo 1 y el mínimo, 0, mayor anisotropía, es decir, tendremos axones en más direcciones diferentes en ese mismo vóxel. Cuanto más próxima a 0 sea la FA, mayor isotropía y más axones en la misma dirección tendremos en el mismo vóxel. Por ello, la FA se utiliza de manera frecuente como un marcador de integridad axonal. Por su parte, la MD mide la magnitud de la difusión del agua en el tejido, sirviendo más como una medida ultraestructural que a su vez refleja la integridad de la sustancia blanca.

Figura 3.18.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la integridad de la sustancia blanca del cuerpo calloso, la corteza prefrontal y el hipocampo

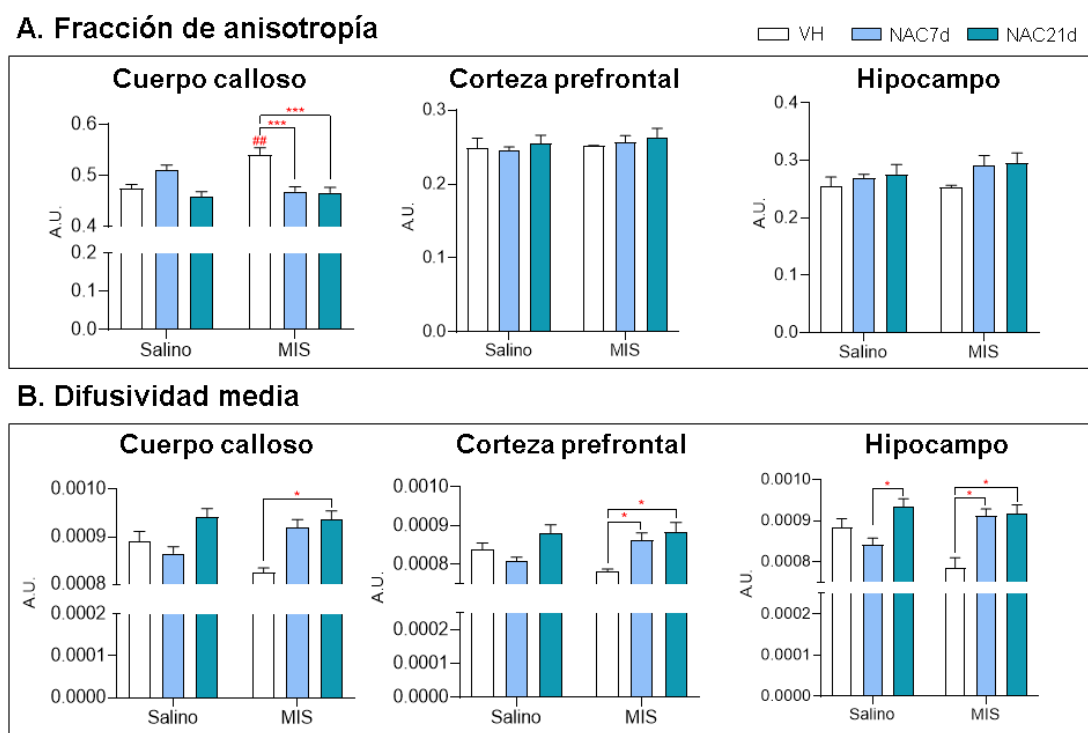


Fig. 3.18. Alteraciones en la FA y la MD en el cuerpo calloso, la corteza prefrontal y el hipocampo de los animales Salino y MIS tras el tratamiento con NAC (Salino-VH: 7, Salino-NAC7d: 12, Salino-NAC21d: 12, MIS-VH: 6, MIS-NAC7d: 12, MIS-NAC21d: 12). Las columnas muestran la FA o la MD media de cada grupo (promedio \pm SEM). Sobre el gráfico se muestran los resultados del test post-hoc de Bonferroni ($\#\#$ $p < 0.01$ vs Salino VH; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs MIS VH).

Únicamente se realizó un análisis de ANOVA en el caso de la FA en cuerpo calloso e hipocampo. El resto de parámetros, al no ser normales ni homocedásticos ni después de ser transformados, se analizó mediante análisis de Kruskal-Wallis. En el caso del ANOVA, en la comparativa con los animales tratados durante 21 días se identificaron diferencias significativas entre animales Salino y MIS, y entre animales tratados y no tratados, así como un efecto de la interacción, en la FA del cuerpo calloso. Los análisis de Kruskal-Wallis mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en todos los casos, salvo en la FA de la corteza.

Más concretamente, en el **cuerpo calloso**, los animales MIS presentaron un incremento significativo de la FA respecto a los animales control. Este incremento fue prevenido totalmente por NAC a ambas dosis en estos animales. En el caso de la MD, los animales MIS mostraron, de manera opuesta a la FA, una disminución significativa, y que también fue completamente revertida por la administración de NAC durante 7 y 21 días.

En ambos casos, los tests de Bonferroni y de Dunn, respectivamente, corroboraron estas diferencias.

En la **corteza prefrontal** la MD sigue un comportamiento casi idéntico al mostrado en el cuerpo caloso, disminuyendo de manera estadísticamente significativa en los animales MIS y siendo este descenso prevenido por ambos tratamientos con NAC, también de manera estadísticamente significativa según el análisis de Dunn. Por otra parte, no se encontraron cambios significativos entre los grupos para la FA.

Tampoco existen cambios en la FA entre los animales salino y los animales MIS en el caso del **hipocampo**, si bien el tratamiento con ambas dosis de NAC parece aumentar ligeramente, aunque de manera no estadísticamente significativa, la FA en el caso de los animales MIS. La MD aparece reducida en los animales MIS sin tratar. Esta disminución es prevenida por ambos tratamientos con NAC.

2.2.1. Evaluación de la concentración de metabolitos en corteza prefrontal e hipocampo mediante espectroscopía

El estudio de espectroscopía por resonancia magnética (MRS) (**Figura 3.19.** y **Anexos J y K**) permite conocer la concentración de compuestos neuroquímicos *in vivo*. La ¹H MRS que empleamos en esta Tesis Doctoral permite la identificación de aproximadamente 20 metabolitos. De cara a los resultados, únicamente se tuvieron en cuenta aquellos que, tras el análisis con el software de cuantificación LC Model, mantuvieron una desviación estándar menor a 20 (Cramér–Rao lower bounds) y, por tanto, la estimación de su concentración podía considerarse válida: glicerofosfocolina + fosfocolina (GPC/PCh), N-acetilaspártato + N-acetilaspártilglutamato (NAA/NAAG), glutamato + glutamina (Glu/Gln), macromolécula 09 + lípido 09 (MM09/Lip09) y macromolécula 20 + lípido 20 (MM20/Lip20).

En la **corteza prefrontal** el ANOVA (**Anexos J y K**) no identificó ninguna diferencia entre los animales Salino y MIS, así como con el tratamiento durante 7 días. Por otra parte, sí se encontró un efecto del tratamiento durante la gestación completa a nivel de GPC+PCh y las macromoléculas. Ninguna de estas diferencias fue corroborada en el análisis grupo a grupo con los tests post-hoc de Bonferroni. No obstante, aunque ninguno de estos resultados pueda validarse estadísticamente, en el caso de GPC+PCh, así como de NAA/NAAG, el tratamiento con NAC parece incrementar, en ambos casos de manera muy leve, su concentración, de manera dosis-dependiente, especialmente en el caso de GPC/PCh.

En el **hipocampo** tampoco existen diferencias claras entre los animales salino y los animales MIS. El ANOVA reveló diferencias en estos animales en las macromoléculas y

los lípidos para la comparativa con los animales tratados durante 7 días, y únicamente en GPC+PCh en la que incluyó a los tratados durante 21 días. A su vez, el tratamiento con NAC de 7 días también indujo cambios en las macromoléculas y los lípidos. El tratamiento con NAC durante toda la gestación produjo cambios, además de en GPC+PCh, en NAA+NAAG y las MM20+Lip20. Los tests post-hoc posteriores únicamente mostraron diferencias entre los animales MIS control y los tratados durante 7 días en la MM09+Lip09, con un aumento de la concentración de este metabolito en los animales tratados. Por otra parte, aunque no existan más diferencias estadísticamente significativas, parece existir un muy leve aumento de la concentración de NAA+NAAG y las macromoléculas en los animales MIS tratados durante 21 días.

Figura 3.19.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la concentración de cinco metabolitos en la corteza y el hipocampo

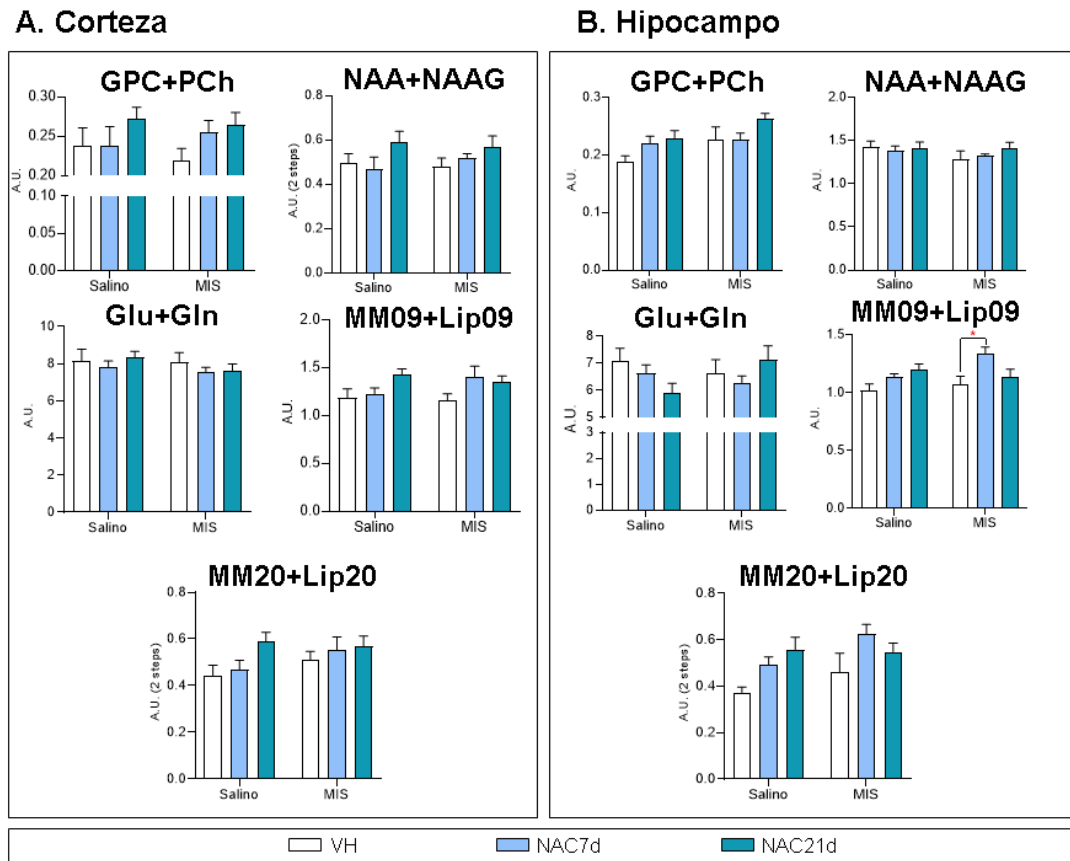


Fig. 3.19. Representación de los cambios en las concentraciones de cinco metabolitos en corteza cerebral e hipocampo de animales Salino y MIS y efecto del tratamiento preventivo con NAC durante la gestación (Salino VH: 7, Salino NAC7d: 12, Salino NAC21d: 12, MIS VH: 6, MIS NAC7d: 12, MIS NAC21d: 12). Las columnas muestran la concentración relativa media de cada grupo (promedio \pm SEM). Sobre el gráfico se muestran los resultados del test post-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$ vs MIS VH).

2.3. Estudio de marcadores de estrés oxidativo e inflamación

Del mismo modo que en el Estudio I, en el Estudio II se analizaron las diferencias en marcadores de estrés oxidativo e inflamación en cuatro regiones cerebrales: corteza prefrontal, hipocampo, amígdala y caudado-putamen. Los resultados más destacados se muestran en las Figuras 3.20., 3.21., 3.22. y 3.23., mientras que el resto se pueden consultar en los Anexos M, N y O.

2.3.1. Corteza prefrontal

En la corteza prefrontal (Figura 3.20.) el ANOVA (Anexos N y O) únicamente reveló diferencias entre los animales Salino y MIS en el marcador proinflamatorio iNOS. Este análisis demostró a su vez una modulación del tratamiento con NAC, en ambas ventanas, de este indicador. Además, en estos análisis el tratamiento durante 21 días también indujo cambios en MDA. A su vez, el test de Kruskal-Wallis reveló diferencias entre los grupos en los niveles de NRF2 en esta región cerebral.

Figura 3.20.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la concentración de marcadores de IOS en la corteza prefrontal

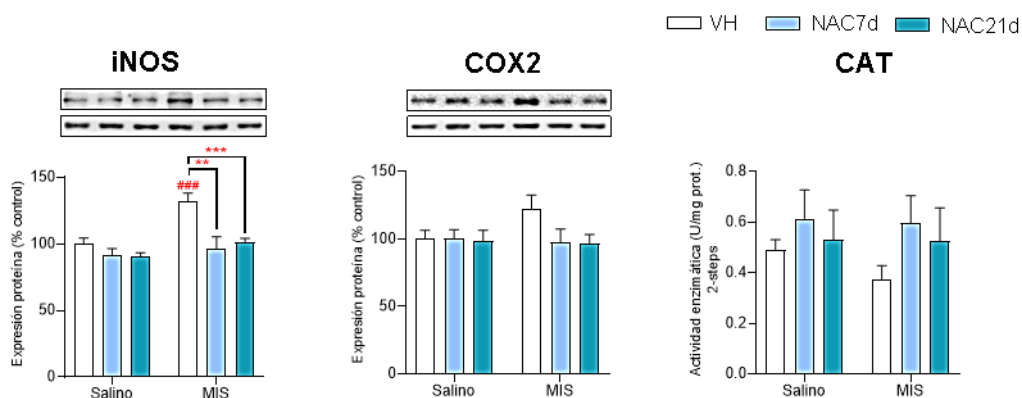


Fig. 3.20. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes derivados del tratamiento preventivo con NAC en la corteza prefrontal de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestran iNOS y COX2, dos marcadores proinflamatorios, y CAT, una enzima antioxidante. Las bandas representativas de iNOS y COX2 (bandas superiores) y del control de carga, β -actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (### $p < 0.001$ vs Salino-VH; *** $p < 0.001$ vs MIS-VH).

Los análisis post-hoc revelaron a su vez la prevención del incremento en iNOS presente en los animales MIS tratados con NAC, corroborando los resultados encontrados en la periadolescencia. Además, los animales MIS también presentaron un leve incremento, no significativo, de otra molécula proinflamatoria, COX-2, que también fue

disminuida por el tratamiento con NAC, aunque sin alcanzar la significancia estadística. La actividad enzimática de la catalasa también se redujo ligeramente en los animales MIS sin tratar y, con el tratamiento con NAC, se incrementó parcialmente, pero, de nuevo, sin ser estadísticamente significativo.

2.3.2. Hipocampo

En el hipocampo (**Figura 3.21.** y **Anexos M, N y O**) el ANOVA mostró cambios muy significativos en COX2 entre animales Salino y MIS. Los tratamientos, a su vez, no mostraron un efecto estadísticamente significativo para este marcador. El tratamiento durante 7 días sí mostró ser eficaz modulando iNOS y CAT, mientras que el de 21 días fue capaz de actuar también sobre iNOS, NQO1 y CAT. Estos dos últimos marcadores también mostraron ser modulados por el tratamiento de 21 días en los análisis post-hoc, revelando un aumento de CAT, estadísticamente significativo en los animales sanos, y de NQO1, estadísticamente significativo en los animales MIS tratados.

Es destacable también el incremento inesperado de iNOS en los animales tratados con NAC (**Anexos N y O**) que encontramos en esta región, en contra de lo visto hasta el momento y de lo previsto.

Figura 3.21.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la concentración de marcadores de IOS en el hipocampo

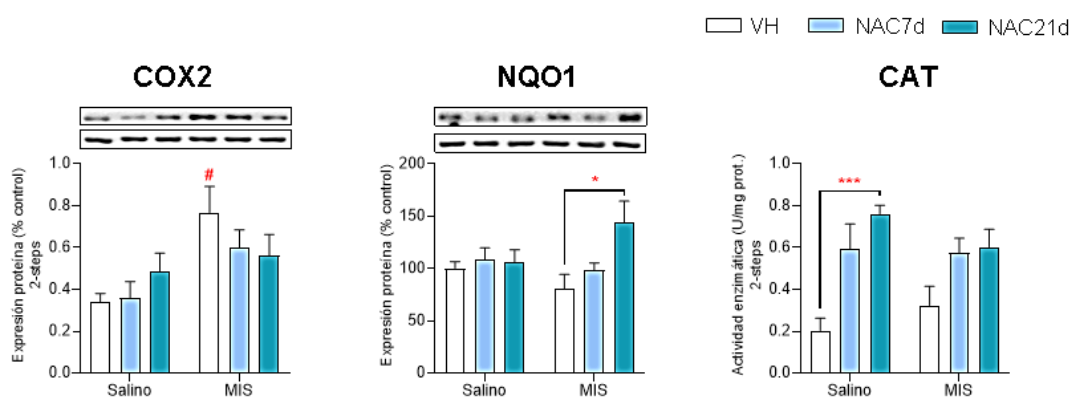


Fig. 3.21. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes derivados del tratamiento preventivo con NAC en el hipocampo de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestran COX2, un marcador proinflamatorio, NQO1, un compuesto relacionado con el estrés oxidativo, y CAT, una enzima antioxidante. Las bandas representativas de COX2 y NQO1 (bandas superiores) y del control de carga, β -actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (# $p < 0.05$ vs Salino-VH; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs MIS-VH).

2.3.3. Amígdala

En la amígdala (**Figura 3.22.** y **Anexos M, N y O**) el análisis de ANOVA reveló cambios entre los animales Salino y MIS en iNOS, COX2 y NRF2. El tratamiento con NAC en ambas ventanas mostró un efecto modulador sobre COX2. A su vez, administrado durante 7 días, el tratamiento con NAC mostró ser eficaz modulando también GSSG, mientras que, durante 21 días, lo hizo sobre NQO1 y CAT.

Figura 3.22.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la concentración de marcadores de IOS en la amígdala

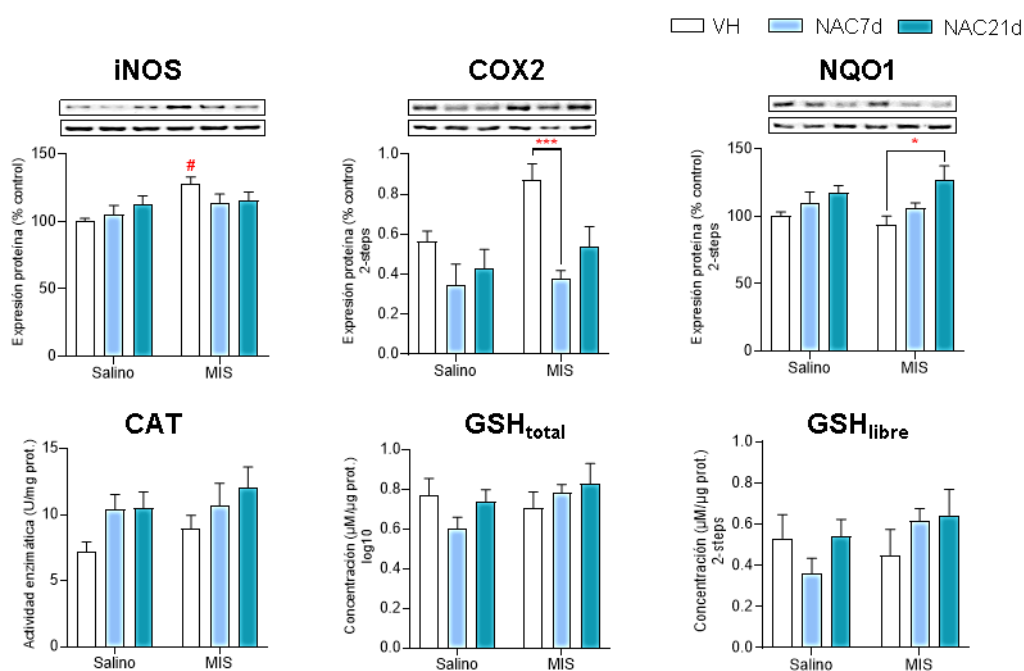


Fig. 3.22. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes derivados del tratamiento preventivo con NAC en la amígdala de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestran iNOS y COX2, dos marcadores proinflamatorios, NQO y el GSH total y libre, compuestos relacionados con el estrés oxidativo, y CAT, una enzima antioxidante. Las bandas representativas de iNOS, COX2 y NQO1 (bandas superiores) y del control de carga, β-actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media ± SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (# $p < 0.05$ vs Salino-VH; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs MIS-VH).

Los análisis post-hoc posteriores confirmaron parte de estas tendencias, que venían siendo la norma en el resto de estructuras y en el Estudio I. El incremento típico de la expresión de iNOS en los animales MIS fue parcialmente prevenido por los tratamientos con NAC, aunque sin alcanzar la significación estadística, como sí ocurría en el caso de la corteza prefrontal. La prevención completa, con corroboración estadística, tras el tratamiento con NAC sí se alcanzó en el caso del marcador prooxidante COX-2, también

sobreexpresado en los animales MIS. Tanto NQO1 como la catalasa presentaron un incremento en los animales tratados con NAC, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo. En los animales MIS tratados con NAC se observó también un muy leve incremento del GSH total y el GSH libre, tampoco corroborado a nivel estadístico.

2.3.4. Caudado-putamen

En el caudado-putamen (**Figura 3.23.** y **Anexos M, N y O**) apenas sí hubo diferencias en el ANOVA. En este análisis los animales MIS presentaron diferencias, en comparación con los Salino, en COX2, MDA, KEAP1 y GPx. El tratamiento de 7 días tuvo un efecto sobre KEAP1 y NQO1, mientras que el de 21 lo tuvo sobre COX2, CAT, GSSG y también sobre NQO1. Este marcador antioxidante mostró un incremento estadísticamente significativo (test de Bonferroni) en los animales MIS tratados durante 21 días. HO1, otro marcador antioxidante, parece asumir la misma tendencia en estos animales, aunque en este caso no hay corroboración estadística.

Figura 3.23.

Efecto de la N-acetilcisteína durante la gestación en la concentración de marcadores de IOS en el caudado-putamen

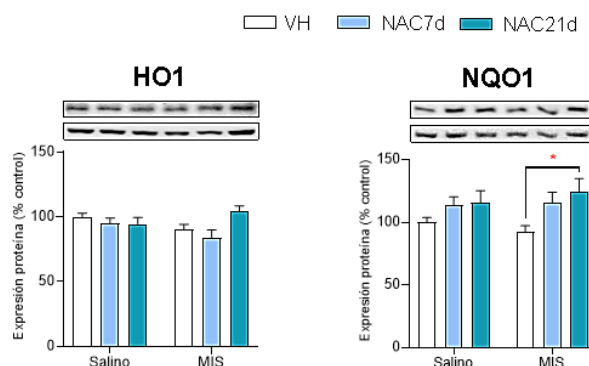


Fig. 3.23. Esta figura muestra algunos de los cambios bioquímicos más relevantes derivados del tratamiento preventivo con NAC en el caudado-putamen de animales Salino y MIS (8 animales/grupo). Específicamente, se muestran HO1 y NQO1, dos compuestos relacionados con el estrés oxidativo. Las bandas representativas de HO1 y NQO1 (bandas superiores) y del control de carga, β -actina (bandas inferiores) se muestran sobre los gráficos correspondientes. Cada columna representa la media \pm SEM para cada grupo. Sobre las columnas se indica el resultado del test post-hoc de Bonferroni para cada comparativa (* $p < 0.05$ vs MIS-VH).

2.4. Análisis de la microbiota fecal a nivel de familia, género y especie

Además del cerebro, se extrajo también el ciego, con el objetivo de analizar la microbiota fecal y evaluar así, de manera indirecta, el estado del eje intestino-cerebro.

Concretamente, en el modelo MIS del neurodesarrollo, evaluamos las posibles diferencias existentes en la concentración de diferentes filos, familias, géneros y especies microbianas, para después determinar, en el caso de las que resultasen diferenciales, qué efecto tenía el tratamiento preventivo con NAC sobre ellos. Los resultados a nivel de filo se muestran en el **Anexo P**. Los resultados globales a nivel de familia se pueden ver en un gráfico de barras anidado en la **Figura 3.24.** y en el **Anexo Q**. Además, una selección de los resultados más significativos a nivel de familia y de especie se puede ver también en las **Figuras 3.25.** y **3.26.**, respectivamente. Los resultados completos a nivel de género y especie se encuentran también en el **Anexo R**.

Figura 3.24.

Porcentaje de familias bacterianas en los seis grupos de estudio

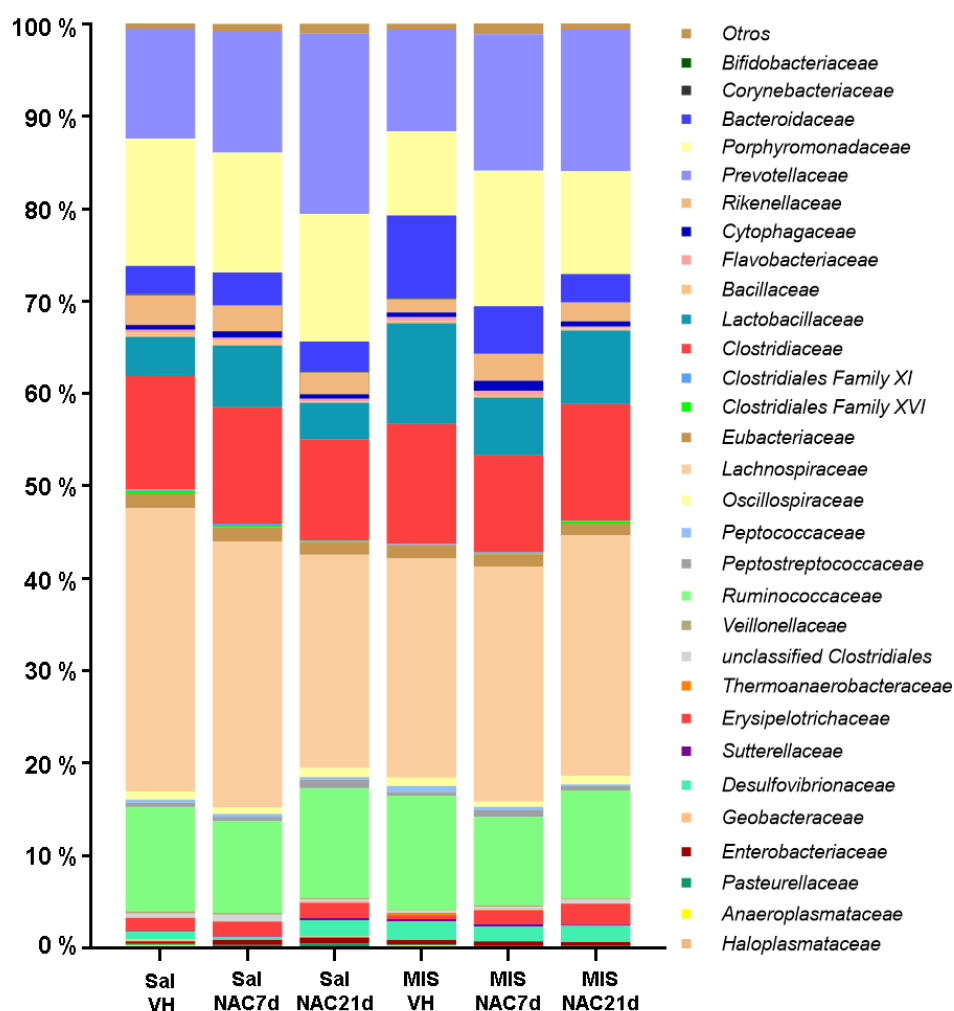


Fig. 3.24. Gráfico de barras anidado con los porcentajes de las familias bacterianas con mayor representación en la microbiota bacteriana para los seis grupos de estudio (Salino-VH: 8, Salino-NAC7d: 11, Salino-NAC21d: 11, MIS-VH: 11, MIS-NAC7d: 11, MIS-NAC21d: 11). Son especialmente visibles las diferencias entre el grupo MIS VH y el resto en las familias *Bacteroidaceae* y *Lactobacillaceae*.

A nivel de filo (**Anexo P**) los análisis por Kruskal–Wallis únicamente identificaron diferencias entre grupos en *Firmicutes* y *Deferribacteres*. En el resto de filos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 3.25.

Selección de familias bacterianas más representativas en los seis grupos de estudio

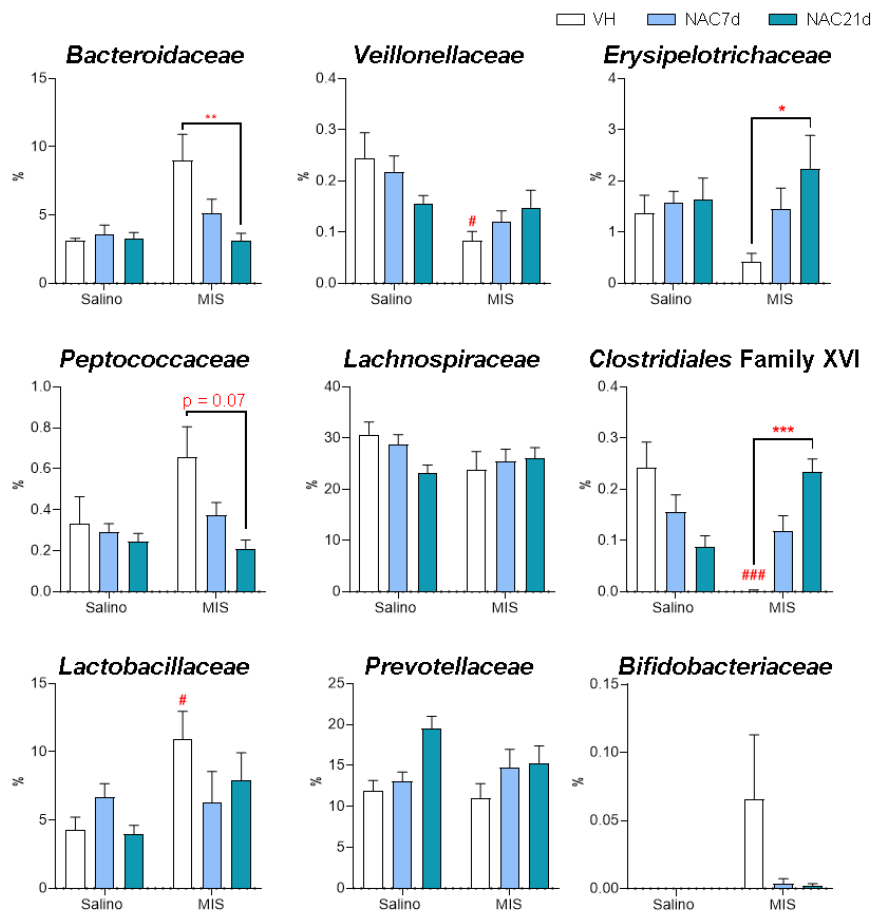


Fig. 3.25. Representación de algunas familias bacterianas alteradas en el modelo MIS o por el tratamiento con NAC en la gestación (Salino-VH: 8, Salino-NAC7d: 11, Salino-NAC21d: 11, MIS-VH: 11, MIS-NAC7d: 11, MIS-NAC21d: 11). Cada columna representa la media del porcentaje de cada familia bacteriana para cada grupo (promedio \pm SEM). Sobre las columnas se muestran los resultados del test post-hoc de Dunn (# $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs Salino VH; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $p = 0.07$ vs MIS VH).

A nivel de familias (**Figuras 3.24. y 3.25.y Anexo Q**), las principales diferencias las podemos encontrar en familias bacterianas relacionadas con el metabolismo del ácido láctico, como son *Bacteroidaceae*, *Lactobacillaceae* o *Bifidobacteriaceae*. En los tres casos, el análisis mediante Kruskal–Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La concentración de bacterias pertenecientes a estas familias es

considerablemente mayor en los animales MIS sin tratar en comparación con los animales Salino VH, aunque estas diferencias únicamente alcanzan la significación estadística en el caso de *Lactobacillaceae*. Además, los tratamientos preventivos con NAC, especialmente el de 21 días, logran reducir este incremento, aunque de manera más leve en el caso de la familia *Lactobacillaceae*. No obstante, este efecto preventivo sólo se corrobora estadísticamente con el test de Dunn en el caso de la familia *Bacteroidaceae*. Los incrementos a nivel de familia se ven sustentados por incrementos a nivel de especie en miembros concretos de estas familias. En la familia *Bacteroidaceae* estas tendencias son especialmente notables en las especies *Bacteroides acidifaciens*, *Bacteroides dorei* y *Bacteroides uniformis*. En el caso de la familia *Lactobacillaceae*, las diferencias son especialmente notables en *Lactobacillus kitasatonis*. Por último, en la familia de *Bifidobacteriaceae* el incremento en los animales MIS es debido principalmente a la especie *Bifidobacterium animalis*. Hay también una diferencia importante, corroborada estadísticamente por los tests de Kruskal–Wallis y Dunn entre el grupo control sano y el grupo del modelo sin tratar en la familia XVI de los *Clostridiales*. En este caso, no hay presencia de miembros de esta familia en los animales MIS, al contrario que en los animales salino. El efecto de la NAC en este caso es, curiosamente, opuesto: por un lado, disminuyó el porcentaje de bacterias de esta familia en los animales Salino, mientras que lo incrementó en los animales MIS, en ambos casos de manera dosis–dependiente. Este efecto antagónico de la NAC se observó también en la familia *Veillonellaceae*, en la que los animales MIS tienen un menor porcentaje de bacterias que los animales salino y en la que la NAC tiende a disminuir o a incrementar su concentración, respectivamente. La NAC ejerce un efecto claro en otras familias bacterianas, como son *Erysipelotrichaceae*, aumentando la presencia de estas bacterias en los animales MIS, o *Peptococcaceae*, disminuyéndola. En otras familias con gran representación como son *Lachnospiraceae* o *Prevotellaceae* la NAC parece ejercer también un efecto modulador, pero no tan fuerte como los previamente enunciados, y sin alcanzar la barrera de la significación estadística.

Finalmente, a nivel de especie (**Figura 3.26.** y **Anexo R**), más allá de los mencionados cambios en los miembros de *Bacteroidaceae*, *Lactobacillaceae* y *Bifidobacteriaceae*, encontramos también alteraciones, o bien por efecto del modelo MIS, o bien por efecto de los distintos tratamientos con NAC, en algunas especies. Aunque no sea estadísticamente significativo, encontramos una disminución del porcentaje de bacterias *Acetatifactor* en los animales MIS que los tratamientos con NAC logran aumentar en estos animales hasta valores incluso superiores de los encontrados en los animales Salino VH. Otro resultado interesante es el encontrado en *Corynebacterium stationis*, una especie bacteriana que se encuentra presente en los animales sanos, tanto tratados con NAC como sin tratar, pero no aparece en absoluto en los animales MIS, tanto tratados como no tratados. Algunas especies muestran un aumento progresivo y dependiente de la

dosís tras los tratamientos con NAC, tanto en los animales salino como en los MIS. Ése es el caso de *Candidatus arthromitus*, *Clostridium hiranonis* o el género *Desulfovibrio*. Además, encontramos diferencias también en los géneros *Roseburia* y *Turicibacter*. En ambos casos, los animales MIS presentan una leve disminución del porcentaje de estas bacterias que el tratamiento con NAC, especialmente el de 21 días, logra prevenir.

Figura 3.26.

Selección de géneros y especies bacterianas más representativas en los seis grupos de estudio

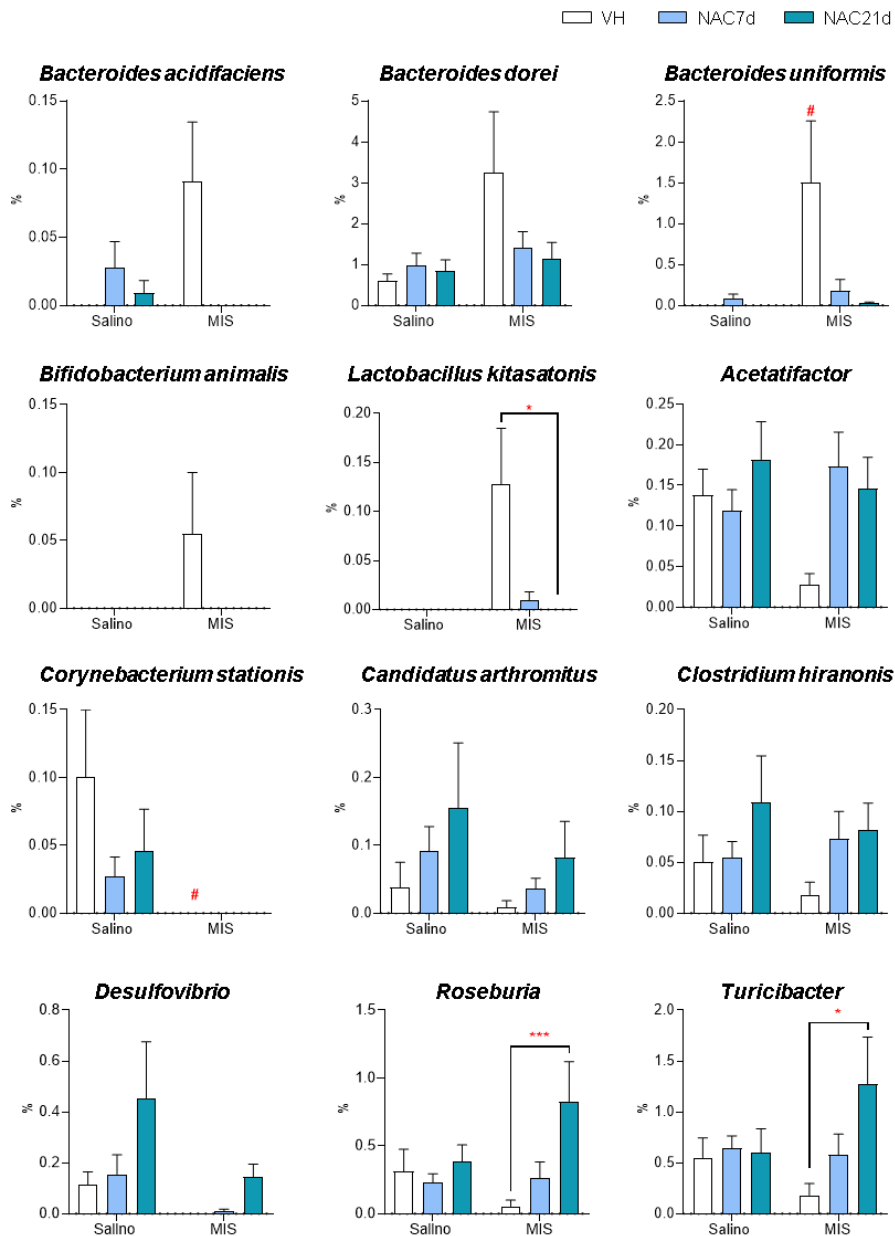


Fig. 3.26. Representación de algunos géneros y especies bacterianas alteradas en el modelo MIS o por el tratamiento con NAC en la gestación (Salino VH: 8, Salino NAC7d: 11, Salino NAC21d: 11, MIS VH: 11, MIS NAC7d: 11, MIS NAC21d: 11). Cada columna representa la media del porcentaje de cada género o especie bacteriana para cada grupo (promedio ± SEM). Sobre las columnas se muestran los resultados del test post-hoc de Dunn (# $p < 0.05$ vs Salino VH; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs MIS VH).

3. Estudio III: Análisis bioinformático de fármacos con uso potencial en el tratamiento de la esquizofrenia

Con el objetivo de identificar fármacos con potencial uso en el tratamiento de la esquizofrenia, utilizamos el Connectivity Map (CMap) del Broad Institute (MIT) (<https://www.broadinstitute.org/connectivity-map-cmap>), que contiene más de 1,5 millones de firmas transcripcionales procedentes de células humanas expuestas a alrededor de 5000 fármacos y 3000 alteraciones genéticas (sobrexpresión y depleción de genes) (109,249), fijándonos en aquellas firmas transcripcionales de fármacos que fueran opuestas a firmas transcripcionales derivadas de esquizofrenia (firmas reversoras) (Figura 3.27.). Los resultados completos de estos análisis se muestran en el Anexo S debido a su extensión.

Figura 3.27.

Funcionamiento de la herramienta CMap aplicada a la esquizofrenia o al modelo MIS

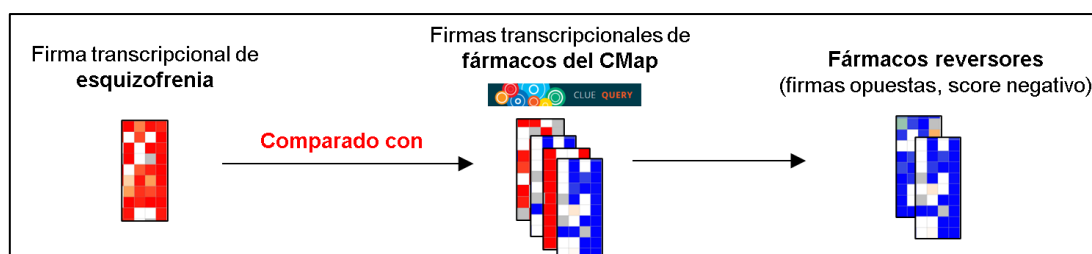


Fig. 3.27. Las firmas transcripcionales procedentes de animales del modelo MIS o de pacientes con esquizofrenia se comparan con las firmas transcripcionales de los fármacos de la base de datos del CMap, con el objetivo de encontrar firmas opuestas que, previsiblemente, revertirían las firmas relacionadas con esquizofrenia originales.

3.1. Análisis de CMap a partir de datos transcriptómicos procedentes de un modelo MIS inducido con Poly I:C

En primer término, se decidió realizar el análisis de CMap a partir de datos transcriptómicos extraídos del artículo publicado por Mattei *et al* (244). En este estudio, los datos se obtuvieron mediante un RNA-seq realizado en células microgliales de ratones que habían sido expuestos a Poly I:C en el periodo prenatal. La elección de este estudio en primer lugar se hizo con el objetivo de encontrar fármacos con un perfil reversor de las modificaciones transcriptómicas presentes en el modelo MIS inducido por Poly I:C.

El análisis de compuestos en CMap (CMap Compounds), realizado a partir de los datos de genes upregulados del artículo de Mattei *et al*, mostró 278 fármacos con un “score” entre -90 y -100 y, por tanto, con un potencial efecto reversor. En la **Tabla 3.1.** se muestra el top 20 de fármacos con un “score” más negativo, ordenados desde el más próximo a -100 (mayor potencial reversor) al menos negativo (listado completo en el

Anexo S). En la **Tabla 3.1.** se muestra también la familia o clase a la que pertenece cada fármaco.

Tabla 3.1.

Fármacos con una mayor correlación negativa con las firmas transcriptómicas procedentes de la microglía de animales del modelo MIS

	Fármaco	Familia de fármacos	Score
1	LY-2140023	Agonista de los receptores de glutamato	-99.93
2	Repaglinida	Secretagogo de insulina	-99.93
3	TG100-115	-	-99.93
4	Tomelukast	Antagonista de los receptores de leucotrienos	-99.93
5	VU-0420363-1	Inhibidor de proteasas 3C-like del SARS COV	-99.93
6	Metazolamida	Inhibidor de la anhidrasa carbónica	-99.90
7	BAS-09104376	Inhibidor de la integrasa del VIH	-99.86
8	BRL-50481	Inhibidor de la fosfodiesterasa	-99.86
9	Guanfacina	Agonista de los receptores adrenérgicos	-99.86
10	Huperzina A	Inhibidor de la acetilcolinesterasa	-99.86
11	Desloratadina	Antagonista de los receptores de histamina	-99.82
12	Diltiazem	Bloqueador de los canales de calcio	-99.79
13	BML-190	Agonista inverso de receptores de cannabinoides	-99.75
14	Tirfostin-AG-1295	Inhibidor de los receptores de PDGFR	-99.75
15	Gliquidona	Sulfonilurea	-99.72
16	Lapatinib	Inhibidor de EGFR	-99.72
17	N-(3-acetamidofenil)-3-clorobenzamida	Antagonista de los receptores de glutamato	-99.72
18	SJ-172550	Inhibidor de MDM	-99.72
19	Tranilast	Inhibidor de angiogénesis	-99.72
20	Clobenpropita	Antagonista de los receptores de histamina	-99.68

T3.1. En la tabla se muestran los 20 fármacos, identificados mediante el CMap, con un “score” de similitud más negativo y que más inversamente correlacionan con las firmas transcriptómicas procedentes de la microglía de animales del modelo MIS, procedentes del artículo de Mattei *et al.* (244).

Por su parte, el análisis de las familias o clases (CMap Classes) con un “score” más negativo nos mostró 18 categorías con un “score” entre -90 y -100 (listado completo en el **Anexo S**). Esta categoría del CMap hace referencia tanto a grupos de fármacos clasificadas en base a su función básica sobre receptores o proteínas concretas (por ejemplo, inhibidores de la recaptación de noradrenalina) como a conjuntos de fármacos que producen un efecto similar al que tiene la activación o la inhibición de un gen o proteína concreto (por ejemplo, la categoría “Pérdida de función de las fosfolipasas”), y que estarían asociadas con inducción de patología.

Por último, se realizó el **análisis de DSEA** (“drug set enrichment analysis”) con R, a partir de los datos de los análisis anteriores. El DSEA se basa en el método GSEA, o “gene set enrichment analysis”, que permite identificar familias de genes que están enriquecidas en un contexto experimental concreto utilizando una lista de genes ordenados en base a su expresión y un archivo que categoriza cada gen en una familia concreta. En el caso del DSEA, una lista de los fármacos de cada estudio ordenados en base a su “score” equivale a la lista ordenada de genes, y un archivo que categoriza cada fármaco en una familia concreta corresponde al otro input del GSEA para producir el DSEA. En este estudio, los resultados del DSEA mostraron el enriquecimiento de 8 familias de fármacos de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Estos resultados son visibles en la **Tabla 3.2**. En este análisis, uno de los resultados más destacables es el enriquecimiento diferencial que revelan los fármacos antagonistas de los receptores adrenérgicos, con un importante número de compuestos con un perfil reversor de las firmas transcriptómicas procedente del modelo.

Tabla 3.2.

Análisis de DSEA a partir de las firmas transcriptómicas procedentes de la microglía de animales del modelo MIS

	Familia de fármacos	Perfil	NES	pval	padj
1	Inhibidor de HCV		-1,87	0,0003	0,033
2	Inhibidor de MDM		-1,85	0,0059	0,220
3	Antifolato bacteriano		-1,73	0,0074	0,250
4	Inhibidor del receptor de PDGFR		-1,65	0,0260	0,600
5	Inhibidor de la integrasa del VIH		-1,59	0,0350	0,600
6	Antagonista de los receptores adrenérgicos		-1,46	0,0350	0,600
7	Inhibidor de dipeptidil peptidasas		-1,58	0,0390	0,600
8	Activador de los canales de calcio		-1,59	0,0470	0,600

T3.2. En la tabla se muestran las 8 familias de fármacos obtenidas como resultado del análisis de DSEA ($p < 0.05$). La columna del perfil identifica tanto el número de fármacos de la familia como su posición en el ranking de fármacos. Cuanto más a la derecha se encuentre el fármaco, mayor será su perfil reversor y más negativo su “score”. La columna de NES (normalized enrichment score) indica cuánto de negativo es el “score” de los fármacos que componen esta familia y, por tanto, una medida aproximada del potencial efecto reversor. Las dos columnas de la derecha indican el p-valor y el p-valor ajustado.

3.2. Análisis de CMap a partir de datos transcriptómicos procedentes de muestras corticales de pacientes con esquizofrenia

Tras el análisis a partir de un estudio realizado en el modelo MIS, comprobamos—cuáles eran los fármacos con un mayor potencial reversor a partir de datos procedentes del campo clínico. Para ello, seleccionamos el artículo publicado por **Gandal *et al*** (245), en el que se mostraban las diferencias transcriptómicas a nivel cortical entre pacientes con esquizofrenia e individuos sanos. La elección de este artículo tras el mostrado en el 3.1. en lugar de otros, también enfocados en el trastorno humano y con metodologías similares, se basó principalmente en el gran tamaño muestral, con 559 sujetos con esquizofrenia analizados y 936 controles.

Tabla 3.3.

Fármacos con una mayor correlación negativa con las firmas transcriptómicas procedentes de la corteza de pacientes con esquizofrenia

	Fármaco	Familia de fármacos	Score
1	Desoxipeganina	Inhibidor de la acetilcolinesterasa	-99.93
2	Esmolol	Antagonista del receptor adrenérgico	-99.93
3	L-BSO	Inhibidor de la transferasa de glutatión	-99.93
4	Nicergolina	Antagonista del receptor adrenérgico	-99.93
5	Practolol	Antagonista del receptor adrenérgico	-99.93
6	Enalapril	Inhibidor de ACE	-99.89
7	RO-60-0175	Agonista del receptor de serotonina	-99.89
8	7,8-dihidro-L-biopterina	Inhibidor de la aldolasa de dihidroneopterina	-99.82
9	CAY-10577	Inhibidor de la caseinquinasa	-99.82
10	Palonosetrón	Antagonista del receptor de serotonina	-99.82
11	Rosuvastatina	Inhibidor de HMGCR	-99.82
12	Filoquinona (Vitamina K1)	Vitamina K	-99.79
13	Acetil-geranigeranil-cisteína	Inhibidor de la metil-esterificación de proteínas geranilgeraniladas	-99.75
14	TGX-221	Inhibidor de PI3K	-99.75
15	Gestrinona	Antagonista del receptor de progesterona	-99.72
16	GSK-429286A	Inhibidor de quinasas asociadas a Rho	-99.72
17	Harpagosida	Inhibidor de la acetilcolinesterasa	-99.72
18	IB-MECA	Agonista del receptor de adenosina	-99.72
19	Fenitoína	Hidantoína antiepiléptico	-99.68
20	Meptazinol	Agonista del receptor de opioide	-99.65







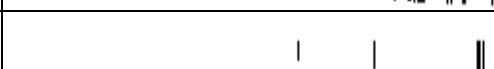
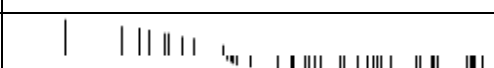
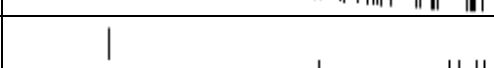
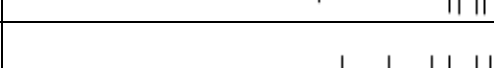
T3.3. En la tabla se muestran los 20 fármacos, identificados mediante el CMap, con un score de similitud más negativo y que más inversamente correlacionan con las firmas transcriptómicas procedentes de la corteza de pacientes con esquizofrenia, procedentes del artículo de Gandal *et al.* (245).

El análisis de compuestos de CMap mostró 277 fármacos con “scores” entre -90 y -100, una cifra muy similar a la presentada en el estudio anterior. Los 20 compuestos

con un “score” más negativo y, por tanto, un mayor potencial reversor, se muestran en la **Tabla 3.3**. El listado completo se muestra en el **Anexo S**. El fármaco con un “score” más negativo es la desoxipeganina, un compuesto inhibidor de la acetilcolinesterasa, función compartida con la NAC (253). Destaca también la presencia de fármacos capaces de actuar sobre distintos sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico o el adrenérgico, del mismo modo que en el análisis presentado antes. El análisis de clases de fármacos con un “score” comprendido entre -90 y -100 mostró 19 clases, una más que en el estudio preclínico, y cuyos miembros se muestran en el **Anexo S**. En este caso, es destacable que la familia de fármacos con un mayor potencial reversor son los inhibidores de la subunidad 30S ribosomal, una función que, como se ha mencionado en la introducción, comparte con la minociclina.

Tabla 3.4.

Análisis de DSEA con las firmas transcriptómicas procedentes de la corteza de pacientes con esquizofrenia

	Familia de fármacos	Perfil	NES	pval	Padj
1	Bloqueador de los canales de sodio		-2.12	0.0005	0.019
2	Inhibidor de MEK		-1.95	0.0018	0.055
3	Inhibidor de PI3K		-1.95	0.0018	0.055
4	Inhibidor de la fosfodiesterasa		-1.71	0.0093	0.180
5	Inductor de HSP		-1.54	0.0160	0.270
6	Antagonista del receptor adrenérgico		-1.50	0.0240	0.330
7	Antagonista del receptor de endotelina		-1.59	0.0270	0.340
8	Agonista del receptor adrenérgico		-1.50	0.0310	0.340
9	Inhibidor de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano		-1.58	0.0310	0.340
10	Inhibidor de quinasas asociadas a Rho		-1.58	0.0310	0.340

T3.4. En la tabla se muestran las 10 familias de fármacos obtenidas como resultado del análisis de DSEA ($p < 0.05$). El perfil indica el número de fármacos de la familia y su “score”. La columna de NES (normalized enrichment score) indica cuánto de negativo es el “score” de los fármacos que componen esta familia y, por tanto, una medida aproximada del potencial efecto reversor. Las dos columnas de la derecha indican el p-valor y el p-valor ajustado.

Finalmente, el análisis de DSEA mostró 10 familias enriquecidas de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Estos resultados se muestran en la **Tabla 3.4**. De nuevo, nos encontramos con un enriquecimiento significativo en fármacos inhibidores de la subunidad 30S ribosomal, así como moduladores del sistema adrenérgico, del

mismo modo que el presentado en el estudio previo (Tabla 3.2.), si bien esta vez aparecen tanto agonistas como antagonistas de este sistema de neurotransmisión, algo esperable teniendo en cuenta la amplia diversidad de receptores en esta familia y sus diferentes funciones activadoras e inhibitorias.

3.3. Análisis integrativo de los cinco estudios seleccionados

En primer lugar, comparamos los resultados de CMap de los estudios de Mattei *et al* y Gandal *et al*, con el objetivo de buscar fármacos comunes que pudiesen revertir las anomalías a nivel transcriptómico tanto en el modelo preclínico como en el trastorno humano. Para ello, se seleccionaron aquellos fármacos que tuviesen un “score” entre -90 y -100 en ambos análisis. **58 compuestos** mostraron tener un perfil reversor en ambos estudios. Entre éstos estaban la **doxiciclina** y el **ácido-alfa-linolénico**, un análogo de la minociclina y un precursor de ácidos grasos omega-3, respectivamente (la minociclina no entra dentro de los fármacos seleccionables al no constar en la base de datos original de compuestos de CMap). Además, tras los dos primeros análisis se quiso corroborar y comparar los datos con nuevos estudios. Por eso, se realizaron tres nuevos análisis: uno, con células *in vitro* y dos más con muestras clínicas de pacientes. En el primero, los datos transcriptómicos se obtuvieron a partir de células de la microglía que habían sido preexpuestas a Poly I:C (243). En los otros dos estudios, se analizaron las alteraciones transcripcionales en muestras de la DLPFC de pacientes con esquizofrenia (246,247).

Tabla 3.5.
Fármacos comunes a los 5 estudios analizados con un “score” entre -90 y -100

Fármaco	Familia de fármacos	Score				
		A	B	C	D	E
Carbetocina	Agonista de los receptores de oxitocina	-99.47	-91.00	-92.37	-96.83	-99.44
Etamiván	Estimulante respiratorio	-98.56	-92.70	-97.00	-97.04	-97.32
CG-930	Inhibidor de JNK	-98.37	-99.44	-99.89	-99.54	-99.72
PT-630	Inhibidor de dipeptidil peptidasas	-97.97	-99.05	-90.63	-97.36	-98.98
GSK-429286A	Inhibidor de quinasas asociadas a Rho	-97.74	-99.72	-99.33	-95.77	-99.65
Ácido alfa-linolénico	Estimulante de ácidos grasos Omega 3	-95.30	-90.60	-99.61	-97.69	-94.67
Doxiciclina	Inhibidor de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano	-93.06	-92.82	-99.01	-98.84	-90.93

T3.5. En la tabla se muestran los 7 fármacos, identificados mediante el CMap, con un “score” entre -90 y -100, comunes a los cinco estudios (A: Mattei *et al* (244), B: Gandal *et al* (245), C: Das *et al* (243), D: Fromer *et al* (246), E: Sabunciyan *et al* (247)). Aparecen resaltadas las dos últimas filas, con el ácido alfa-linolénico y la doxiciclina, dos fármacos con mecanismos de acción análogos a los ácidos omega-3 y la minociclina, respectivamente.

De nuevo, se quiso corroborar qué fármacos presentaban un perfil común reversor en los cinco estudios al mismo tiempo, para lo que se seleccionaron aquellos compuestos con un “score” comprendido entre -90 y -100 en todos los análisis. La comparativa mostró 7 fármacos comunes a los cinco estudios, entre los que se encontraban, de nuevo, la doxiciclina y el ácido-alfa-linolénico (**Tabla 3.5.**). Además, en el **Anexo S** se muestra el listado completo con los resultados de los nuevos análisis.

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos hasta el momento nos muestran, a varios niveles, el probable efecto beneficioso de varios fármacos antiinflamatorios y antioxidantes empleados como estrategias terapéuticas en un modelo animal asociado a esquizofrenia, así como la importancia de la prevención y la elección de las ventanas de tratamiento en patologías con una progresión crónica, como es el caso de los trastornos del neurodesarrollo. En esta Discusión se pretende demostrar esta aseveración, justificando para ello los resultados previamente descritos. No obstante, el objetivo de esta Tesis está probablemente más relacionado con lo exploratorio que con lo mecanístico. Por tanto, en primer lugar se enmarcarán los resultados obtenidos dentro de lo previamente observado, tanto en modelos preclínicos como en el trastorno humano, sin hacer más hincapié del necesario en su mecanismo molecular, al no ser éste el fin principal de nuestro estudio. Finalmente, en base a nuestros resultados, ofrecemos una perspectiva más global que encuadre nuestros resultados en un marco de debate más amplio dentro del panorama actual del campo, buscando la contribución que esta Tesis Doctoral persigue: su aportación en la búsqueda de estrategias terapéuticas frente a la aparición de la esquizofrenia.

1. Sobre el efecto de la N-acetilcisteína, los ácidos grasos omega-3 y la minociclina en la periadolescencia

1.1. Comportamiento: inhibición del prepulso

El reflejo de la respuesta de sobresalto y, por ende, la inhibición del prepulso (PPI), es considerada una medida operacional del proceso de inhibición preatencional cuyo déficit se ha correlacionado en numerosos estudios tanto en pacientes con esquizofrenia como en modelos animales asociados a este trastorno (254,255). La PPI, de este modo, puede reflejar la habilidad para regular la cantidad de información procesada al mismo tiempo, siendo esto clave en el proceso de filtrado de información relevante e irrelevante. En ese sentido, el modelo MIS inducido por Poly I:C ha mostrado, en distintos estudios, que es capaz de replicar este déficit presente en el trastorno humano, lo que le convierte en una herramienta muy eficaz de cara a valorar estrategias terapéuticas que tengan como objetivo la reversión o la prevención de este déficit (222). En la línea de lo ya descrito, nosotros también hemos observado estas alteraciones en animales que fueron sometidos a esta prueba en el día 70 de edad, es decir, a principios de la edad adulta. Los déficits son especialmente notables en los prepulsos de 80 y 86 dB, y

no tan visibles en el de 74 dB, probablemente por el bajo porcentaje de inhibición de los animales sanos para este pulso. Es posible que, con una intensidad de sonido tan baja, los animales no sean capaces de percibir el prepulso con la nitidez suficiente como para inhibir la respuesta posterior de sobresalto. Con todo, los déficits en la respuesta al sobresalto parecen quedar corroborados.

Los tratamientos con NAC, omega-3 y minociclina ejercieron un efecto desigual a la hora de prevenir estas alteraciones. Mientras que la administración de la NAC y los omega-3 impidió la aparición de estos déficits en la edad adulta, la MIN, aunque sí logró mejorar levemente la respuesta al sobresalto, no consiguió prevenir completamente esta deficiencia. **La NAC previno de manera contundente los déficits en PPI de los animales MIS**, consiguiendo mantener los niveles de inhibición de los animales sanos y llegando incluso a superarlos en el caso del prepulso más leve. El tratamiento con NAC ya había mostrado ser eficaz revirtiendo estas alteraciones conductuales en distintos modelos asociados a esquizofrenia (144,146,147), e incluso previniéndolas en un modelo de lesión en hipocampo ventral en rata (149). Se ha hipotetizado que la respuesta de PPI está mediada, entre otros componentes, por proyecciones que parten de la corteza prefrontal (256), una estructura cerebral que en varios modelos asociados a esquizofrenia ha evidenciado la presencia de alteraciones a nivel de las interneuronas. La NAC, a su vez, sería capaz no sólo de revertir, sino de prevenir el daño de estas células (149,152), lo que probablemente podría explicar el porqué de la efectividad de este fármaco a estos niveles. También se ha indicado que la NAC podría ejercer un efecto beneficioso sobre las fibras que parten de la corteza prefrontal, reduciendo la hipermielinización en un modelo en ratas Wistar generado por la administración de apomorfina (257). En nuestro estudio, la NAC es capaz de prevenir algunas de las alteraciones corticales de los niveles de marcadores de inflamación y el estrés oxidativo, lo que podría ser indicativo de cierto efecto neuroprotector a nivel de la corteza prefrontal.

Los omega-3 también logran evitar la aparición de déficits en la PPI en los animales MIS, aunque quizás sin llegar a los niveles de normalización alcanzados por la NAC. En cualquier caso, el efecto preventivo es perfectamente observable, en especial para los dos prepulsos de mayor intensidad. Al igual que con la NAC, este efecto era el hipotetizado y el previsible, teniendo en cuenta los efectos de los omega-3 en otros modelos asociados a esquizofrenia (180). Además, son varios los estudios que han mostrado la eficacia de los PUFAs regulando los niveles de dopamina en vías nerviosas asociadas con la esquizofrenia, como la mesolímbica, con la corteza prefrontal de nuevo implicada (258). No obstante, en este caso, aunque existe una mejora parcial de los niveles inflamatorios y del estrés oxidativo a nivel cortical debido a los omega-3, especialmente vía iNOS, los cambios no parecen ser tan sustanciosos como para justificar una mejora tan evidente de los déficits asociados a la respuesta al sobresalto. Aunque desconocemos

los mecanismos exactos detrás de este efecto preventivo, cabe hipotetizar un posible efecto regulador a nivel de neurotransmisión dopaminérgica en vías como la mesolímbica, muy asociadas a este déficit.

La minociclina, por otra parte, **no logró prevenir los déficits ligados a la respuesta de sobresalto** al mismo nivel que la NAC y los omega-3, si bien sí mejoró ligeramente los déficits de los animales MIS en esta prueba. Los resultados son cuanto menos sorprendentes, especialmente teniendo en cuenta el efecto neuroprotector que parece haber ejercido la minociclina a nivel de la corteza prefrontal, observable en los buenos resultados del análisis de regiones de interés en esta región. Además, estudios previos ya habían demostrado una reversión de los déficits en PPI en el modelo MIS (244,259). Curiosamente, el único estudio en el que se testó el efecto preventivo de este fármaco en un modelo de doble impacto asociado a esquizofrenia mostró una mejoría en esta prueba, pero sólo en aquellos animales expuestos a los dos estímulos (MIS + estrés). En aquellos que sólo recibieron el primer estímulo (MIS) tampoco se evidenció un efecto preventivo en la PPI (126). Teniendo en cuenta los efectos diferenciales de la minociclina en la PPI en función de cuándo ha sido administrado, así como su mecanismo principal de acción, esto nos podría estar hablando de un grado de activación diferencial de la microglía a lo largo de la enfermedad y, por tanto, de la inflamación, en el modelo MIS a lo largo del desarrollo de todo el espectro sintomático, del mismo modo que, se ha hipotetizado, ocurre en el trastorno humano (260,261). En cualquier caso, una explicación más tangible a nuestros resultados y las diferencias con otros estudios podía elaborarse simplemente por las grandes distinciones metodológicas entre unos y otros, con variaciones en las especies y los modelos usados, así como en las dosis y ventanas de administración.

1.2. Imagen por resonancia magnética: regiones de interés y VBM

La esquizofrenia está asociada a numerosas alteraciones tanto morfológicas como funcionales en distintas áreas cerebrales, entre las que se encuentran las analizadas en el estudio de regiones de interés. Se ha descrito que varias regiones corticales, especialmente la corteza prefrontal, el hipocampo, el cerebelo y el cerebro completo presentan un volumen inferior en este trastorno en comparación con individuos sanos (262-265), lo que estaría ligado a la aparición de muchos de sus síntomas. Del mismo modo, también se ha descrito un aumento del volumen del sistema ventricular en esquizofrenia (266). En el modelo MIS, ya se han descrito varias de estas anomalías neuroanatómicas (58,240). En nuestro análisis de regiones de interés, observamos las tendencias esperadas en los animales MIS: **aumento del tamaño de los ventrículos**, así como una **disminución parcial y limitada del volumen cerebral, cortical, cortical frontal, hipocampal y**

cerebelar. No obstante, la magnitud de los cambios fue menor de lo esperado, especialmente a tenor de lo visto en estudios previos.(267) Sorprendentemente, ninguno de los tratamientos logró revertir este aumento de tamaño del **sistema ventricular**. No obstante, en los análisis de morfometría cerebral por VBM pudimos analizar de manera más precisa el aumento ventricular en los animales MIS, señalando un incremento más significativo a nivel del tercer ventrículo. En este análisis, los tres tratamientos, especialmente la NAC, sí fueron capaces de revertir este déficit. En el caso de la minociclina y el omega-3, el efecto neuroprotector a nivel ventricular ya había sido descrito (268,269) pero, al menos bajo nuestro conocimiento, es la primera vez que se describe este efecto para la NAC, y la primera también, en este caso para los tres tratamientos, que se realiza siguiendo un enfoque preventivo.

La disminución del tamaño del **hipocampo** es también uno de los déficits más señalados en la neuroanatomía de la esquizofrenia. Su alteración se ha señalado como una de las posibles causas de la aparición de la sintomatología cognitiva del trastorno (270). Los análisis de ROIs que se realizaron en esta Tesis indican una tendencia similar, con una reducción del volumen hipocampal en los animales MIS, ya descrita en estudios previos (58). En este caso, los omega-3 sí logran prevenir esta disminución en estos animales. Un estudio anterior ya había demostrado que el omega-3 podía revertir la pérdida de volumen del hipocampo aunque, en este caso, en ratones de edad avanzada, tras un tratamiento más prolongado que el nuestro (8 semanas) (271). El efecto neuroprotector sobre este área podría ser debido a una inducción, por parte del omega-3, de la neurogénesis y la arborización dendrítica, así como a una reducción local de la apoptosis, lo que conduciría a un aumento del volumen neuronal, efectos ya descritos en otros estudios (272,273). Por otra parte, ni la NAC ni la minociclina lograron prevenir este déficit en el hipocampo y, lo que es más, en el análisis de VBM mostraron un efecto reductor en regiones pequeñas y muy localizadas en el hipocampo. Este efecto se produce en contra de lo esperado, especialmente teniendo en cuenta los beneficios a nivel hipocampal que se han descrito tanto para NAC como para minociclina en distintos modelos animales (274,275). Aunque no se había descrito previamente cómo afecta la minociclina al volumen del hipocampo, lo cierto es que sí existen estudios clínicos que muestran efectos contradictorios de la minociclina en la función cognitiva relacionada con el hipocampo. Por un lado, algunos ensayos clínicos realizados, tanto en esquizofrenia temprana como crónica, han mostrado mejorías en los déficits cognitivos relacionados con la memoria (203,204). Por otro, un estudio realizado con 20 personas sanas a las que se administró minociclina reportó un empeoramiento de la memoria, aunque más relacionada con déficits en el estriado que en el hipocampo (276). En cualquier caso, los cambios que mostramos no parecen ser lo suficientemente importantes como para que podamos hipotetizar posibles consecuencias relacionadas a nivel cognitivo.

A **nivel cerebelar**, son varios los estudios que han mostrado una reducción global o localizada de esta estructura en diferentes etapas de la esquizofrenia (277). De hecho, estudios recientes indican que una buena parte de la sintomatología tanto positiva como cognitiva podría estar relacionada con alteraciones en el circuito cerebral que conecta la corteza prefrontal, el tálamo y el cerebelo (278,279). A su vez, las anomalías en el cerebelo se han asociado con trastornos en el procesamiento auditivo (280), lo que podría estar relacionado con los déficits en la respuesta al sobresalto tras la presentación de un estímulo sonoro. En nuestro estudio, el análisis de ROIs deja entrever una leve reducción de volumen en este área en los animales MIS, pero no significativo. Los respectivos tratamientos, de igual manera, parecen prevenir esta leve disminución de volumen aunque, de nuevo, no significativamente. No obstante, en el análisis de VBM los tres tratamientos sí muestran ser efectivos aumentando el tamaño en regiones locales de esta estructura. Es especialmente notable este efecto en las regiones más corticales del cerebelo, donde además también podemos observar un aumento de la densidad de sustancia blanca en las mismas regiones, una alteración que, recordemos, sería específicamente responsable de parte de las alteraciones cognitivas en el trastorno humano. Es significativo también el hecho de que sea la NAC el fármaco responsable de los cambios más notables, especialmente teniendo en cuenta que también es el fármaco que parece haber ofrecido un mejor rendimiento previniendo los déficits cognitivos asociados a la PPI. Dada la probable relación entre las anomalías cerebelares y el procesamiento auditivo, estos resultados irían en la línea de lo previamente hipotetizado.

A **nivel cortical**, se ha evidenciado en numerosos estudios la pérdida de volumen y de sustancia gris, especialmente en regiones como la corteza prefrontal, estando esta disminución relacionada con la aparición y la gravedad de varios de los síntomas del trastorno. Este déficit ya había sido demostrado en el modelo MIS previamente (58). De nuevo, en nuestro estudio podemos corroborar, mediante el análisis de ROIs, esta disminución, tanto en la corteza completa como en la corteza prefrontal. Los tratamientos con los tres fármacos parecen prevenir estos déficits, aunque esa tendencia sólo se traduce en una significación estadística real en la prevención de la disminución del tamaño de la corteza prefrontal en los animales MIS tratados con minociclina. Aunque este resultado es esperado, por el potencial neuroprotector del antibiótico, es sorprendente que no veamos una respuesta terapéutica igual o incluso superior en el tratamiento con NAC y con omega-3, especialmente teniendo en cuenta que estos dos fármacos parecen prevenir en mayor medida los déficits conductuales asociados a la respuesta al sobresalto, mediados en gran parte por la corteza prefrontal. Quizás esto nos sugiera una mayor implicación de regiones no corticales en la regulación de este comportamiento, haciendo especial hincapié en el tálamo y, sobre todo, el cerebelo, región que, como ya hemos descrito, presenta una mayor densidad de sustancia gris en los animales tratados con los otros dos fármacos. Además, en el análisis de VBM se observa una reducción

leve a nivel talámico a causa del tratamiento con minociclina, lo que quizás, en cierto modo, pueda estar contrarrestando el efecto beneficioso a nivel cortical. Además, en el análisis de la sustancia gris realizado por VBM encontramos una aparente pérdida de volumen cortical bilateral a nivel de la corteza orbitofrontal (OFC) en los animales MIS tratados con omega-3. Aunque, aparentemente, esperamos encontrar un resultado opuesto a nivel cortical, lo cierto es que existe cierta controversia acerca de las variaciones en esta estructura en pacientes con esquizofrenia. De hecho, estudios previos han mostrado tanto una reducción (281) como un aumento (282) en el tamaño de esta estructura en pacientes con primer episodio psicótico.

El análisis de VBM de la sustancia gris nos mostró asimismo un interesante **aumento en áreas del hipotálamo** de los animales MIS como resultado del tratamiento con NAC. El hipotálamo, como componente del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), está encargado de mediar la respuesta biológica al estrés y, por tanto, debido a la importancia de este factor ambiental dentro de la etiopatogenia de la esquizofrenia, se ha hipotetizado una posible alteración del funcionamiento de este eje como parte de los déficits asociados al trastorno (283). No obstante, aunque la implicación del hipotálamo en la patología parece demostrada, no existe un gran consenso acerca de cómo estas alteraciones afectan al tamaño de la estructura. Algunos estudios hablan de un aumento del tamaño de esta estructura en pacientes con esquizofrenia, quizás debido al uso crónico de farmacología antipsicótica (284). Otros, en cambio, muestran una reducción volumétrica (285) y alguno incluso indica que no hay cambios en su tamaño (286). En nuestro estudio, más allá del efecto de la NAC en la sustancia gris de esta región, encontramos también un aumento de la sustancia blanca en los animales MIS, que es prevenida por los tres tratamientos. Tanto en el trastorno humano como en modelos animales asociados se ha reportado una degeneración y una pérdida localizada de sustancia blanca, principalmente relacionada con una atrofia de las fibras en regiones frontales y temporales y en el cuerpo calloso (287). No obstante, no hay apenas estudios que nos muestren el estado de las fibras que parten o llegan al hipotálamo. En un estudio de pacientes con depresión y psicosis, se mostró una disminución de la conectividad funcional de esta estructura, lo que podría estar indicando indirectamente una atrofia de las fibras neuronales locales (288). Varios estudios han mostrado el efecto protector de los tres fármacos en los axones neuronales (289-291), favoreciendo la mielinización y el mantenimiento de las fibras neuronales. Por tanto, su efecto disruptivo sobre las mismas resulta cuanto menos sorprendente. En cualquier caso, es probable que este supuesto efecto deletéreo no sea tal y simplemente nos esté indicando una reorganización de las fibras como resultado de un aumento de los somas neuronales y la sustancia gris en las mismas áreas, producido también por los tres tratamientos. Esta hipótesis se basa en los cambios parciales en la sustancia gris hipotalámica ya descritos para la NAC y, aun-

que no son visibles en los resultados mostrados para omega-3 y minociclina, sí aparecen, en el mismo sentido que la NAC, si imponemos un umbral estadístico más laxo en sus respectivas comparativas.

1.3. Imagen por tomografía de emisión de positrones: metabolismo de glucosa y actividad cerebral

Los estudios con **imagen PET** en pacientes con esquizofrenia nos han mostrado disfunciones tanto a nivel cortical como subcortical, con reducciones en el metabolismo de glucosa a nivel global y a nivel local (292). En este modelo, nuestro grupo había mostrado previamente diferencias en la actividad cerebral ligados al modelo MIS, con cambios a nivel cortical e hipocampal (240). Contra pronóstico, en este estudio **no fuimos capaces de identificar ningún efecto del MIS a nivel de metabolismo de glucosa cerebral**. Un umbral estadístico menos restrictivo sí nos muestra una alteración de la actividad cerebral en las regiones cerebelares que ya mostramos alteradas en los estudios morfométricos ya discutidos, lo que refuerza la idea de una posible alteración en esta estructura como punto clave para los déficits conductuales encontrados. Lo que parece evidente es que, en nuestro caso, las diferencias morfológicas que observamos no parecen estar correlacionadas, salvo quizás en el caso del cerebelo, con perturbaciones de la actividad cerebral. A su vez, los tratamientos preventivos tampoco provocaron cambios de una magnitud importante. Quizás el más reseñable es el **efecto de la minociclina sobre el metabolismo de glucosa en el cerebelo**. La administración del antibiótico en los animales MIS parece producir una disminución de la actividad cerebral en regiones amplias de esta estructura. El mismo resultado fue el que se encontró tras la administración del antipsicótico risperidona en un tratamiento preventivo en el mismo modelo (240). Además, otro estudio previo ha sugerido una probable sobreactivación de ciertas regiones cerebelares en pacientes con esquizofrenia que estarían ligadas con un incorrecto procesamiento cognitivo, así como con parte de la sintomatología positiva propia de este trastorno (293). Más allá de esta modificación, no encontramos muchos cambios a gran escala en respuesta a los tratamientos. La NAC no modificó la actividad cerebral en los animales MIS, aunque sí indujo un aumento del metabolismo cerebral en pequeñas regiones corticales frontales y del bulbo olfatorio en los animales sanos. El omega-3, por su parte, tampoco mostró ser capaz de modificar la actividad cerebral, más allá de una leve reducción metabólica, en los animales MIS, a nivel del núcleo mesencefálico profundo (DMN), una estructura que posibilita la conexión entre los ganglios basales de ambos hemisferios. En cualquier caso, tanto la NAC como el omega-3 no provocó cambios a una escala lo suficientemente importante como para poder determinar un posible efecto beneficioso en el metabolismo cerebral. Aunque hasta la fecha ningún estudio había examinado el efecto de ambos fármacos en el metabolismo de glucosa en este

modelo animal, su efecto modulador de la actividad cerebral sí había sido descrito en otros modelos, e incluso en clínica (294–296). No obstante, las diferencias metodológicas entre esos estudios –uno es en clínica, con pacientes de esclerosis múltiple y, los otros dos, preclínico en modelos animales diferentes al presentado aquí– son lo suficientemente grandes como para poder realizar comparaciones precisas. En cualquier caso, sí se puede hipotetizar que una administración más prolongada podría ser la responsable de la diferencia entre nuestro estudio y los referenciados. Por su parte, la minociclina probablemente se ha mostrado más eficaz modulando el metabolismo de glucosa cerebral por ejercer la mayoría de sus efectos a través de su interacción con la microglía, un tipo celular con un papel clave en el metabolismo de la glucosa cerebral (297,298).

1.4. Inflamación y estrés oxidativo

El modelo MIS se ha asociado en numerosos estudios con un aumento tanto de marcadores proinflamatorios como de estrés oxidativo (222). En este estudio, hemos sido capaces de replicar varios de estos parámetros, principalmente a nivel de la **corteza prefrontal**, la **amígdala** y el **caudado–putamen**, con unos resultados algo más inconsistentes a nivel de hipocampo. Los animales MIS muestran un aumento importante de **iNOS** en todas las estructuras, aunque menos notable en el hipocampo. El incremento de iNOS, por lo general, parece estar mediado por la activación de la vía de NF- κ B, una ruta que se activa en las ratas gestantes tras la administración del Poly I:C y su unión a los receptores TLR3, y que parece estar sobreactivada también en un escenario proinflamatorio causado por el aumento de citoquinas, como es el caso del acontecido a nivel uterino en la generación del modelo. Presumiblemente, estos cambios, probablemente mediados por la relación microglía–neuronas durante el neurodesarrollo (299), perduran en el tiempo y son los responsables de los desequilibrios en IOS que se observan en el modelo a largo plazo. Un resumen de las vías relacionadas con estrés oxidativo e inflamación se puede ver en la **Figura 4.1**. El incremento de iNOS se previno con todos los tratamientos, siendo especialmente visible este efecto beneficioso en la corteza prefrontal, quizás debido a que los niveles basales de estrés oxidativo e inflamación en esta región son mayores en estos animales, lo que potenciaría el efecto de fármacos inherentemente antiinflamatorios y antioxidantes. Este efecto preventivo es especialmente relevante, teniendo en cuenta que iNOS es uno de los principales biomarcadores proinflamatorios que se encuentran incrementados en pacientes con esquizofrenia en diferentes etapas del trastorno (300). Curiosamente, **COX–2**, una molécula proinflamatoria que se activa en condiciones y con mecanismos similares a iNOS, no mostró diferencias entre los animales sanos y los MIS. Es posible que otras rutas diferentes de la de NF- κ B sean la causa de estos resultados. Algunos estudios han demostrado una correlación

inversa entre los niveles de SOD y COX-2, con una posible inhibición de la transcripción de COX2 tras el aumento de la actividad de SOD (301). En este estudio, esto es especialmente visible en la amígdala, única estructura en la que COX2 está aumentada en los animales MIS, coincidiendo a su vez con una disminución de SOD en los mismos animales. La **MDA**, otra molécula proinflamatoria relacionada con la activación de iNOS y COX-2, no presentó grandes diferencias en los animales MIS, salvo en la corteza prefrontal, donde su concentración prácticamente duplicó a la de los animales sanos. Los tres tratamientos lograron una muy ligera prevención de este incremento, pero sin llegar a alcanzar los valores de los animales control. Además, el aumento de MDA centrado en áreas corticales es coherente con la mayor susceptibilidad que presentan ciertos subgrupos neuronales locales a un aumento sostenido de la inflamación, siendo especialmente sensibles en comparación con otras áreas subcorticales.

A nivel de estrés oxidativo, examinamos diferentes componentes de la defensa antioxidante, como son **HO1** y **NQO1**, así como varias de las moléculas reguladoras de la síntesis de estos dos compuestos, **KEAP1** y **NRF2**. En contra de lo esperado, no hubo apenas diferencias en la concentración de HO1 y NQO1 en los animales MIS, a excepción de la corteza prefrontal, donde estos animales sí presentaron una disminución de ambas proteínas, asociadas con un empeoramiento de la defensa antioxidante. De nuevo, se pone de manifiesto la mayor susceptibilidad de esta estructura a perturbaciones en IOS. Curiosamente, los animales MIS, y no los control, tratados con los diferentes fármacos mostraron, por lo general, un aumento de ambas proteínas que superó incluso los niveles basales de los animales sanos. Es posible que, en un contexto proinflamatorio y prooxidante, como es el que presentan los animales MIS, la administración de compuestos con un alto potencial antioxidante o antiinflamatorio, logre activar rutas asociadas a IOS que, en condiciones normales, no se muestran tan sensibles a cambios. Es llamativo a su vez el incremento de KEAP1 que presentan los animales MIS en comparación con el resto. En principio, este resultado es coherente con lo esperado, ya que una mayor concentración de esta molécula en el citoplasma nos está indicando una menor translocación al núcleo de NRF2 y, por tanto, una menor transcripción de HO1 y NQO1. No obstante, estos resultados no van de la mano con los mostrados antes: el incremento de KEAP1 en los animales MIS no está ligado en nuestro caso a una disminución de HO1 y NQO1. Es difícil saber con certeza cuál es la causa de estos resultados, aunque es posible que se deba a que, aunque KEAP1 se acumule en el citoplasma y HO1 y NQO1 no se estén, por tanto, sintetizando *de novo*, sí exista un nivel basal de ambas moléculas por debajo del cual no se pueda bajar. Además, aunque NRF2 y KEAP1 son dos de los componentes principales implicados en la síntesis de HO1 y NQO1, no son los únicos. Varios estudios han mostrado la implicación de otras moléculas en la síntesis de ambas proteínas (302), lo que explicaría tanto estos resultados como los observados en NRF2, donde no vemos apenas diferencias en ningún sentido.

Figura 4.1.

Marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras la administración del Poly I:C

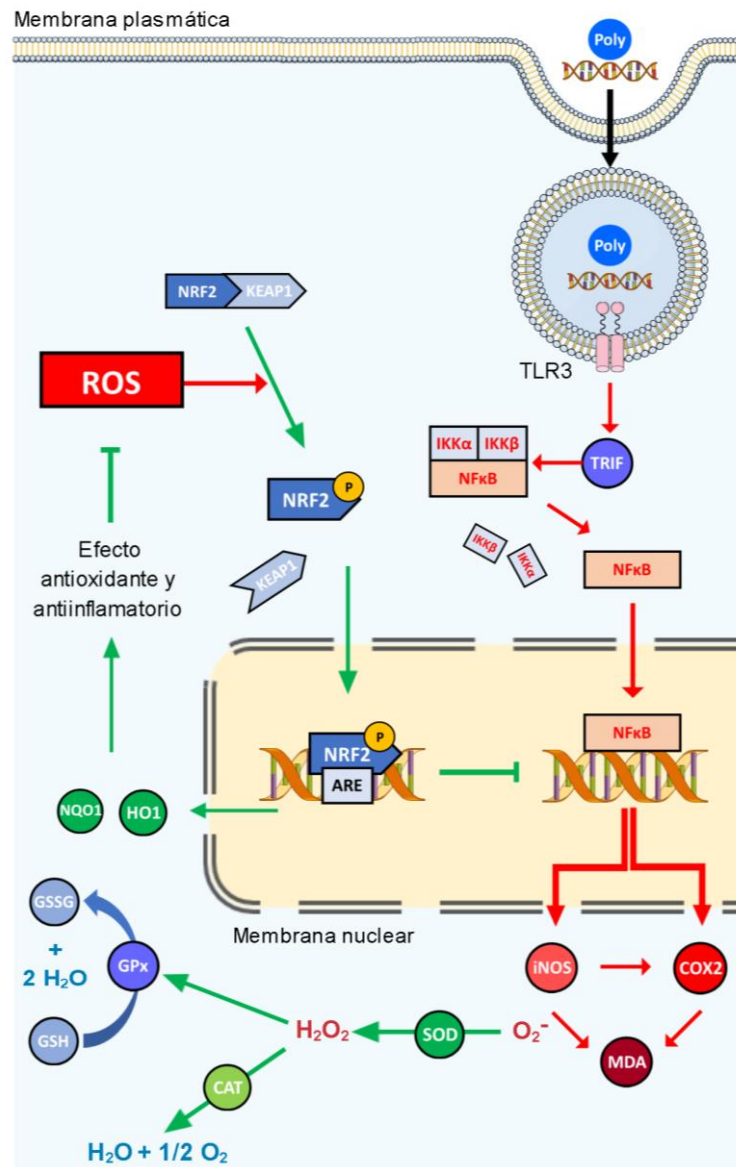


Fig. 4.1. Esquema con las vías celulares prooxidantes y antioxidantes influenciadas por la administración del Poly I:C. Las flechas rojas muestran procesos ligados a compuestos proinflamatorios y prooxidantes, mientras que las verdes indican procesos ligados a mediadores antiinflamatorios y antioxidantes. Tras el reconocimiento del ácido Poly I:C por los receptores TLR3 endosomales, NFκB se transloca al núcleo, induciendo la transcripción de mediadores oxidonitrosativos, como iNOS y COX2, que favorecen el incremento de ROS. Como resultado del daño oxidativo, se incrementan los productos de la peroxidación lipídica, como el MDA. Además, el aumento del estrés oxidativo lleva a la oxidación de KEAP1, que se separa de NRF2, que es fosforilado y se transloca al núcleo, uniéndose a factores de transcripción relacionados con elementos de la respuesta antioxidante (ARE), lo que induce la síntesis de elementos de respuesta antioxidante, como NQO1, HO1, SOD, CAT y GPx, entre otros. Estos mediadores transforman los radicales libres en productos moleculares no nocivos para la célula, ayudando a mantener el equilibrio homeostático.

2. Sobre el efecto de la N-acetilcisteína en la gestación

2.1. Comportamiento: inhibición del prepulso, memoria de trabajo y ansiedad

A nivel conductual, en el Estudio II evaluamos, además de la respuesta al sobresalto, la memoria de trabajo y la ansiedad, dos déficits de relativamente fácil medición en modelos animales y cuya asociación a varios de los dominios sintomáticos en pacientes con esquizofrenia ha sido probada (303,304). En el caso de la prueba de **PPI**, corroboramos lo previamente observado en los animales MIS, que mostraron un déficit notable para inhibir el sobresalto, especialmente para los dos prepulsos de mayor intensidad. Además, el tratamiento en la gestación logró prevenir las alteraciones en estos animales, aunque con matices: si bien el tratamiento con NAC prolongado durante toda la gestación previno absolutamente los déficits, el tratamiento durante siete días no fue suficiente para lograr una respuesta tan beneficiosa, alcanzando únicamente valores similares a los de los controles sanos en el prepulso de mayor intensidad. No obstante, el tratamiento completo de 21 días sí parece ser más efectivo que el mostrado en el Estudio I. Probablemente, aunque la ventana temporal empleada en el Estudio II otorga un mayor potencial al tratamiento utilizado, quizás siete días de administración no sean suficientes para compensar alguno de los déficits ocasionados por la administración del Poly I:C en comparación con un tratamiento más tardío, pero más prolongado en el tiempo.

Para evaluar los posibles déficits de memoria en el modelo MIS, utilizamos el **laberinto en T**. La alternancia entre brazo izquierdo y derecho en ensayos sucesivos se ha relacionado con un estado funcional normal de la memoria de trabajo (305). En nuestro modelo, no obstante, no hemos observado diferencias en el número de alternancias en el laberinto entre los animales sanos y los animales MIS ni tampoco debido a los tratamientos. Más allá de la inesperada ineffectividad de la NAC, en base a la bibliografía, regulando procesos cognitivos relacionados con memoria (306,307), es aún más sorprendente que no encontremos diferencias a causa del Poly I:C en primer lugar. Son varios los estudios que han mostrado déficits en la memoria de animales de este modelo (308-311) y, algunos de ellos, incluso evaluándolos con el mismo método, cuantificando las alternancias en el laberinto en T (308). Teniendo en cuenta que este déficit parece probado en el modelo, consideramos que la causa más probable que explique esta carencia de diferencias esté más relacionada con lo metodológico: en aquellos estudios que han utilizado el laberinto en T y las alternancias como método de análisis indirecto de la memoria de trabajo, el ensayo se dividió en dos días diferentes en los que los animales fueron expuestos al laberinto un mínimo de 15 veces. En nuestro caso, la prueba fue realizada en un solo día con tan solo 5 ensayos. Es posible que en este modelo, en el que el daño cerebral no es tan claro como en otros modelos específicos para estas alteraciones, un protocolo tan corto no sea suficiente para evidenciar las diferencias existentes en los animales MIS.

Por último, evaluamos los niveles de ansiedad en los animales MIS mediante la prueba del **laberinto en cruz elevado**. La mayor permanencia en brazos abiertos en comparación con la permanencia en brazos cerrados está relacionada con bajos niveles de ansiedad, y viceversa. En el modelo MIS estudios previos ya han mostrado un incremento de la ansiedad en animales expuestos a Poly I:C (312), algo que se corrobora en este estudio, con una disminución contundente del tiempo en brazos abiertos por parte de los animales MIS y un aumento en los cerrados. Además, y lo que es más importante, el tratamiento con NAC en la gestación, tanto durante 7 días como durante 21, logra prevenir rotundamente estos déficits. En este caso, no parece que, como en el caso del PPI, una reducción del tiempo de administración haya podido impedir el efecto beneficioso de la NAC. Un aumento inflamatorio diferencial entre las regiones cerebrales relacionadas con la respuesta al sobresalto y las implicadas en ansiedad podría estar detrás de estos contrastes. Varios estudios, tanto clínicos como preclínicos, han mostrado el efecto beneficioso de la NAC paliando sintomatología asociada a la ansiedad (313-315), pero éste es el primero que logra prevenirlos con una estrategia terapéutica tan temprana.

2.2. Imagen por resonancia magnética

2.2.1. Regiones de interés y VBM

El análisis de regiones de interés corroboró a grandes rasgos los resultados observados en los animales MIS en el Estudio I. Además, en este estudio examinamos también el **cuerpo calloso**, una estructura de la sustancia blanca que conecta ambos hemisferios y cuya alteración se ha observado asimismo en pacientes con esquizofrenia en diversas etapas (316,317), con la intención de caracterizar su estructura en este modelo, tanto con estos análisis como con imagen por difusión. Los resultados de ROIs muestran la reducción del volumen del cuerpo calloso en los animales MIS, del mismo modo que lo observado en el trastorno humano. Además, en nuestro estudio ambos tratamientos fueron igualmente eficaces a la hora de prevenir este déficit. En el análisis de la sustancia blanca mediante VBM, estos resultados fueron parcialmente corroborados, con aumentos de la densidad de fibras en zonas locales de esta región tras la administración de ambos tratamientos en los animales MIS. No obstante, esos aumentos de densidad en áreas concretas del cuerpo calloso fueron parcialmente contrarrestados por reducciones muy localizadas en otras zonas de la misma estructura. Lo que parece claro es que, en el cómputo global, más allá de las divergencias presentes en esta estructura, existe una reducción del tamaño del cuerpo calloso que ambos tratamientos con NAC logran prevenir. Este resultado no es del todo sorprendente, ya que varios estudios habían mostrado hasta ahora el efecto neuroprotector de la NAC sobre las fibras neuronales, siendo

capaz de revertir eventos desmielinizantes en distintas áreas cerebrales (290,318). No obstante, hasta la fecha es el primer estudio que muestra un efecto preventivo de la NAC sobre esta estructura cerebral.

Además, en el análisis de ROIs ambos tratamientos con NAC lograron prevenir los déficits observados en los animales MIS en el **hipocampo** y los **ventrículos**. Este resultado es especialmente llamativo si lo comparamos con el mismo tratamiento durante la periadolescencia, en el que la NAC apenas fue capaz de prevenir la reducción del volumen hipocampal. En este caso, tanto el tratamiento durante 7 días como el de 21 logran que los animales MIS tratados muestren un volumen en esta estructura similar al de los animales sanos. En esta ocasión, la divergencia de resultados sí podría explicarse totalmente por la ventana elegida, siendo bastante probable que la NAC, tras una administración más temprana, sea capaz de evitar la aparición de un ambiente proinflamatorio y prooxidante que genere un daño a largo plazo en esta estructura. El déficit en esta región podría estar asociado a su vez con las alteraciones cognitivas a nivel de memoria que, aunque nosotros no hemos reportado, otros estudios sí han evidenciado. Por otra parte, el efecto beneficioso de la NAC sobre los ventrículos ya se había mostrado de manera leve en el estudio en la periadolescencia, especialmente a nivel del **tercer ventrículo**. En la administración durante la gestación, este efecto es también observable, tanto en el análisis de ROIs como, sobre todo, en el análisis de líquido cefalorraquídeo por VBM. Este último nos muestra un efecto preventivo masivo en todo el sistema ventricular por parte de ambos tratamientos. Aunque esperado, por el efecto neuroprotector ya demostrado de la NAC, no deja de resultar sorprendente una diferencia de eficacia tan inmensa simplemente variando la ventana de tratamiento.

En cualquier caso, el potencial modulador de la NAC en la gestación no se ciñe estrictamente al sistema ventricular. Observando el resto de resultados de VBM, a nivel de sustancia gris y de sustancia blanca, es fácilmente visible que, tanto en el tratamiento de 7 días como en el de 21, los cambios morfométricos en el cerebro son considerablemente más grandes que los causados por el mismo fármaco en la periadolescencia. Así, varios de los ya indicados en el Estudio I aparecen aquí, pero en una magnitud mucho mayor. Ése es el caso del **hipotálamo** y el **cerebelo**, que en ambos casos presentan un aumento de volumen en lo relativo a la sustancia gris y una reducción de sustancia blanca, aunque en una escala mucho mayor que en el estudio anterior. Por lo general, existe un aumento de la densidad de sustancia gris global y una disminución de la blanca a causa de la NAC, con leves excepciones, como las asociadas al cuerpo calloso antes nombradas. En el caso de la sustancia gris, este aumento generalizado se podría considerar como beneficioso, especialmente si lo comparamos con la disminución global de sustancia gris presente en el trastorno humano (319). A priori, no es posible determinar

lo mismo en el caso de la sustancia blanca, ya que en pacientes con esquizofrenia también se ha reportado una reducción general de la sustancia blanca. No obstante, en este caso consideramos que es probable que muchas de las modificaciones observadas en estas regiones no son tanto una pérdida de sustancia blanca sino una mayor compactación de las fibras debido al aumento enorme de sustancia gris. Este resultado sería corroborado a su vez por el análisis del cuerpo calloso mediante segmentación manual ya presentado. Por último, además de los cambios comunes observados previamente en el estudio en periaadolescencia, podemos ver otras modificaciones, efecto de la NAC en la gestación, que pueden ser relevancia. Éste es el caso del aumento de densidad de sustancia gris en los animales MIS tratados con NAC a nivel de los **colículos inferior y superior**. Ambas estructuras se han ligado con la esquizofrenia y con varios de los déficits cognitivos presentes en el trastorno. Su reducción volumétrica y su disfunción se han relacionado con un incorrecto procesamiento sensorial que sería coherente a su vez con los déficits en la respuesta al sobresalto (320).

2.2.2. DTI

En el análisis de imagen por difusión examinamos distintos parámetros que nos mostrasen la estabilidad de las fibras neuronales en tres estructuras cerebrales: por un lado, el cuerpo calloso, la región de sustancia blanca de mayor tamaño del cerebro y cuya alteración se ha asociado con distintos déficits en el trastorno humano. Por otro lado, dos estructuras, la corteza prefrontal y el hipocampo, con una composición mayoritaria de sustancia gris, pero con una parte de sustancia blanca con una importancia capital en este trastorno. Hasta la fecha, ningún estudio ha realizado un análisis de DTI de estas tres regiones en este modelo animal, por lo que no nos es posible comparar en lo respectivo a los resultados que determinen las diferencias fenotípicas entre animales sanos y MIS. No obstante, si comparamos con lo observado en el trastorno humano, los resultados no podrían ser más inesperados. En el caso del cuerpo calloso, el consenso es amplio en que existe una reducción de la fracción de anisotropía en esta región, así como un aumento de la difusividad media (321–324). En nuestro caso, el resultado observado es precisamente el contrario: un **aumento considerable de la FA en los animales MIS**, junto con una **reducción de la MD**. Además, sorprendentemente, ambos tratamientos con NAC, especialmente el que abarcó la gestación completa, previnieron estas alteraciones presentes en el modelo MIS. Estos resultados, encontrados también a nivel de la corteza prefrontal y en el hipocampo, aunque inesperados, pueden deberse a varios factores. En el cuerpo calloso, los cambios a nivel volumétrico podrían estar jugando un papel fundamental en la justificación de estos resultados. Al mostrar los animales MIS un menor tamaño de esta estructura, las probabilidades de que los vóxeles selecciona-

dos para medir la FA estén representando exclusivamente fibras propias del cuerpo calloso pueden reducirse. Además, algunos estudios han mostrado que en torno al 90% de los vóxeles de sustancia blanca muestran fibras cruzadas, lo que aumentaría considerablemente la anisotropía y podría explicar los resultados que tenemos a nivel de cuerpo calloso (322). La prevención de ese déficit volumétrico por el tratamiento con NAC podría estar, por tanto y a su vez, detrás de los cambios en la FA. En el caso de la corteza prefrontal y el hipocampo los resultados podrían tener una explicación más sencilla. Además de la reducción de volumen en ambas estructuras, especialmente notable en el caso del hipocampo, la presencia de una mayor concentración de sustancia gris en estas regiones podría estar detrás del aumento de la FA tras el tratamiento con NAC.

Si los resultados fueron diferentes a lo esperado en el caso de la FA, lo mismo se puede decir en el caso de la MD, con múltiples estudios mostrando un incremento tanto en el cuerpo calloso como en regiones subcorticales (325,326). En este estudio, **los animales MIS mostraron una leve disminución de la MD que ambos tratamientos con NAC logran prevenir**, de una manera algo más marcada para el tratamiento de 21 días. Aunque a primera vista estos resultados pueden parecer contraintuitivos, un estudio relativamente reciente reportó una disminución de la MD en distintas regiones de sustancia blanca en pacientes en etapas tempranas del trastorno (327). Aunque la imagen fue adquirida en estos animales en una fase presumiblemente más avanzada, con los déficits más arraigados, la posibilidad de una evolución progresiva de la sustancia blanca que desemboque en una inversión de ambos parámetros, como de hecho ocurre en humanos, nos permite hipotetizar un mecanismo similar en los animales MIS. Además, los atípicos resultados de la FA, sumados a las variaciones en el tamaño de estas estructuras, podría también explicar esta aparente contradicción en estos parámetros.

2.2.3. Espectroscopía por imagen de resonancia

La ^1H MRS nos permitió identificar cinco metabolitos diferentes tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo, entre los que se incluyen la suma de la glicerofosocolina y la fosfocolina (GPC+PCh), el N-acetilaspártato (NAA+NAAG), la suma de glutamato y glutamina (Glu+Gln) y dos macromoléculas (MM09+Lip09 y MM20+Lip20). Aunque numerosos estudios han mostrado oscilaciones en la concentración de estas moléculas en pacientes en diferentes fases del trastorno en humanos, en nuestro estudio no logramos replicar prácticamente ninguna de estas diferencias, lo que sí corrobora parcialmente lo descrito previamente por Vernon *et al.*, en cuyo estudio no se identificaron diferencias en la concentración de varios metabolitos en la corteza prefrontal de animales MIS en un estudio longitudinal (328). La **colina**, un marcador indirecto de la densidad

celular y la estabilidad de las membranas neuronales, parece estar incrementado en regiones frontales del cerebro de pacientes en diferentes etapas en esquizofrenia (329,330). La colina se expresa en una mayor proporción en células gliales, por lo que su aumento suele asociarse con un incremento de procesos neuroinflamatorios (331). En cambio, en nuestros estudios no encontramos diferencias en este metabolito a nivel cortical, con un muy leve incremento en los animales MIS en el hipocampo. Además, y en contra de lo esperado, el tratamiento con NAC durante 21 días parece incrementar la concentración de la colina en ambas estructuras. Una posible explicación para este resultado es la acción inhibitoria de la NAC, tanto en corteza como en hipocampo, sobre la acetilcolinesterasa, una enzima que posibilita la síntesis de acetilcolina utilizando, entre otros precursores, la colina (253). Es probable que, tras una ausencia prolongada de la enzima, la colina haya podido acumularse al estar bloqueada la ruta de síntesis de ese neurotransmisor. A su vez, si esta hipótesis es cierta, también es lógico deducir que los niveles de acetilcolina podrían estar reducidos en ambas estructuras. Teniendo en cuenta que el incremento de acetilcolina se ha asociado con varios síntomas negativos y afectivos de la esquizofrenia (332), este resultado podría incluso considerarse como positivo. En cualquier caso, ese aumento no puede estar relacionado de ninguna manera con un incremento de la neuroinflamación en ambas regiones, ya que el estudio de IOS, del que hablaremos a continuación, no sustentan esa hipótesis. Parece evidente además que, ese, aparentemente, efecto deletéreo no ha implicado ningún déficit en estos animales en vista del resto de resultados analizados.

El **NAA** es el metabolito más abundante en el sistema nervioso central en mamíferos y suele emplearse como un marcador de la integridad neuronal. Existe un amplio consenso en que este metabolito se encuentra reducido en pacientes con esquizofrenia, tanto en corteza como en hipocampo (333,334). En nuestro estudio, sin embargo, no somos capaces de encontrar diferencias en el modelo MIS en comparación con los animales sanos. Los tratamientos con NAC, especialmente el de 21 días, consiguen aumentar la concentración de metabolitos, tanto en los animales sanos como en los MIS, en el caso de la corteza, y en un menor grado en los animales MIS, en el hipocampo. Un estudio de 2017 (335) muestra oscilaciones en los niveles de NAA en función de si la región analizada está compuesta mayoritariamente por sustancia gris o sustancia blanca. Teniendo en cuenta las alteraciones que muestran los animales MIS en la proporción de sustancia gris/sustancia blanca, es posible que la carencia de diferencias entre estos animales y los animales sanos pueda deberse a un equilibrio diferencial de ambas sustancias en el vóxel objeto de análisis. Por su parte, aunque en una menor escala, la NAC sí corroboró ese incremento del NAA ya mostrado en otro modelo animal de esquizofrenia (336).

La concentración de **Glu+Gln** en pacientes con esquizofrenia es oscilante. Sí que se han reportado alteraciones en los niveles de estas moléculas, pero no de una manera consistente que nos permita hablar de un aumento o de una disminución clara. Por el momento, parece que su concentración se incrementa en pacientes en una fase temprana del trastorno o en aquellos no medicados, mientras que disminuye en la esquizofrenia crónica, lo que nos hablaría de una probable reducción progresiva de Glu+Gln a lo largo del desarrollo del trastorno, probablemente debida al tratamiento con antipsicóticos (333,337,338). Esta indefinición dificultó la predicción de qué resultado mostrarían los animales MIS sin tratar, aunque basándonos en la progresión en humanos, se podría esperar una leve disminución de Glu+Gln en ambas regiones, sin llegar a ser muy pronunciado. En nuestros animales MIS, más allá de una ligera reducción en el hipocampo, no podemos hablar de diferencias fenotípicas entre animales sanos y MIS. A su vez, los tratamientos con NAC tampoco mostraron eficacia modificando alguna de estas tendencias, aunque sí parece existir una leve reducción de la concentración de ambos metabolitos en la corteza de los animales MIS y, sobre todo, en el hipocampo de estos animales. Contrariamente a estos resultados, el tratamiento de 21 días pareció aumentar ligeramente los niveles de Glu+Gln en los animales MIS. Hasta el momento, existen pocos estudios que hayan evaluado cómo afecta la N-acetilcisteína en los niveles de glutamato, y ninguno usándolo como estrategia preventiva, pero lo visto hasta ahora en clínica nos habla de una reducción del glutamato tras la administración de NAC en pacientes con esquizofrenia (339), algo que en nuestro estudio sólo podemos corroborar parcialmente y de manera muy leve.

Por último, en el estudio de espectroscopía identificamos dos tipos de **macromoléculas (MM09 y MM20)**. Las macromoléculas estudiadas mediante esta técnica abarcan diferentes lípidos, proteínas y ácidos nucleicos diversos presentes en el citosol neuronal. Su concentración parece estar elevada en patologías de distinta índole aunque, en esquizofrenia, el único estudio hasta la fecha que había evaluado los niveles de estos metabolitos en pacientes con este trastorno había reportado un incremento de estas y otras moléculas, especialmente la MM09, con una correlación positiva entre este aumento y la severidad de los síntomas (340). En nuestro estudio, no encontramos diferencias entre los animales sanos y los animales MIS, aunque sí observamos una aparente tendencia al incremento de la concentración de ambas tras los tratamientos con la NAC. Nuestros resultados, por tanto, suponen una sorpresa en comparación con el estudio clínico. En cualquier caso, la relación directa entre el incremento de las macromoléculas y el de los déficits en este estudio no sólo no se ha observado, sino que se ha revertido, lo que probablemente nos esté indicando diferentes mecanismos moleculares reguladores de las alteraciones conductuales en el modelo MIS.

2.3. Inflamación y estrés oxidativo

Los resultados de IOS de esta segunda parte del estudio corroboran parte de los hallazgos encontrados en el estudio previo, a nivel de incrementos en los marcadores tanto proinflamatorios como prooxidantes en los animales MIS y con la salvedad, igual que en el caso anterior, del hipocampo, cuyo deterioro en estos animales continúa siendo más modesto. El marcador proinflamatorio **iNOS** se encuentra de nuevo considerablemente aumentado en corteza prefrontal y en amígdala, las dos estructuras en la que es más visible la diferencia entre animales sanos y MIS. Además, en ambas regiones, los tratamientos con NAC continúan ejerciendo un efecto preventivo más elevado que el observado en hipocampo y en caudado-putamen. Especialmente en la corteza prefrontal, ambos tratamientos con NAC logran prevenir completamente el incremento exacerbado de **iNOS**. **COX2**, otro de los marcadores proinflamatorios analizado, a diferencia del Estudio I, sí parece encontrarse en una mayor proporción en esta ocasión en los animales MIS, como se esperaba en un principio. La ausencia de cambios en el estudio previo fue justificada por una interacción diferencial con la **SOD**, algo que bien podría explicar esta diferencia de resultados, ya que, en este caso, no existen distinciones tan evidentes en la actividad de esta enzima. Además, el incremento de **COX-2** se pudo prevenir por los tratamientos con NAC, de manera parcial en hipocampo, amígdala y caudado-putamen, y completamente, en el caso de la corteza prefrontal.

Una de las diferencias más llamativas es el cambio de expresión de **KEAP1**, que aparece menos representado en los animales MIS que en el estudio previo. No obstante, el comportamiento de las proteínas ARE sigue, por lo general, un patrón similar que en los tratamientos durante la periadolescencia, con el incremento de **NQO1** y **HO1** en los animales MIS tratados, especialmente durante 21 días. Este cambio, sumado a la ausencia de los mismos en lo referente a la actividad de **NRF2**, corroboraría la teoría previa de que, probablemente, la expresión de las proteínas ARE estén siendo expresadas en respuesta al tratamiento con compuestos que fomentan un ambiente antioxidante mediante rutas y mecanismos moleculares ajenos a la vía de **KEAP1-NRF2**. No obstante, con los resultados obtenidos, no es posible concluir esto con rotundidad. Es llamativo a su vez, en comparación con el estudio previo, el comportamiento de la catalasa, otro marcador antioxidante. Aunque no observamos diferencias aparentes entre los animales sanos y los animales MIS en lo referente a este compuesto, ni aquí ni en el estudio anterior, en este caso sí observamos un efecto diferencial del tratamiento con NAC. Aunque la NAC durante la periadolescencia no logró modificar el comportamiento de este marcador, ambos tratamientos durante la gestación sí fueron capaces de aumentar la concentración de la **catalasa**, especialmente en el hipocampo, tanto en los animales sanos como en los MIS tratados. Este incremento corrobora el potencial diferencial del tratamiento preventivo en una ventana terapéutica más temprana.

Por último, uno de los resultados más curiosos, tanto del estudio en periadolescencia como en el de gestación, es la ausencia de diferencias en los distintos componentes del ciclo del **GSH**, que no muestran apenas contrastes entre los animales sanos y los animales MIS. Además, los tratamientos con NAC tampoco parecen actuar sobre éstos, lo que resulta aún más sorprendente, al tratarse la NAC de un precursor del GSH. Aunque en este estudio la administración del compuesto se realizó durante la gestación y ese efecto no tiene que reflejarse de manera directa en la descendencia, sí resulta más sorprendente la ausencia de efecto en el tratamiento durante la periadolescencia. En cualquier caso, los animales MIS no parecen mostrar déficits en este ciclo que sea posible prevenir, lo que sí contrasta con estudios previos, que muestran un déficit de este metabolito en diferentes áreas cerebrales, aunque en uno de ellos las diferencias sólo se observaron tras la exposición a un estímulo inmunogénico posterior a la administración del Poly I:C (341,342). En humanos, aunque el consenso general apunta a una disminución del GSH, ligada a una mala respuesta de defensa antioxidante (343,344), existe una amplia controversia acerca del papel de este compuesto en la fisiopatología de la esquizofrenia. Existen diferencias en la concentración del metabolito a lo largo del trastorno e incluso diferencias interindividuales entre personas en fases similares de la patología, lo que incluso ha llevado a considerar una caracterización distintiva formal de dos subtipos de esquizofrenia en función de sus niveles de GSH (345).

2.4. Microbiota

La disbiosis intestinal, es decir, el desequilibrio de la proporción de los diferentes componentes del microbioma bacteriano, se ha relacionado de manera frecuente durante los últimos años con la aparición de trastornos mentales, como la esquizofrenia. Aunque existen diferencias interindividuales muy marcadas a causa de factores ambientales muy diversos, como la dieta o el estrés, sí parece haber evidencias de cambios concretos en la composición del microbioma que puedan estar relacionados con la aparición y el mantenimiento del trastorno (346). Hasta la fecha, casi una decena de estudios han mostrado diferencias en la microbiota intestinal entre individuos sanos y pacientes con esquizofrenia en diferentes etapas del trastorno. No obstante, por lo general los cambios observados no son del todo consistentes, con contrastes entre los distintos estudios. Estas discrepancias son mayores cuanto más se sube en el orden taxonómico. A nivel de filo, o incluso de familia, estudios diferentes han mostrado indistintamente un enriquecimiento o una disminución del porcentaje de ciertos grupos bacterianos. Éste es el caso, por ejemplo, de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* o de la clase de los *Clostridiales* (346). Estos resultados probablemente nos estén mostrando diferencias más concretas, a nivel de género o incluso de especie. En nuestro estudio, no observamos diferencias a nivel de filo (**Anexo P**), aunque sí a nivel de familia, de género y de

especie. A nivel de filo, una de las medidas más caracterizadas en esquizofrenia es el **ratio Firmicutes:Bacteroidetes**, en el que los primeros se encontrarían aumentados y los segundos, disminuidos. Esas diferencias no las observamos en los animales MIS de este estudio. No obstante, aunque este ratio es uno de los más caracterizados en varios trastornos, su correlación en esquizofrenia con patologías presuntamente derivadas del uso de antipsicóticos, como la obesidad o la diabetes, no permite conocer a ciencia cierta qué porcentaje de este cambio en el ratio es debido a estas patologías o al trastorno mental en sí mismo. Esto, a su vez, explicaría por qué no vemos diferencias en nuestro modelo, al no darse ninguno de esos supuestos, correlacionados con la esquizofrenia pero no con nuestro modelo.

A niveles inferiores, la alteración más uniformemente demostrada en pacientes de esquizofrenia es el incremento del porcentaje de miembros de la familia **Lactobacillaceae** (347), algo que corroboramos en este estudio, con un aumento sustancial de especies de esta familia en los animales MIS. Además, el tratamiento temprano con NAC previene esta alteración. Concretamente, dentro de esta familia, los cambios son mayoritariamente debidos a las especies *Lactobacillus animalis*, *johnsonii*, *kitasatonis*, *murinus*, *reuteri* y *vaginalis*. El aumento de la concentración de miembros de esta familia se ha asociado tanto al desarrollo de la esquizofrenia como a la severidad de los síntomas (347), lo que es curioso, puesto que forman parte de los tratamientos basados en el uso de prebióticos. Esta aparente contradicción se podría deber a que los *Lactobacillus* administrados como tratamiento probiótico no llegan a colonizar el tracto digestivo, como sí hace la microbiota comensal. Además, otra razón probablemente se deba. de nuevo, a diferencias que trascienden la categoría de familia y atienden más a un orden taxonómico inferior, a nivel de género o especie. Otra familia ampliamente estudiada es la **Bacteroidaceae**. Aunque existen discrepancias entre los estudios realizados, la mayoría han mostrado un aumento en la concentración de estas bacterias en pacientes con esquizofrenia en distintas etapas del trastorno (346). En este estudio, ese incremento se corrobora en los animales MIS, siendo los tratamientos con NAC eficaces previniendo este aumento, especialmente el de 21 días. A nivel de especie, los animales MIS sin tratar presentaron un incremento significativo, en comparación con los otros grupos, de *Bacteroides dorei*, *Bacteroides uniformis* y *Bacteroides acidifaciens*. En humanos no se han reportado por el momento diferencias en estas especies en pacientes con esquizofrenia. Un resultado interesante es el encontrado en la familia XVI de **Clostridiales**, en la que los animales MIS sin tratar presentan una disminución importante de bacterias. Este resultado es acorde con algunos estudios en humanos, aunque se opone a otros que muestran lo opuesto (346). No obstante, resulta sorprendente el efecto de los tratamientos con NAC, dosis dependiente e inverso en función de si es administrado en animales sanos o en MIS. En los primeros causa una disminución del porcentaje de bacterias y en los segundos, un aumento. Este efecto es visible en otras familias, como **Veillonellaceae**

y, en menor medida, *Lachnospiraceae*, lo que nos podría estar sugiriendo un efecto modulador diferencial de la NAC sobre la microbiota en función del estado inflamatorio/oxidante basal de los animales. En los estudios clínicos, son varias las familias bacterianas en las que se han apreciado alteraciones en esquizofrenia y, en muchas de ellas, los resultados en los animales MIS de nuestro estudio logran replicarlas. Más allá de las familias *Lactobacillaceae* y *Bacteroidaceae* ya nombradas y que suponen dos de las más importantes por número y porcentaje de miembros, en este estudio los animales MIS muestran tendencias, en el mismo sentido que algunos de los estudios en el trastorno humano, en las familias *Enterobacteriaceae* o *Lachnospiraceae*. A nivel de género, el modelo MIS logra replicar el incremento exacerbado de *Bifidobacterium* encontrado en humanos (346). Además, la NAC logra prevenir este incremento.

El estado actual de la investigación del microbioma en el trastorno humano se encuentra actualmente en fases aún tremendamente incipientes. Existen pocas certezas y una gran discrepancia en los datos existentes, probablemente debido al aún bajo número de estudios y a la heterogeneidad de las metodologías empleadas. Más allá de las pocas certezas con las que contamos actualmente, lo que sí parece evidente es que existe una relación entre las alteraciones en el microbioma y el curso de la esquizofrenia. Además, el efecto directo que parecen ejercer algunos antipsicóticos o, en nuestro estudio, la NAC, sobre la microbiota bacteriana nos indica que la modulación de la flora bacteriana con estrategias terapéuticas dirigidas es posible, lo que nos abre una nueva ventana de acción con dianas emergentes sobre las que actuar.

3. Connectivity Map

La identificación de genes y proteínas cuya alteración podría conducir a déficits en esquizofrenia ha ayudado a comprender mejor los mecanismos moleculares que rigen este trastorno y ha ayudado a desarrollar nuevos compuestos, o a reciclar otros preexistentes, que modulen, directa o indirectamente, una o varias de estas nuevas dianas moleculares. En ese sentido, CMap ha mostrado ser una herramienta tremendamente útil a la hora de evidenciar compuestos y rutas moleculares cuya activación o inhibición podría resultar beneficiosa de cara a revertir o potenciar ciertos perfiles transcriptómicos. En esquizofrenia, su uso no está aún demasiado extendido, aunque sí existen dos artículos publicados en los que se ha empleado para dominios específicos del trastorno y con diferencias en las metodologías y la finalidad de los estudios en comparación con el presentado en esta Tesis (348,349). El objetivo de este apartado de la Tesis era doble: por un lado, determinar posibles fármacos que pudiesen ser útiles en el tratamiento o la prevención de la esquizofrenia, para lo que hicimos uso de datos transcriptómicos procedentes de muestras directamente extraídas de pacientes con este trastorno. Por

otra parte, la selección de un estudio con muestras que procedían del modelo MIS, así como su comparación con los resultados obtenidos en los análisis clínicos, tenían como fin la corroboración del modelo MIS como herramienta predictiva en la que probar estrategias terapéuticas que correlacionen con el trastorno humano. Además, se realizó un último análisis con muestras *in vitro* para reforzar los resultados encontrados en los análisis previos.

El resultado más llamativo encontrado en estos análisis es la identificación de dos compuestos análogos de dos de los fármacos empleados en esta Tesis, los ácidos omega-3 y la minociclina. Tanto el **ácido alfa-linolénico (ALA)** como la **doxiciclina** aparecieron entre los fármacos con un mayor potencial reversor de las alteraciones transcripómicas presentadas a todos los niveles: celular, en el modelo animal MIS y en humanos. Además, el ALA no fue el único ácido graso en el top de fármacos reversores. Tanto el ácido eicosatetraenoico como el ácido gamma-linolénico (omega-6) tuvieron un “score” entre -90 y -100 tanto en el análisis con los datos del modelo MIS como en los del estudio clínico de Gandal *et al.* La doxiciclina a su vez, al igual que la minociclina, es un miembro de la familia de las tetraciclinas, un grupo de fármacos que además también aparece en la lista con un “score” entre -90 y -100. La doxiciclina se ha probado en diversos estudios para trastornos mentales y neurológicos (350,351), aunque su menor capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica promovió el uso de otros compuestos con la misma función fisiológica, pero con una mayor permeabilidad a través de la misma. La minociclina no aparece en la base de datos de compuestos del CMap pero, teniendo en cuenta que comparte mecanismo de acción con la doxiciclina, así como su mejor respuesta respecto a la de atravesar la barrera hematoencefálica, es posible que de estar contenido en la base de datos, su “score” mejorase incluso los encontrados para la doxiciclina. En cualquier caso, lo que sí parece evidente es que la elección tanto de los ácidos grasos omega-3 como de la minociclina ha sido la adecuada, al menos atendiendo a los mecanismos moleculares que son capaces de activar. Cabe mencionar a su vez que la NAC no aparece tampoco en la base de datos de CMap, lo que explica que no se encuentre entre los fármacos seleccionados. No obstante, dentro del grupo de fármacos con un efecto reversor mayor sí hay algunos que comparten mecanismos moleculares con la NAC, lo que evidencia a su vez que su mecanismo de acción actúa en la dirección correcta de cara a paliar la sintomatología asociada al trastorno. Ejemplo de ello es la desoxipeganina, un fármaco con potencial para inhibir la acetilcolinesterasa, la enzima que, como se ha visto anteriormente, cataliza la síntesis de acetilcolina a partir de colina, un efecto compartido con la NAC.

El número de fármacos y de clases de fármacos obtenidos en los análisis con CMap obtenidos en los sucesivos análisis es lo suficientemente amplio como para no hablar específicamente de cada uno de ellos, pero sí es interesante destacar algunos aspectos

de los resultados globales. En primer lugar, entre los fármacos con un “score” entre -90 y -100 hay una alta concentración de **inhibidores de rutas proinflamatorias o prooxidantes**, así como **potenciadores de la defensa antiinflamatoria y antioxidante**. Esto es muy visible en los cinco estudios, pero especialmente en el análisis llevado a cabo a partir de datos del modelo MIS. Estos resultados son coherentes con la generación del modelo, consistente en la generación de un evento proinflamatorio que teóricamente debe desarrollar, a largo plazo, un ambiente proinflamatorio y prooxidante en los animales objeto de estudio. Entre los fármacos comunes con un gran potencial reversor encontramos cuatro inhibidores de la ciclooxigenasa, uno de los principales marcadores proinflamatorios. De ellos, es especialmente interesante la **sinensetina**, un flavonoide de origen natural con potencial antiinflamatorio y antioxidante, capaz de actuar también como modulador de la acetilcolina, y que se ha relacionado con un efecto beneficioso como tratamiento en demencias (352). Los otros tres inhibidores de la COX2 son el **isoxicam**, un analgésico, y el **LM-1685** y el **NCS-382**, dos compuestos aún no aprobados. Además, algunos de los encontrados, como el **AR-C133057XX**, son capaces de inhibir iNOS, y otros tienen un potencial antioxidante sobradamente corroborado, como el **ácido ascórbico** o las **filoquinonas** (353,354). Uno de los más destacados es el **secoisolaricrenisol**, un compuesto de origen vegetal que ha probado ser eficaz induciendo un incremento de los niveles de mediadores antioxidantes, como NRF2 y HO1(355). De manera indirecta, varias clases de fármacos nos señalan también la inflamación y el estrés oxidativo asociado como agentes que combatir por los fármacos como forma de revertir los perfiles transcriptómicos patogénicos en esquizofrenia. Éste es el caso de los **inhibidores de MEK y otras familias de quinasas**, así como de las **fosfodiesterasas**, moléculas relacionadas con procesos inflamatorios y cuya participación se ha demostrado en la aparición de esquizofrenia (356,357). Estos resultados no se revelan únicamente a nivel de compuestos y clases de compuestos. También se puede apreciar en la categoría de ganancia o pérdida de función de genes relacionados con eventos pro- y antiinflamatorios. Éste es el caso de varios tipos de interferón, interleuquinas o metaloproteasas, cuya inhibición es sugerida como potencial agente reversor de las firmas transcriptómicas relacionadas con esquizofrenia. A su vez, los análisis de DSEA, especialmente en el caso del obtenido a partir del ensayo clínico de Gandal *et al*, muestran un enriquecimiento especialmente importante en esta familia, con un énfasis especial en los inhibidores de MEK y de la fosfodiesterasa. Este contexto patogénico relacionado con la inflamación es también visible en los estudios clínicos, aunque se encuentra solapado con la presencia de otros fármacos con un perfil diferencial, asociado al tratamiento de otras patologías como la diabetes, la obesidad o de origen cardiovascular. Probablemente esto sea debido a concurrencias patológicas correlacionadas con la propia esquizofrenia y derivadas, en muchos de los casos, del uso crónico a largo plazo de antipsicóticos. A diferencia

de los modelos animales, evidentemente, las muestras clínicas son recogidas postmortem, por lo que el desarrollo de otras patologías asociadas puede perturbar los resultados en ese sentido. En cualquier caso, existe una similitud evidente entre los análisis de los estudios preclínicos y los clínicos, que converge en el uso de medicación antiinflamatoria y antioxidante.

Otra conclusión que podemos sacar de este estudio es el gran número de compuestos capaces de alterar distintos sistemas de neurotransmisión que nos revelan los análisis, tanto a nivel preclínico como clínico. Este resultado no es demasiado sorprendente, ya que la implicación de los sistemas dopaminérgico, glutamatérgico, adrenérgico o gabaérgico en este trastorno es de sobra conocida. No obstante, la aportación real del estudio en este sentido es la revelación de fármacos con el potencial de actuar sobre estos sistemas de neurotransmisión pero que, hasta la fecha, habían sido utilizados con otros fines. Además, el hecho de que estos fármacos aparezcan también en los análisis con el modelo MIS sugiere la validez del mismo de cara a estudiar perturbaciones en los niveles de los diferentes neurotransmisores, así como su posible asociación con los déficits propios del modelo. De hecho, algunos de estos déficits, como las alteraciones en los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico, ya han sido previamente descritos en este modelo (58). Entre los 58 fármacos comunes que hallamos en los análisis derivados de los artículos con el modelo MIS y el clínico, encontramos 16 cuya función está ligada a la potenciación o la inhibición de diferentes sistemas de neurotransmisión. Varios de ellos están relacionados con distintos procesos inhibitorios de la síntesis o la liberación de acetilcolina. Éste es el caso de la **huperzina A** o la **desoxipeganina**, inhibidores de la acetilcolinesterasa, o de la **propantelina**, un antagonista de los receptores de acetilcolina. Recordemos que uno de los efectos de la NAC era precisamente la inhibición de la acetilcolinesterasa, que sugerimos como una posible explicación al incremento de la colina en los animales tratados con este fármaco. Curiosamente, los tres fármacos ya han sido asociados al tratamiento de la esquizofrenia de algún modo. La huperzina A, un alcaloide extraído de una planta (*Huperzia serrata*) se ha usado como coadyuvante en varios ensayos clínicos en esquizofrenia hasta el momento, probando su utilidad mejorando los síntomas cognitivos (358). Por otra parte, el uso de la desoxipeganina, así como de otros inhibidores de la acetilcolinesterasa ha sido patentado como uso potencial en el tratamiento de este trastorno (359). Por último, la propantelina ya se ha usado para tratar síntomas secundarios derivados de la esquizofrenia, como es el caso de la hipersalivación (360).

Curiosamente, la familia de fármacos capaces de actuar sobre los niveles de neurotransmisores que está más ampliamente representada no es ni la dopaminérgica ni la serotoninérgica (aunque ambas cuentan con varios compuestos en las posiciones más altas). En su lugar, parece que la **modulación de la neurotransmisión adrenérgica** es

capaz de revertir más eficazmente las firmas asociadas a esquizofrenia. Por lo general, lo que demuestran estos análisis, especialmente los de DSEA, es la implicación, en un sentido o en otro, del sistema adrenérgico en la aparición y el mantenimiento del trastorno, algo que, por otra parte, ya se ha descrito (361). Esto parece más evidente viendo los perfiles de las familias de agonistas y antagonistas de receptores adrenérgicos en los análisis de DSEA, en los que aparecen representantes en todo el espectro, con muchos fármacos concentrados en “scores” negativos y, por tanto, reversores, pero también con muchos en el lado contrario, por lo que, en teoría, su administración sería contraproducente. Esto se explica por la alta heterogeneidad de receptores y funciones implicados en este sistema. No obstante, ya existen bastantes estudios que abogan por utilizar estos receptores como dianas para el tratamiento de distintos dominios sintomáticos en esquizofrenia, especialmente la sintomatología negativa (362).

Por último, resulta evidente que CMap y los análisis derivados de las herramientas que proporciona no suponen la panacea absoluta que permita dar con el fármaco perfecto para tratar la esquizofrenia, sobre todo en un trastorno tan increíblemente heterogéneo. Muchos de los fármacos resultantes del análisis no se encuentran aprobados aún, lo que dificulta su uso a corto/medio plazo y algunos no son tan indicativos de los déficits asociados a la esquizofrenia, sino de efectos derivados o incluso ajenos al trastorno. Éste es el ejemplo de aquellos fármacos con una función cardioprotectora o antidiabética en los estudios clínicos, probablemente derivados de efectos secundarios derivados del uso crónico de antipsicóticos. También sería el caso de los fármacos inhibidores del virus de la hepatitis C, muy enriquecidos en los análisis derivados del estudio con el modelo MIS y que quizás se deban más a los mecanismos moleculares desencadenados por el Poly I:C, similares al de una infección vírica. No obstante, más allá de estas limitaciones evidentes, el potencial de CMap como herramienta predictiva es enorme. En nuestro estudio, el CMap nos ha permitido validar numerosos aspectos relacionados con la naturaleza del modelo MIS y corroborar parte de las alteraciones que muestra. Además, la comparación con resultados procedentes de ensayos clínicos nos ha permitido validar asimismo el potencial de los fármacos con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes tanto en preclínica como en clínica. Finalmente, el CMap nos ha permitido identificar fármacos cuyo uso no se ha relacionado hasta el momento con el tratamiento de la esquizofrenia pero que, probablemente, podrían resultar beneficiosos. Por tanto, aunque está claro que la cantidad de información arrojada por este tipo de análisis precisa de una interpretación crítica y un cribado importante, las ventajas que herramientas como el CMap nos abren nuevos y numerosos caminos en el tratamiento de la esquizofrenia y otras patologías.

4. Perspectivas generales en el tratamiento de la esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno tremendamente heterogéneo, con una etiología multifactorial que dificulta sobremanera su tratamiento. Las terapias farmacológicas actuales se basan principalmente en el uso de diferentes antipsicóticos, que son especialmente eficaces paliando la sintomatología positiva. Sin embargo, su efectividad disminuye con los síntomas negativos, cognitivos y afectivos. De hecho, se estima que aproximadamente un tercio de los pacientes no responde al tratamiento. Además, en muchos casos el uso crónico de estos fármacos se ha relacionado con efectos adversos que pueden ser potencialmente mortales, como la diabetes, la obesidad o las cardiopatías. Aunque ya demostrado, esto se pone de manifiesto en el análisis de CMap realizado, en el que muchos de los fármacos más reversores del perfil transcriptómico elaborado a partir de muestras de pacientes con esquizofrenia son compuestos ya aprobados para tratar algunas de las patologías mencionadas, probablemente derivadas del uso crónico de fármacos antipsicóticos (repaglinida o gliquidona para la diabetes, y enalaprilat para problemas cardiovasculares). Ese efecto potencialmente deletéreo queda también patente en los resultados de los análisis atendiendo a la heterogeneidad de efectos que parecen mostrar algunos fármacos antipsicóticos (ver **Anexo T**).

Parece evidente que, atendiendo tanto a la bibliografía previa como a la corroboración realizada con nuestros análisis, la búsqueda de nuevos fármacos es imprescindible para la mejora de las terapias dedicadas a tratar la esquizofrenia. La ampliación del conocimiento básico sobre la etiología de este trastorno ha supuesto, en ese sentido, la apertura de nuevas vías terapéuticas con dianas moleculares diferentes sobre las que actuar. Las hipótesis que hablan de la esquizofrenia como un trastorno del neurodesarrollo, así como la posible participación de eventos inflamatorios en su origen, han sido básicas en el desarrollo de nuevos fármacos. En nuestro estudio, aplicamos ese conocimiento y utilizamos tres fármacos con un gran potencial antiinflamatorio y antioxidante: la N-acetilcisteína, los ácidos grasos omega-3 y la minociclina. El uso de terapias basadas en reducir la inflamación y el estrés oxidativo no son nuevas; su utilización lleva investigándose desde hace años y su posible potencial favorable se ha dejado entrever, si bien los resultados no son lo suficientemente sólidos, ni mucho menos, como para hablar de que hemos alcanzado la solución definitiva. Debido a las cada vez más claras evidencias que apuntan al origen progresivo de la esquizofrenia, con eventos inflamatorios muy tempranos probablemente ligados al origen del trastorno mucho antes de la aparición de los primeros síntomas, durante los últimos años se ha venido apuntando a un abordaje terapéutico más próximo a la prevención que al tratamiento paliativo directo de los síntomas una vez desarrollados. En esta Tesis ésa fue precisamente nuestra estrategia, probando los compuestos antiinflamatorios ya citados en dos ventanas previas

a la aparición de los síntomas: una, en la periadolescencia, justo antes de su concurrencia, y en la gestación, cuando se produjo el evento inmunogénico disruptivo en el modelo animal utilizado.

Los resultados que presentamos en esta Tesis ponen de manifiesto la implicación de eventos proinflamatorios y prooxidantes en la aparición de muchos de los síntomas o déficits asociados a la esquizofrenia, ya sea a nivel conductual, neuroanatómico o bioquímico. Estos resultados sugieren, asimismo, una potencial participación del microbioma bacteriano y del eje cerebro-intestino en estos procesos. No obstante, no es posible aseverar a ciencia cierta la causalidad ni el efecto que los cambios observados han podido tener sobre el resto de déficits. Además, el uso temprano de compuestos con un gran potencial antiinflamatorio y antioxidante fue capaz de prevenir varias de las alteraciones de este modelo, tanto en la periadolescencia como en la etapa prenatal. No obstante, los cambios observados fueron de una mayor envergadura en la estrategia orientada a la gestación, especialmente a nivel neuroanatómico, con multitud de modificaciones probablemente debidas a una reconfiguración muy temprana de la arquitectura cerebral. Aunque la prevención de distintos déficits a nivel neuroanatómico y bioquímico es de una gran importancia, es especialmente relevante el gran efecto de todos los fármacos y de ambas ventanas de cara a prevenir los déficits conductuales encontrados en el modelo. Las alteraciones en el comportamiento de los animales suponen, en gran medida, la manifestación de los daños que podemos identificar a un nivel más celular o molecular y, además, suponen la aproximación más directa al trastorno en humanos. En ese sentido, la prevención de los déficits ligados a la ansiedad y la respuesta al sobresalto supone un hallazgo de una importancia enorme. Por tanto, una de las conclusiones que podemos extraer de estos resultados es que el abordaje temprano resulta muy eficaz en trastornos del neurodesarrollo, en los que la aparición de alteraciones neurológicas se produce mucho antes que la de los síntomas clínicos. El efecto beneficioso que mostramos en esta Tesis es especialmente interesante teniendo en cuenta que los estudios realizados con estos fármacos en el ámbito clínico se han realizado en coadyuvancia con otros fármacos, generalmente antipsicóticos, reportando así mejoras, aunque modestas. En nuestro caso, el efecto se consigue en monoterapia, sólo con la efectividad del compuesto administrado, lo que recalca aún más el gran potencial de la estrategia preventiva.

De cara a un correcto abordaje enfocado en la prevención, es necesario, asimismo, redefinir qué clase de fármacos debemos y podemos utilizar con ese fin. Nuestros resultados muestran la eficacia de aquellos compuestos dirigidos a reducir la inflamación y el estrés oxidativo pero, evidentemente, no cualquier fármaco con esas propiedades es apto para su administración en ventanas terapéuticas muy tempranas, especialmente si hablamos de algunas tan delicadas como la gestación y el periodo prenatal. En ese

sentido, los fármacos que se empleen deben mantener un perfil muy bajo en cuanto a sus efectos adversos por las posibles complicaciones derivadas en etapas tan delicadas del neurodesarrollo. En nuestro estudio, dos de los fármacos empleados, la NAC y el omega-3 presentaban un perfil casi nulo de efectos secundarios y su uso, tanto en adolescencia como en gestación, ya se había demostrado como prácticamente inocuo. En el caso de la minociclina los efectos adversos, sin ser excesivamente elevados, son mayores que los de los otros dos, por lo que su administración en la gestación no está recomendada. En ese sentido, la utilización de herramientas como el CMap puede ser de gran ayuda, de cara a identificar fármacos que presenten, al mismo tiempo, potencial antiinflamatorio y antioxidante y un bajo perfil de efectos adversos. En cualquier caso, la utilización de modelos animales que repliquen parcialmente el trastorno en humanos, como el modelo MIS usado en esta Tesis, se antoja fundamental de cara a testar el potencial efecto beneficioso o los posibles efectos adversos de los fármacos que análisis como el CMap ofrecen.

En definitiva, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado el potencial terapéutico de tres agentes antiinflamatorios y antioxidantes, la N-acetilcisteína, los ácidos omega-3 y la minociclina, usados como estrategias preventivas. Asimismo, la utilización de ventanas de tratamiento más tempranas, como la gestación, ha mostrado un efecto multiplicador de los potenciales efectos beneficiosos de la N-acetilcisteína. En resumen, esta Tesis pone de manifiesto la importancia del uso de agentes neuroprotectores como elementos preventivos tempranos frente a la aparición de síntomas ligados a alteraciones en el neurodesarrollo, como es el caso de la esquizofrenia, un trastorno necesitado de estrategias terapéuticas que mejoren a las actuales. A su vez, el análisis de CMap abre multitud de puertas que permitirán refinar aún más los tratamientos actuales.

4.1. Limitaciones

Esta Tesis y el trabajo experimental asociado a la misma han estado sujetas a distintas limitaciones, muchas de ellas intrínsecamente ligadas a la propia naturaleza del estudio. La primera y más evidente es la dificultad para trasladar a un modelo animal las peculiaridades de una patología con características tan distintivas y tan ligadas al ser humano como es el caso de la esquizofrenia. En ese sentido, las dificultades son aún mayores cuando incluso existen discrepancias a la hora de categorizar y caracterizar el trastorno en humanos, con divergencias a la hora de catalogar varios de los síntomas asociados como propios de uno u otro trastorno. Por ello, es imprescindible recalcar que **no existe como tal “un modelo animal de esquizofrenia”**. Aunque la patología humana fuese un compartimento estanco totalmente definido, con la sintomatología clínica y las alteraciones celulares y moleculares perfectamente caracterizadas, que no es el caso,

aun así, muchos de los síntomas asociados, principalmente los positivos, serían sencillamente imposibles de replicar en modelos animales con un desarrollo cerebral menos complejo que el humano. Los modelos animales que pretenden replicar éste u otros trastornos de índole similar no están destinados a recopilar todos y cada uno de los déficits ligados a la patología clínica, sino que se han especializado en mimetizar un porcentaje acotado del trastorno, ya sea a nivel conductual o a niveles menos visibles, como el neuroanatómico o el bioquímico. La elección de este modelo se hizo teniendo en cuenta estas limitaciones y, aunque no represente todas las alteraciones diferenciales de la esquizofrenia, sí muestra un gran abanico de déficits a muchos niveles. Además, el mecanismo a partir del cual el modelo animal es generado replica en gran medida algunos de los mecanismos reales en humanos.

Otra limitación relevante propia de la naturaleza del modelo es precisamente la forma en la que éste es inducido. A diferencia de otros modelos asociados a la esquizofrenia, como los genéticos o los farmacológicos, en los que los déficits son directamente provocados a causa de esa manipulación, la estimulación inmunitaria materna supone un aumento muy elevado del riesgo de desarrollar los déficits, pero no en un porcentaje tan rotundo. Por ello, es posible que no toda la descendencia manifieste las alteraciones o que lo haga de una manera gradual, con un amplio espectro de déficits desde la total ausencia hasta los fenotipos más exacerbados. No obstante, esta limitación se ha intentado minimizar mediante la aleatorización a la hora de seleccionar las crías para los estudios, ya que se estima que alrededor del 80% de la descendencia sí manifestará varios de los déficits descritos para el modelo. Asociado a esto, surge la tercera limitación, que está relacionada con la necesidad de seleccionar únicamente machos para el estudio. Estudios previos en nuestro laboratorio no han detectado en las hembras los déficits que sí se han descrito en los machos. Dado que, en el trastorno humano, la esquizofrenia tiende a aparecer en edad más avanzada en mujeres, es probable que la evaluación más tardía de los síntomas sí arroja diferencias.

Por último, existe una limitación derivada del neurodesarrollo diferencial entre los roedores usados para el modelo y el ser humano, lo que supone un hándicap añadido, especialmente para cualquier intervención realizada en el periodo prenatal, ya sea inmunogénica o terapéutica. Las etapas y los eventos clave del neurodesarrollo en roedores y en humanos son muy diferentes por lo que, aunque se pretenda escoger una ventana específica igual en el modelo que en el trastorno humano, es imposible que los procesos del neurodesarrollo sean exactamente los mismos en ambos. En ese sentido, se ha intentado englobar, dentro de lo posible el mayor número de eventos básicos cuya importancia consideramos relevante, tanto para la generación del modelo (algo que, por otra parte, ya estaba mucho más preestablecido) y, sobre todo, para la elección de las ventanas terapéuticas.

4.2. Líneas futuras

Esta Tesis aporta muchos resultados asociados a la prevención de la esquizofrenia y otros trastornos con base en el neurodesarrollo y etiología asociada a la inflamación pero, fundamentalmente, lo que hace es abrir aún muchos más caminos, especialmente derivados de las conclusiones extraídas de los análisis de CMap. De este modo, muchas posibles líneas futuras se pueden desarrollar en respuesta a lo encontrado en los mismos, con un gran número de nuevos fármacos que sería posible probar en distintas ventanas terapéuticas. Estos tratamientos preventivos podrían hacerse en monoterapia, como se ha hecho en los estudios aquí presentados, o en coadyuvancia con otros de eficacia ya probada. También sería muy interesante probar estas terapia en un modelo basado en la estimulación inmunitaria materna pero con otros estímulos inmunogénicos en otras fases claves del neurodesarrollo (modelos doble o triple impacto). La generación de modelos animales derivados de los análisis de CMap y que mejorase el fenotipo del modelo MIS empleado aquí sería también una línea de investigación muy a tener en cuenta.

A su vez, del mismo modo que se han mostrado aquellos fármacos y familias de compuestos con “scores” negativos y, por tanto, un potencial efecto reversor, es posible que los fármacos con un “score” muy positivo, es decir, con un perfil transcriptómico similar al introducido, relacionado con la esquizofrenia, estén dando pistas de compuestos a administrar o alteraciones genéticas que se pueden realizar de cara a la generación de modelos animales más precisos, que mejoren aún más los actuales. De cara a probar los fármacos potencialmente terapéuticos, sería muy interesante hacer lo propio para identificar modelos animales que intenten englobar el máximo de características de una patología.

Por el momento, los análisis ligados a CMap se han hecho en base a resultados obtenidos de estudios ya publicados, pero sería también interesante la realización de estudios transcriptómicos en este modelo para analizar, longitudinalmente, el efecto que los diferentes fármacos pueden ejercer a nivel transcripcional. Del mismo modo, la caracterización longitudinal del modelo sin tratar podría arrojar luz sobre la expresión diferencial en momentos distintos del neurodesarrollo, con las más que obvias implicaciones que esto podría tener de cara al desarrollo de nuevas terapias y a cómo éstas podrían afectar según cuándo se realicen.

-5-

CONCLUSIONES

1. El tratamiento preventivo durante la periadolescencia con N-acetilcisteína y omega-3 evita la aparición de déficits en el filtrado sensorimotor propio del modelo de estimulación inmunitaria materna.
2. El tratamiento preventivo durante la periadolescencia con N-acetilcisteína, omega-3 y minociclina consigue prevenir algunos de los déficits neuroanatómicos y bioquímicos existentes en el modelo de estimulación inmunitaria materna.
3. El tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante toda la gestación es capaz de prevenir completamente los déficits en el filtrado sensorimotor y el aumento de los niveles de ansiedad propios del modelo de estimulación inmunitaria materna.
4. El tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante la gestación induce cambios a gran escala en la morfometría de la sustancia gris, la sustancia blanca y el líquido cefalorraquídeo en los animales del modelo de estimulación inmunitaria materna.
5. El tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante la gestación logra prevenir algunos de los déficits bioquímicos a nivel cerebral presentes en el modelo de estimulación inmunitaria materna, especialmente a nivel de corteza prefrontal y amígdala.
6. El modelo MIS presenta alteraciones en la microbiota intestinal que el tratamiento con N-acetilcisteína durante la gestación logra prevenir parcialmente.
7. La administración de compuestos con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes como estrategia preventiva parecen ser eficaces evitando la aparición de déficits potencialmente ligados a la esquizofrenia.
8. La administración de compuestos con potencial antiinflamatorio y antioxidante parece ejercer un mayor efecto modulador si se realiza en fases muy tempranas del neurodesarrollo, como el periodo fetal, en comparación con etapas posteriores, como la periadolescencia.
9. CMap permitió encontrar un conjunto de fármacos y familias de compuestos potencialmente eficaces de cara a desarrollar nuevas estrategias farmacológicas en esquizofrenia.

BIBLIOGRAFÍA

1. APA. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision (DSM-5-TR™). American Psychiatric Association, editor. 2022.
2. Kraepelin E. Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. 4th ed. 1893.
3. Jablensky A. The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. Vol. 12, Dialogues Clin Neurosci. 2010.
4. Weinberger DR. The neurodevelopmental origins of schizophrenia in the penumbra of genomic medicine. Vol. 16, World Psychiatry. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 225-6.
5. Murray RM. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? British Medical Journal. 1987;295(6600):681-2.
6. W.H.O. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>. 2022.
7. Jauhar S, Johnstone M, McKenna PJ. Schizophrenia. The Lancet. 2022 Jan;399(10323):473-86.
8. NIMH. <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia>. 2022.
9. Buckley PF, Miller BJ, Lehrer DS, Castle DJ. Psychiatric Comorbidities and Schizophrenia. Schizophrenia Bulletin. 2009 Mar 1;35(2):383-402.
10. Tsai J, Rosenheck RA. Psychiatric comorbidity among adults with schizophrenia: A latent class analysis. Psychiatry Research. 2013 Nov;210(1):16-20.
11. Laursen TM, Nordentoft M, Mortensen PB. Excess Early Mortality in Schizophrenia. Annual Review of Clinical Psychology. 2014 Mar 28;10(1):425-48.
12. Hooley JM. Social Factors in Schizophrenia. Current Directions in Psychological Science. 2010 Aug 11;19(4):238-42.
13. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. Nature. 2014 Jul 22;511(7510):421-7.
14. The Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke S, Walters JT, O'Donovan MC. Mapping genomic loci prioritises genes and implicates synaptic biology in schizophrenia. medRxiv. 2020;

15. Zamanpoor M. Schizophrenia in a genomic era: a review from the pathogenesis, genetic and environmental etiology to diagnosis and treatment insights. *Psychiatric Genetics*. 2020 Feb;30(1):1–9.
16. Stilo SA, Murray RM. Non-Genetic Factors in Schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*. 2019 Oct 14;21(10):100.
17. Marconi A, di Forti M, Lewis CM, Murray RM, Vassos E. Meta-analysis of the Association Between the Level of Cannabis Use and Risk of Psychosis. *Schizophrenia Bulletin*. 2016 Sep;42(5):1262–9.
18. Schoeler T, Monk A, Sami MB, Klamerus E, Foglia E, Brown R, et al. Continued versus discontinued cannabis use in patients with psychosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*. 2016 Mar;3(3):215–25.
19. Gibbs M, Winsper C, Marwaha S, Gilbert E, Broome M, Singh SP. Cannabis use and mania symptoms: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*. 2015 Jan;171:39–47.
20. Sara GE, Large MM, Matheson SL, Burgess PM, Malhi GS, Whiteford HA, et al. Stimulant use disorders in people with psychosis: A meta-analysis of rate and factors affecting variation. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2015 Feb 17;49(2):106–17.
21. Abdel-Baki A, Ouellet-Plamondon C, Salvat É, Grar K, Potvin S. Symptomatic and functional outcomes of substance use disorder persistence 2 years after admission to a first-episode psychosis program. *Psychiatry Research*. 2017 Jan;247:113–9.
22. Gurillo P, Jauhar S, Murray RM, MacCabe JH. Does tobacco use cause psychosis? Systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*. 2015 Aug;2(8):718–25.
23. Cannon TD, van Erp TGM, Rosso IM, Huttunen M, Lönngqvist J, Pirkola T, et al. Fetal Hypoxia and Structural Brain Abnormalities in Schizophrenic Patients, Their Siblings, and Controls. *Archives of General Psychiatry*. 2002 Jan 1;59(1):35.
24. Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB. Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: A Danish national register based study. *Schizophrenia Research*. 2007 Dec;97(1–3):51–9.
25. Boksa P. Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia. *Brain Research Reviews*. 2004 Apr;45(1):1–17.
26. Buka SL. Maternal Infections and Subsequent Psychosis Among Offspring. *Archives of General Psychiatry*. 2001 Nov 1;58(11):1032–7.

-
27. Lee YH, Cherkerzian S, Seidman LJ, Papandonatos GD, Savitz DA, Tsuang MT, et al. Maternal Bacterial Infection During Pregnancy and Offspring Risk of Psychotic Disorders: Variation by Severity of Infection and Offspring Sex. *American Journal of Psychiatry*. 2020 Jan 1;177(1):66–75.
 28. Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychological Medicine*. 2013 Feb 16;43(2):239–57.
 29. Davies G, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J. A Systematic Review and Meta-analysis of Northern Hemisphere Season of Birth Studies in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2003 Jan 1;29(3):587–93.
 30. Karlsson H, Dal H, Gardner RM, Torrey EF, Dalman C. Birth month and later diagnosis of schizophrenia. A population-based cohort study in Sweden. *Journal of Psychiatric Research*. 2019 Sep;116:1–6.
 31. Dalman C, Allebeck P, Gunnell D, Harrison G, Kristensson K, Lewis G, et al. Infections in the CNS During Childhood and the Risk of Subsequent Psychotic Illness: A Cohort Study of More Than One Million Swedish Subjects. *American Journal of Psychiatry*. 2008 Jan;165(1):59–65.
 32. Karlsson H, Dalman C. Epidemiological Studies of Prenatal and Childhood Infection and Schizophrenia. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2019;35–47.
 33. O'Donoghue B, Lyne JP, Fanning F, Kinsella A, Lane A, Turner N, et al. Social class mobility in first episode psychosis and the association with depression, hopelessness and suicidality. *Schizophrenia Research*. 2014 Aug;157(1–3):8–11.
 34. Vassos E, Pedersen CB, Murray RM, Collier DA, Lewis CM. Meta-Analysis of the Association of Urbanicity With Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2012 Nov;38(6):1118–23.
 35. Susser E, St Clair D. Prenatal famine and adult mental illness: Interpreting concordant and discordant results from the Dutch and Chinese Famines. *Social Science & Medicine*. 2013 Nov;97:325–30.
 36. Henssler J, Brandt L, Müller M, Liu S, Montag C, Sterzer P, et al. Migration and schizophrenia: meta-analysis and explanatory framework. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2020 Apr 4;270(3):325–35.
 37. Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: An affective neuroethological perspective. *Brain Research Reviews*. 2007 Dec;56(2):283–321.
 38. Patel KR, Cherian J, Gohil K, Atkinson D. Schizophrenia: overview and treatment options. *P T*. 2014 Sep;39(9):638–45.

39. Morris–Rosendahl DJ, Crocq MA. Neurodevelopmental disorders—the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2020 Mar 31;22(1):65–72.
40. Walker EF, Savoie T, Davis D. Neuromotor Precursors of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 1994 Jan 1;20(3):441–51.
41. Haijma S v., van Haren N, Cahn W, Koolschijn PCMP, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Brain Volumes in Schizophrenia: A Meta–Analysis in Over 18 000 Subjects. *Schizophrenia Bulletin*. 2013 Sep;39(5):1129–38.
42. Nenadic I, Dietzek M, Schönfeld N, Lorenz C, Gussew A, Reichenbach JR, et al. Brain structure in people at ultra–high risk of psychosis, patients with first–episode schizophrenia, and healthy controls: a VBM study. *Schizophrenia Research*. 2015 Feb;161(2–3):169–76.
43. Keshavan MS, Collin G, Guimond S, Kelly S, Prasad KM, Lizano P. Neuroimaging in Schizophrenia. *Neuroimaging Clinics of North America*. 2020 Feb;30(1):73–83.
44. van Erp TGM, Hibar DP, Rasmussen JM, Glahn DC, Pearlson GD, Andreassen OA, et al. Erratum: Subcortical brain volume abnormalities in 2028 individuals with schizophrenia and 2540 healthy controls via the ENIGMA consortium. *Molecular Psychiatry*. 2016 Apr 18;21(4):585–585.
45. van Erp TGM, Walton E, Hibar DP, Schmaal L, Jiang W, Glahn DC, et al. Cortical Brain Abnormalities in 4474 Individuals With Schizophrenia and 5098 Control Subjects via the Enhancing Neuro Imaging Genetics Through Meta Analysis (ENIGMA) Consortium. *Biol Psychiatry*. 2018;84(9):644–54.
46. Lee DK, Lee H, Park K, Joh E, Kim CE, Ryu S. Common gray and white matter abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder. *PLOS ONE*. 2020 May 7;15(5):e0232826.
47. Kelly S, Jahanshad N, Zalesky A, Kochunov P, Agartz I, Alloza C, et al. Widespread white matter microstructural differences in schizophrenia across 4322 individuals: results from the ENIGMA Schizophrenia DTI Working Group. *Molecular Psychiatry*. 2018 May 17;23(5):1261–9.
48. Kubicki M, Shenton ME. Diffusion Tensor Imaging findings and their implications in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*. 2014 May;27(3):179–84.
49. Schuurmans C, Kurrasch D. Neurodevelopmental consequences of maternal distress: what do we really know? *Clinical Genetics*. 2013 Feb;83(2):108–17.
50. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM. Spina bifida. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015 Dec 17;1(1):15007.

-
51. Kahle KT, Kulkarni A v, Limbrick DD, Warf BC. Hydrocephalus in children. *The Lancet*. 2016 Feb;387(10020):788–99.
 52. Haddad FL, Patel S v., Schmid S. Maternal Immune Activation by Poly I:C as a pre-clinical Model for Neurodevelopmental Disorders: A focus on Autism and Schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2020 Jun;113:546–67.
 53. de Graaf–Peters VB, Hadders–Algra M. Ontogeny of the human central nervous system: What is happening when? *Early Human Development*. 2006 Apr;82(4):257–66.
 54. Germann M, Brederoo SG, Sommer IEC. Abnormal synaptic pruning during adolescence underlying the development of psychotic disorders. *Current Opinion in Psychiatry*. 2021 May;34(3):222–7.
 55. Brown AS. Prenatal Infection as a Risk Factor for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2006 Apr 1;32(2):200–2.
 56. Müller N. Inflammation in Schizophrenia: Pathogenetic Aspects and Therapeutic Considerations. *Schizophrenia Bulletin*. 2018 Aug 20;44(5):973–82.
 57. Brown AS, Patterson PH. Maternal Infection and Schizophrenia: Implications for Prevention. *Schizophrenia Bulletin*. 2011 Mar 1;37(2):284–90.
 58. Hadar R, Soto–Montenegro ML, Götz T, Wieske F, Sohr R, Desco M, et al. Using a maternal immune stimulation model of schizophrenia to study behavioral and neurobiological alterations over the developmental course. *Schizophrenia Research*. 2015 Aug;166(1–3):238–47.
 59. Patel PK, Leathem LD, Currin DL, Karlsgodt KH. Adolescent Neurodevelopment and Vulnerability to Psychosis. *Biological Psychiatry*. 2021 Jan;89(2):184–93.
 60. Mak M, Misiak B, Frydecka D, Pełka–Wysiecka J, Kucharska–Mazur J, Samochowiec A, et al. Polymorphisms in immune–inflammatory response genes and the risk of deficit schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2018 Mar;193:359–63.
 61. Velásquez E, Martins–de–Souza D, Velásquez I, Carneiro GRA, Schmitt A, Falkai P, et al. Quantitative Subcellular Proteomics of the Orbitofrontal Cortex of Schizophrenia Patients. *Journal of Proteome Research*. 2019 Dec 6;18(12):4240–53.
 62. Debnath M, Cannon DM, Venkatasubramanian G. Variation in the major histocompatibility complex [MHC] gene family in schizophrenia: Associations and functional implications. *Progress in Neuro–Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2013 Apr;42:49–62.
 63. Flatow J, Buckley P, Miller BJ. Meta–Analysis of Oxidative Stress in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 2013 Sep;74(6):400–9.

64. Fraguas D, Gonzalez–Pinto A, Micó JA, Reig S, Parellada M, Martínez–Cengotita–bengoa M, et al. Decreased glutathione levels predict loss of brain volume in children and adolescents with first–episode psychosis in a two–year longitudinal study. *Schizophrenia Research*. 2012 May;137(1–3):58–65.
65. Ermakov EA, Dmitrieva EM, Parshukova DA, Kazantseva D v., Vasilieva AR, Smirnova LP. Oxidative Stress–Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 Jan 23;2021:1–37.
66. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta–Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. *Biological Psychiatry*. 2011 Oct;70(7):663–71.
67. Momtazmanesh S, Zare–Shahabadi A, Rezaei N. Cytokine Alterations in Schizophrenia: An Updated Review. *Frontiers in Psychiatry*. 2019 Dec 6;10.
68. Busse S, Busse M, Schiltz K, Biela H, Gos T, Brisch R, et al. Different distribution patterns of lymphocytes and microglia in the hippocampus of patients with residual versus paranoid schizophrenia: Further evidence for disease course–related immune alterations? *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012 Nov;26(8):1273–9.
69. Comer AL, Carrier M, Tremblay MÈ, Cruz–Martín A. The Inflamed Brain in Schizophrenia: The Convergence of Genetic and Environmental Risk Factors That Lead to Uncontrolled Neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020 Aug 27;14.
70. Laskaris LE, di Biase MA, Everall I, Chana G, Christopoulos A, Skafidas E, et al. Microglial activation and progressive brain changes in schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*. 2016 Feb;173(4):666–80.
71. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1 /M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*. 2016 Feb;173(4):649–65.
72. Steullet P, Cabungcal JH, Coyle J, Didriksen M, Gill K, Grace AA, et al. Oxidative stress–driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2017 Jul 21;22(7):936–43.
73. Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*. 2012 Jan;35(1):57–67.
74. Chew LJ, Fusar–Poli P, Schmitz T. Oligodendroglial Alterations and the Role of Microglia in White Matter Injury: Relevance to Schizophrenia. *Developmental Neuroscience*. 2013;35(2–3):102–29.

-
75. Davis KL, Stewart DG, Friedman JI, Buchsbaum M, Harvey PD, Hof PR, et al. White Matter Changes in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 2003 May 1;60(5):443.
 76. Rajasekaran A, Venkatasubramanian G, Berk M, Debnath M. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2015 Jan;48:10–21.
 77. Green MJ, Matheson SL, Shepherd A, Weickert CS, Carr VJ. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Molecular Psychiatry*. 2011 Sep 24;16(9):960–72.
 78. Golofast B, Vales K. The connection between microbiome and schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2020 Jan;108:712–31.
 79. Nocera A, Nasrallah HA. The Association of the Gut Microbiota with Clinical Features in Schizophrenia. *Behavioral Sciences*. 2022 Mar 25;12(4):89.
 80. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*. 2004 Jul;558(1):263–75.
 81. O’Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain–gut–microbiome axis. *Behavioural Brain Research*. 2015 Jan;277:32–48.
 82. Hoban AE, Stilling RM, Ryan FJ, Shanahan F, Dinan TG, Claesson MJ, et al. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Translational Psychiatry*. 2016 Apr 5;6(4):e774–e774.
 83. Luczynski P, Whelan SO, O’Sullivan C, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, et al. Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2016 Nov 8;44(9):2654–66.
 84. Davey KJ, Cotter PD, O’Sullivan O, Crispie F, Dinan TG, Cryan JF, et al. Antipsychotics and the gut microbiome: olanzapine–induced metabolic dysfunction is attenuated by antibiotic administration in the rat. *Translational Psychiatry*. 2013 Oct 1;3(10):e309–e309.
 85. Kao ACC, Spitzer S, Anthony DC, Lennox B, Burnet PWJ. Prebiotic attenuation of olanzapine–induced weight gain in rats: analysis of central and peripheral biomarkers and gut microbiota. *Translational Psychiatry*. 2018 Dec 15;8(1):66.
 86. Bastiaanssen TFS, Cowan CSM, Claesson MJ, Dinan TG, Cryan JF. Making Sense of ... the Microbiome in Psychiatry. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2019 Jan 1;22(1):37–52.

87. Schobel SA, Chaudhury NH, Khan UA, Paniagua B, Styner MA, Asllani I, et al. Imaging Patients with Psychosis and a Mouse Model Establishes a Spreading Pattern of Hippocampal Dysfunction and Implicates Glutamate as a Driver. *Neuron*. 2013 Apr;78(1):81–93.
88. Vidal PM, Pacheco R. The Cross-Talk Between the Dopaminergic and the Immune System Involved in Schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*. 2020 Mar 31;11.
89. Shen WW. A history of antipsychotic drug development. *Comprehensive Psychiatry*. 1999 Nov;40(6):407–14.
90. Li P, L. Snyder G, E. Vanover K. Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016 Oct 20;16(29):3385–403.
91. Muench J, Hamer AM. Adverse effects of antipsychotic medications. *Am Fam Physician*. 2010 Mar 1;81(5):617–22.
92. Kuroki T, Nagao N, Nakahara T. Neuropharmacology of second-generation antipsychotic drugs: a validity of the serotonin-dopamine hypothesis. *Progress in Brain Research*. 2008;199–212.
93. Ananth J, Burgoyne KS, Gadasalli R, Aquino S. How do the atypical antipsychotics work? *J Psychiatry Neurosci*. 2001 Nov;26(5):385–94.
94. Burghardt KJ, Seyoum B, Mallisho A, Burghardt PR, Kowluru RA, Yi Z. Atypical antipsychotics, insulin resistance and weight; a meta-analysis of healthy volunteer studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018 Apr;83:55–63.
95. Bostwick JR, Guthrie SK, Ellingrod VL. Antipsychotic-Induced Hyperprolactinemia. *Pharmacotherapy*. 2009 Jan;29(1):64–73.
96. Mailman R, Murthy V. Third Generation Antipsychotic Drugs: Partial Agonism or Receptor Functional Selectivity? *Current Pharmaceutical Design*. 2010 Feb 1;16(5):488–501.
97. Orsolini L, de Berardis D, Volpe U. Up-to-date expert opinion on the safety of recently developed antipsychotics. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2020 Aug 2;19(8):981–98.
98. Bugarski-Kirola D, Blaettler T, Arango C, Fleischhacker WW, Garibaldi G, Wang A, et al. Bitopertin in Negative Symptoms of Schizophrenia—Results From the Phase III FlashLyte and DayLyte Studies. *Biological Psychiatry*. 2017 Jul;82(1):8–16.
99. Dold M, Li C, Tardy M, Khorsand V, Gillies D, Leucht S. Benzodiazepines for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012 Nov 14;

-
100. Potkin SG, Kane JM, Correll CU, Lindenmayer JP, Agid O, Marder SR, et al. The neurobiology of treatment-resistant schizophrenia: paths to antipsychotic resistance and a roadmap for future research. *npj Schizophrenia*. 2020 Dec 7;6(1):1.
 101. Nucifora FC, Woznica E, Lee BJ, Cascella N, Sawa A. Treatment resistant schizophrenia: Clinical, biological, and therapeutic perspectives. *Neurobiology of Disease*. 2019 Nov;131:104257.
 102. Mijovic A, MacCabe JH. Clozapine-induced agranulocytosis. *Annals of Hematology*. 2020 Nov 20;99(11):2477–82.
 103. Sabe M, Zhao N, Crippa A, Kaiser S. Antipsychotics for negative and positive symptoms of schizophrenia: dose-response meta-analysis of randomized controlled acute phase trials. *npj Schizophrenia*. 2021 Dec 13;7(1):43.
 104. Breier A, Buchanan R, Kirkpatrick B, Davis O, Irish D, Summerfelt A, et al. Effects of clozapine on positive and negative symptoms in outpatients with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 1994 Jan;151(1):20–6.
 105. Lee MA, Thompson PA, Meltzer HY. Effects of clozapine on cognitive function in schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 1994 Sep;55 Suppl B:82–7.
 106. Khan AH, Zaidi S. Clozapine: Improvement of Negative Symptoms of Schizophrenia. *Cureus*. 2017 Dec 20;
 107. MacKenzie NE, Kowalchuk C, Agarwal SM, Costa-Dookhan KA, Caravaggio F, Gertsens P, et al. Antipsychotics, Metabolic Adverse Effects, and Cognitive Function in Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*. 2018 Dec 5;9.
 108. Stępnicki P, Kondej M, Koszła O, Żuk J, Kaczor AA. Multi-targeted drug design strategies for the treatment of schizophrenia. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2021 Jan 2;16(1):101–14.
 109. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science* (1979). 2006 Sep 29;313(5795):1929–35.
 110. Al-Amin M, Uddin MMN, Reza HM. Effects of Antipsychotics on the Inflammatory Response System of Patients with Schizophrenia in Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. 2013 Dec 28;11(3):144–51.
 111. de Witte L, Tomasik J, Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Kahn RS, et al. Cytokine alterations in first-episode schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment. *Schizophrenia Research*. 2014 Apr;154(1–3):23–9.

112. Pandurangi AK, Buckley PF. Inflammation, Antipsychotic Drugs, and Evidence for Effectiveness of Anti-inflammatory Agents in Schizophrenia. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2019;227-44.
113. Romero-Miguel D, Lamanna-Rama N, Casquero-Veiga M, Gómez-Rangel V, Desco M, Soto-Montenegro ML. Minocycline in neurodegenerative and psychiatric diseases: An update. *European Journal of Neurology*. 2021 Mar 24;28(3):1056-81.
114. Schmidt L, Phelps E, Friedel J, Shokrane F. Acetylsalicylic acid (aspirin) for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019 Aug 10;
115. Marini S, de Berardis D, Vellante F, Santacroce R, Orsolini L, Valchera A, et al. Celecoxib Adjunctive Treatment to Antipsychotics in Schizophrenia: A Review of Randomized Clinical Add-On Trials. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016:1-8.
116. Willborn RJ, Hall CP, Fuller MA. Recycling N-acetylcysteine: A review of evidence for adjunctive therapy in schizophrenia. *Mental Health Clinician*. 2019 May 1;9(3):116-23.
117. Hsu MC, Huang YS, Ouyang WC. Beneficial effects of omega-3 fatty acid supplementation in schizophrenia: possible mechanisms. *Lipids in Health and Disease*. 2020 Dec 3;19(1):159.
118. Plevin D, Galletly C. The neuropsychiatric effects of vitamin C deficiency: a systematic review. *BMC Psychiatry*. 2020 Dec 18;20(1):315.
119. Soares-Weiser K, Maayan N, Bergman H. Vitamin E for antipsychotic-induced tardive dyskinesia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018 Jan 17;2019(9).
120. Anderson G, Maes M. Melatonin: an overlooked factor in schizophrenia and in the inhibition of anti-psychotic side effects. *Metabolic Brain Disease*. 2012 Jun 25;27(2):113-9.
121. Kulkarni J, Riedel A, de Castella AR, Fitzgerald PB, Rolfe TJ, Taffe J, et al. Estrogen — a potential treatment for schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2001 Mar;48(1):137-44.
122. Javitt DC, Buchanan RW, Keefe RSE, Kern R, McMahon RP, Green MF, et al. Effect of the neuroprotective peptide davunetide (AL-108) on cognition and functional capacity in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2012 Apr;136(1-3):25-31.
123. Lamanna-Rama N, Romero-Miguel D, Desco M, Soto-Montenegro ML. An Update on the Exploratory Use of Curcumin in Neuropsychiatric Disorders. *Antioxidants*. 2022 Feb 10;11(2):353.

-
124. Cho M, Lee TY, Kwak Y bin, Yoon YB, Kim M, Kwon JS. Adjunctive use of anti-inflammatory drugs for schizophrenia: A meta-analytic investigation of randomized controlled trials. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2019 Aug 13;53(8):742–59.
 125. Stępnicki P, Kondej M, Kaczor AA. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules*. 2018 Aug 20;23(8):2087.
 126. Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Feldon J, Riva MA, et al. Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. *Translational Psychiatry*. 2016 Apr 5;6(4):e772–e772.
 127. Fusar-Poli P, Davies C, Solmi M, Brondino N, de Micheli A, Kotlicka-Antczak M, et al. Preventive Treatments for Psychosis: Umbrella Review (Just the Evidence). *Frontiers in Psychiatry*. 2019 Dec 11;10.
 128. Deepmala, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2015 Aug;55:294–321.
 129. Sheffner AL. The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Jun 28;106(2):298–310.
 130. Bateman DN, Dear JW. Acetylcysteine in paracetamol poisoning: a perspective of 45 years of use. *Toxicology Research*. 2019;8(4):489–98.
 131. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov A v. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior*. 2014 Mar 13;4(2):108–22.
 132. Katz M, Won SJ, Park Y, Orr A, Jones DP, Swanson RA, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of N-acetylcysteine after oral administration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2015 May;21(5):500–3.
 133. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*. 2011 Mar 1;36(2):78–86.
 134. Moran MM, McFarland K, Melendez R, Kalivas P, Seamans J. Cystine/Glutamate Exchange Regulates Metabotropic Glutamate Receptor Presynaptic Inhibition of Excitatory Transmission and Vulnerability to Cocaine Seeking. *Journal of Neuroscience*. 2005 Jul 6;25(27):6389–93.
 135. Janáky R, Dohovics R, Saransaari P, Oja SS. Modulation of [3H]Dopamine Release by Glutathione in Mouse Striatal Slices. *Neurochemical Research*. 2007 Jun 22;32(8):1357–64.

136. Gere-Pászti E, Jakus J. The effect of N-acetylcysteine on amphetamine-mediated dopamine release in rat brain striatal slices by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2009 Jun;23(6):658-64.
137. Mohanty P, Padhy B, Das S, Meher BR. Therapeutic potential of N-acetyl cysteine (NAC) in preventing cytokine storm in COVID-19: review of current evidence. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2021;25(6):2802-7.
138. Parmentier M, Hirani N, Rahman I, Donaldson K, MacNee W, Antonicelli F. Regulation of lipopolysaccharide-mediated interleukin-1 β release by N-acetylcysteine in THP-1 cells. *European Respiratory Journal*. 2000 Nov 1;16(5):933-9.
139. de Senzi Moraes Pinto R, Ferretti R, Moraes LHR, Neto HS, Marques MJ, Minatel E. N-Acetylcysteine treatment reduces TNF- α levels and myonecrosis in diaphragm muscle of mdx mice. *Clinical Nutrition*. 2013 Jun;32(3):472-5.
140. Saddadi F, Alatab S, Pasha F, Ganji M, Soleimanian T. The effect of treatment with N-acetylcysteine on the serum levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients on hemodialysis. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 2014;25(1):66.
141. Guo L, Zhang H, Li W, Zhan D, Wang M. N-acetyl cysteine inhibits lipopolysaccharide-mediated induction of interleukin-6 synthesis in MC3T3-E1 cells through the NF- κ B signaling pathway. *Archives of Oral Biology*. 2018 Sep;93:149-54.
142. Choy KHC, Dean O, Berk M, Bush AI, van den Buuse M. Effects of N-acetyl-cysteine treatment on glutathione depletion and a short-term spatial memory deficit in 2-cyclohexene-1-one-treated rats. *European Journal of Pharmacology*. 2010 Dec;649(1-3):224-8.
143. Dean OM, van den Buuse M, Berk M, Copolov DL, Mavros C, Bush AI. N-acetyl cysteine restores brain glutathione loss in combined 2-cyclohexene-1-one and d-amphetamine-treated rats: Relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience Letters*. 2011 Jul;499(3):149-53.
144. Möller M, du Preez JL, Viljoen FP, Berk M, Emsley R, Harvey BH. Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013 May;30:156-67.
145. Herrmann AP, Benvenuti R, Pilz LK, Elisabetsky E. N-acetylcysteine prevents increased amphetamine sensitivity in social isolation-reared mice. *Schizophrenia Research*. 2014 May;155(1-3):109-11.
146. Lutgen V, Qualmann K, Resch J, Kong L, Choi S, Baker DA. Reduction in phencyclidine induced sensorimotor gating deficits in the rat following increased system

-
- xc – activity in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Apr 29;226(3):531–40.
147. Chen HH, Stoker A, Markou A. The glutamatergic compounds sarcosine and N-acetylcysteine ameliorate prepulse inhibition deficits in metabotropic glutamate 5 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010 May 10;209(4):343–50.
 148. Swanepoel T, Möller M, Harvey BH. N-acetyl cysteine reverses bio-behavioural changes induced by prenatal inflammation, adolescent methamphetamine exposure and combined challenges. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018 Jan 8;235(1):351–68.
 149. Cabungcal JH, Counotte DS, Lewis EM, Tejada HA, Piantadosi P, Pollock C, et al. Juvenile Antioxidant Treatment Prevents Adult Deficits in a Developmental Model of Schizophrenia. *Neuron*. 2014 Sep;83(5):1073–84.
 150. Zhang L, Xu S, Huang Q, Xu H. N-acetylcysteine attenuates the cuprizone-induced behavioral changes and oligodendrocyte loss in male C57BL/7 mice via its anti-inflammation actions. *Journal of Neuroscience Research*. 2018 May;96(5):803–16.
 151. Dwir D, Cabungcal JH, Xin L, Giangreco B, Parietti E, Cleusix M, et al. Timely N-Acetyl-Cysteine and Environmental Enrichment Rescue Oxidative Stress-Induced Parvalbumin Interneuron Impairments via MMP9/RAGE Pathway: A Translational Approach for Early Intervention in Psychosis. *Schizophrenia Bulletin*. 2021 Oct 21;47(6):1782–94.
 152. Cabungcal JH, Steullet P, Kraftsik R, Cuenod M, Do KQ. Early-Life Insults Impair Parvalbumin Interneurons via Oxidative Stress: Reversal by N-Acetylcysteine. *Biological Psychiatry*. 2013 Mar;73(6):574–82.
 153. Lavoie S, Murray MM, Deppen P, Knyazeva MG, Berk M, Boulat O, et al. Glutathione Precursor, N-Acetyl-Cysteine, Improves Mismatch Negativity in Schizophrenia Patients. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Aug 14;33(9):2187–99.
 154. Berk M, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, et al. N-Acetyl Cysteine as a Glutathione Precursor for Schizophrenia—A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Biological Psychiatry*. 2008 Sep;64(5):361–8.
 155. Breier A, Liffick E, Hummer TA, Vohs JL, Yang Z, Mehdiyoun NF, et al. Effects of 12-month, double-blind N-acetyl cysteine on symptoms, cognition and brain morphology in early phase schizophrenia spectrum disorders. *Schizophrenia Research*. 2018 Sep;199:395–402.
 156. Dean OM, Mancuso SG, Bush AI, Copolov D, Do KQ, Cuénod M, et al. Benefits of adjunctive N-acetylcysteine in a sub-group of clozapine-treated individuals diagnosed with schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2015 Dec;230(3):982–3.

157. Farokhnia M, Azarkolah A, Adinehfar F, Khodaie–Ardakani MR, Hosseini SMR, Yekehtaz H, et al. N–Acetylcysteine as an Adjunct to Risperidone for Treatment of Negative Symptoms in Patients With Chronic Schizophrenia. *Clinical Neuropharmacology*. 2013 Nov;36(6):185–92.
158. Rapado–Castro M, Dodd S, Bush AI, Malhi GS, Skvarc DR, On ZX, et al. Cognitive effects of adjunctive N–acetyl cysteine in psychosis. *Psychological Medicine*. 2017 Apr 29;47(5):866–76.
159. Conus P, Seidman LJ, Fournier M, Xin L, Cleusix M, Baumann PS, et al. N–acetyl–cysteine in a Double–Blind Randomized Placebo–Controlled Trial: Toward Bi–omarker–Guided Treatment in Early Psychosis. *Schizophrenia Bulletin*. 2018 Feb 15;44(2):317–27.
160. Rapado–Castro M, Berk M, Venugopal K, Bush AI, Dodd S, Dean OM. Towards stage specific treatments: Effects of duration of illness on therapeutic response to adjunctive treatment with N–acetyl cysteine in schizophrenia. *Progress in Neuro–Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2015 Mar;57:69–75.
161. Sepehrmanesh Z, Heidary M, Akasheh N, Akbari H, Heidary M. Therapeutic effect of adjunctive N–acetyl cysteine (NAC) on symptoms of chronic schizophrenia: A double–blind, randomized clinical trial. *Progress in Neuro–Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018 Mar;82:289–96.
162. Uzun Ö, Bolu A, Çelik C. Effect of N–acetylcysteine on clozapine–induced sialorrhea in schizophrenic patients: a case series. *International Clinical Psychopharmacology*. 2020;35:229–31.
163. Klauser P, Xin L, Fournier M, Griffa A, Cleusix M, Jenni R, et al. N–acetylcysteine add–on treatment leads to an improvement of fornix white matter integrity in early psychosis: a double–blind randomized placebo–controlled trial. *Translational Psychiatry*. 2018 Dec 12;8(1):220.
164. Mullier E, Roine T, Griffa A, Xin L, Baumann PS, Klauser P, et al. N–Acetyl–Cysteine Supplementation Improves Functional Connectivity Within the Cingulate Cortex in Early Psychosis: A Pilot Study. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2019 Aug 1;22(8):478–87.
165. McQueen G, Lally J, Collier T, Zelaya F, Lythgoe DJ, Barker GJ, et al. Effects of N–acetylcysteine on brain glutamate levels and resting perfusion in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018 Oct 23;235(10):3045–54.
166. Cholewski M, Tomczykowa M, Tomczyk M. A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega–3 Fatty Acids. *Nutrients*. 2018 Nov 4;10(11):1662.

-
167. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH. The Importance of Marine Omega-3s for Brain Development and the Prevention and Treatment of Behavior, Mood, and Other Brain Disorders. *Nutrients*. 2020 Aug 4;12(8):2333.
 168. Simopoulos AP. Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*. 2011 Oct 29;44(2):203-15.
 169. Guesnet P, Alessandri JM. Docosaehaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie*. 2011 Jan;93(1):7-12.
 170. Carver JD, Benford VJ, Han B, Cantor AB. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Research Bulletin*. 2001 Sep;56(2):79-85.
 171. Taha AY, Cheon Y, Ma K, Rapoport SI, Rao JS. Altered fatty acid concentrations in prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Journal of Psychiatric Research*. 2013 May;47(5):636-43.
 172. Solberg DK, Bentsen H, Refsum H, Andreassen OA. Association between serum lipids and membrane fatty acids and clinical characteristics in patients with schizophrenia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2015 Oct;132(4):293-300.
 173. Sethom MM, Fares S, Bouaziz N, Melki W, Jemaa R, Feki M, et al. Polyunsaturated fatty acids deficits are associated with psychotic state and negative symptoms in patients with schizophrenia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2010 Sep;83(3):131-6.
 174. Berger M, Nelson B, Markulev C, Yuen HP, Schäfer MR, Mossaheb N, et al. Relationship Between Polyunsaturated Fatty Acids and Psychopathology in the NEURAPRO Clinical Trial. *Frontiers in Psychiatry*. 2019 Jun 6;10.
 175. Smesny S, Kunstmann C, Kunstmann S, Willhardt I, Lasch J, Yotter RA, et al. Phospholipase A2 activity in first episode schizophrenia: Associations with symptom severity and outcome at week 12. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2011 Dec 14;12(8):598-607.
 176. Gammone M, Riccioni G, Parrinello G, D'Orazio N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport. *Nutrients*. 2018 Dec 27;11(1):46.
 177. Kang JX, Weylandt KH. Modulation of Inflammatory Cytokines by Omega-3 Fatty Acids. *Lipids in Health and Disease*. 2008;49:133-43.
 178. Guo C, Liu Y, Fang M sheng, Li Y, Li W, Mahaman YAR, et al. ω -3PUFAs Improve Cognitive Impairments Through Ser133 Phosphorylation of CREB Upregulating BDNF/TrkB Signal in Schizophrenia. *Neurotherapeutics*. 2020 Jul 4;17(3):1271-86.

179. Fang M sheng, Li X, Qian H, Zeng K, Ye M, Zhou Y jie, et al. ω -3PUFAs prevent MK-801-induced cognitive impairment in schizophrenic rats via the CREB/BDNF/TrkB pathway. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2017 Aug 8;37(4):491-5.
180. Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, de Oliveira MB, et al. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*. 2014 Feb;259:223-31.
181. Ozyurt B, Sarsilmaz M, Akpolat N, Ozyurt H, Akyol O, Herken H, et al. The protective effects of omega-3 fatty acids against MK-801-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. *Neurochemistry International*. 2007 Jan;50(1):196-202.
182. El-Sayed El-Sisi A, Sokkar SS, El-Sayed El-Sayad M, Sayed Ramadan E, Osman EY. Celecoxib and omega-3 fatty acids alone and in combination with risperidone affect the behavior and brain biochemistry in amphetamine-induced model of schizophrenia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016 Aug;82:425-31.
183. Ribeiro BMM, Chaves Filho AJM, Costa DV da S, de Menezes AT, da Fonseca ACC, Gama CS, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids and clozapine abrogates poly I: C-induced immune alterations in primary hippocampal neurons. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019 Mar;90:186-96.
184. Li Q, Leung YO, Zhou I, Ho LC, Kong W, Basil P, et al. Dietary supplementation with n-3 fatty acids from weaning limits brain biochemistry and behavioural changes elicited by prenatal exposure to maternal inflammation in the mouse model. *Translational Psychiatry*. 2015 Sep 22;5(9):e641-e641.
185. Peet M, Brind J, Ramchand CN, Shah S, Vankar GK. Two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2001 Apr;49(3):243-51.
186. Peet M, Horrobin DF. A dose-ranging exploratory study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with persistent schizophrenic symptoms. *Journal of Psychiatric Research*. 2002 Jan;36(1):7-18.
187. Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, et al. Long-Chain ω -3 Fatty Acids for Indicated Prevention of Psychotic Disorders. *Archives of General Psychiatry*. 2010 Feb 1;67(2):146.
188. Robinson DG, Gallego JA, John M, Hanna LA, Zhang JP, Birnbaum ML, et al. A potential role for adjunctive omega-3 polyunsaturated fatty acids for depression and anxiety symptoms in recent onset psychosis: Results from a 16 week randomized placebo-controlled trial for participants concurrently treated with risperidone. *Schizophrenia Research*. 2019 Feb;204:295-303.

-
189. Jamilian H, Solhi H, Jamilian M. Randomized, Placebo–Controlled Clinical Trial of Omega–3 as Supplemental Treatment in Schizophrenia. *Global Journal of Health Science*. 2014 Sep 18;6(7).
 190. Emsley R, Myburgh C, Oosthuizen P, van Rensburg SJ. Randomized, Placebo–Controlled Study of Ethyl–Eicosapentaenoic Acid as Supplemental Treatment in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 2002 Sep;159(9):1596–8.
 191. Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Dec 22;95(26):15769–74.
 192. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a Tetracycline Derivative, Is Neuroprotective against Excitotoxicity by Inhibiting Activation and Proliferation of Microglia. *The Journal of Neuroscience*. 2001 Apr 15;21(8):2580–8.
 193. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline Provides Neuroprotection Against N–Methyl–aspartate Neurotoxicity by Inhibiting Microglia. *The Journal of Immunology*. 2001 Jun 15;166(12):7527–33.
 194. Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *The Lancet Neurology*. 2004 Dec;3(12):744–51.
 195. Dean OM, Data–Franco J, Giorlando F, Berk M. Minocycline: therapeutic potential in psychiatry. *CNS Drugs*. 2012 May;26(5):391–401.
 196. Miyaoka T, Yasukawa R, Yasuda H, Hayashida M, Inagaki T, Horiguchi J. Possible antipsychotic effects of minocycline in patients with schizophrenia. *Progress in Neuro–Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2007 Jan;31(1):304–7.
 197. Fujita Y, Ishima T, Kunitachi S, Hagiwara H, Zhang L, Iyo M, et al. Phencyclidine–induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of the antibiotic drug minocycline. *Progress in Neuro–Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2008 Feb;32(2):336–9.
 198. Levkovitz Y, Levi U, Braw Y, Cohen H. Minocycline, a second–generation tetracycline, as a neuroprotective agent in an animal model of schizophrenia. *Brain Research*. 2007 Jun;1154:154–62.
 199. Zhang L, Shirayama Y, Iyo M, Hashimoto K. Minocycline Attenuates Hyperlocomotion and Prepulse Inhibition Deficits in Mice after Administration of the NMDA Receptor Antagonist Dizocilpine. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Sep 17;32(9):2004–10.
 200. Liu F, Guo X, Wu R, Ou J, Zheng Y, Zhang B, et al. Minocycline supplementation for treatment of negative symptoms in early–phase schizophrenia: A double blind,

- randomized, controlled trial. *Schizophrenia Research*. 2014 Mar;153(1-3):169-76.
201. Ghanizadeh A, Dehbozorgi S, OmraniSigaroodi M, Rezaei Z. Minocycline as Add-On Treatment Decreases the Negative Symptoms of Schizophrenia; A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. 2014 Dec 19;8(3):211-5.
 202. Khodaie-Ardakani MR, Mirshafiee O, Farokhnia M, Tajdini M, Hosseini SMR, Modabbernia A, et al. Minocycline add-on to risperidone for treatment of negative symptoms in patients with stable schizophrenia: Randomized double-blind placebo-controlled study. *Psychiatry Research*. 2014 Mar;215(3):540-6.
 203. Levkovitz Y, Mendlovich S, Riwkes S, Braw Y, Levkovitch-Verbin H, Gal G, et al. A Double-Blind, Randomized Study of Minocycline for the Treatment of Negative and Cognitive Symptoms in Early-Phase Schizophrenia. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2010 Feb 15;71(02):138-49.
 204. Kelly DL, Sullivan KM, McEvoy JP, McMahon RP, Wehring HJ, Gold JM, et al. Adjunctive Minocycline in Clozapine-Treated Schizophrenia Patients With Persistent Symptoms. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2015 Aug;35(4):374-81.
 205. Chaudhry IB, Hallak J, Husain N, Minhas F, Stirling J, Richardson P, et al. Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment. *Journal of Psychopharmacology*. 2012 Sep 23;26(9):1185-93.
 206. Chaves C, Marque CR, Maia-de-Oliveira JP, Wichert-Ana L, Ferrari TB, Santos AC, et al. Effects of minocycline add-on treatment on brain morphometry and cerebral perfusion in recent-onset schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2015 Feb;161(2-3):439-45.
 207. Deakin B, Suckling J, Barnes TRE, Byrne K, Chaudhry IB, Dazzan P, et al. The benefit of minocycline on negative symptoms of schizophrenia in patients with recent-onset psychosis (BeneMin): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Psychiatry*. 2018 Nov;5(11):885-94.
 208. Zhang L, Zheng H, Wu R, Kosten TR, Zhang XY, Zhao J. The effect of minocycline on amelioration of cognitive deficits and pro-inflammatory cytokines levels in patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2019 Oct;212:92-8.
 209. Jaaro-Peled H. Gene models of schizophrenia: DISC1 mouse models. *Progress in Brain Research*. 2009;179:75-86.
 210. Bassett AS, Chow EWC. Schizophrenia and 22q11.2 deletion syndrome. *Current Psychiatry Reports*. 2008 Apr 4;10(2):148-57.

-
211. Stefansson H, Petursson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, et al. Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics*. 2002 Oct;71(4):877-92.
 212. Talbot K. The sandy (sdy) mouse: a dysbindin-1 mutant relevant to schizophrenia research. In 2009. p. 87-94.
 213. Negrón-Oyarzo I, Lara-Vásquez A, Palacios-García I, Fuentealba P, Aboitiz F. Schizophrenia and reelin: a model based on prenatal stress to study epigenetics, brain development and behavior. *Biological Research*. 2016 Dec 11;49(1):16.
 214. Ellenbroek BA, Cools AR. Apomorphine Susceptibility and Animal Models for Psychopathology: Genes and Environment. *Behavior Genetics*. 2002;32(5):349-61.
 215. Hawken ER, Beninger RJ. The amphetamine sensitization model of schizophrenia symptoms and its effect on schedule-induced polydipsia in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014 May 16;231(9):2001-8.
 216. Eyjolfsson EM, Brenner E, Kondziella D, Sonnewald U. Repeated injection of MK801: An animal model of schizophrenia? *Neurochemistry International*. 2006 May;48(6-7):541-6.
 217. Enomoto T, Noda Y, Nabeshima T. Phencyclidine and genetic animal models of schizophrenia developed in relation to the glutamate hypothesis. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 2007;29(4):291.
 218. Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology*. 2012 Nov;63(6):1161-71.
 219. Wilson C, Terry A. Neurodevelopmental Animal Models of Schizophrenia: Role in Novel Drug Discovery and Development. *Clinical Schizophrenia & Related Psychoses*. 2010 Jul;4(2):124-37.
 220. McGrath JJ, Burne TH, Feron F, Mackay-Sim A, Eyles DW. Developmental Vitamin D Deficiency and Risk of Schizophrenia: A 10-Year Update. *Schizophrenia Bulletin*. 2010 Nov 1;36(6):1073-8.
 221. Carney RSE. Does Prenatal Exposure to Maternal Inflammation Causes Sex Differences in Schizophrenia-Related Behavioral Outcomes in Adult Rats? *eneuro*. 2019 Nov 12;6(6):ENEURO.0393-19.2019.
 222. Reisinger S, Khan D, Kong E, Berger A, Pollak A, Pollak DD. The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015 May;149:213-26.

223. Bao M, Hofsink N, Plösch T. LPS versus Poly I:C model: comparison of long-term effects of bacterial and viral maternal immune activation on the offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2022 Feb 1;322(2):R99-111.
224. Solek CM, Farooqi N, Verly M, Lim TK, Ruthazer ES. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Developmental Dynamics*. 2018 Apr;247(4):588-619.
225. Matsumoto M, Seya T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008 Apr 29;60(7):805-12.
226. Nishimura M, Naito S. Tissue-Specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-Like Receptors and Related Genes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(5):886-92.
227. Hannachi N, el Kissi Y, Samoud S, Nakhli J, Letaief L, Gaabout S, et al. High prevalence of Human Herpesvirus 8 in schizophrenic patients. *Psychiatry Research*. 2014 May;216(2):192-7.
228. Chou S, Jones S, Li M. Adolescent olanzapine sensitization is correlated with hippocampal stem cell proliferation in a maternal immune activation rat model of schizophrenia. *Brain Research*. 2015 Aug;1618:122-35.
229. Hui CW, St-Pierre A, el Hajj H, Remy Y, Hébert SS, Luheshi GN, et al. Prenatal Immune Challenge in Mice Leads to Partly Sex-Dependent Behavioral, Microglial, and Molecular Abnormalities Associated with Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018 Feb 8;11.
230. Okamoto K, Hitora-Imamura N, Hioki H, Ikegaya Y. GABAergic malfunction in the anterior cingulate cortex underlying maternal immune activation-induced social deficits. *Journal of Neuroimmunology*. 2018 Aug;321:92-6.
231. Scumpia PO, Kelly KM, Reeves WH, Stevens BR. Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes. *Glia*. 2005 Nov 1;52(2):153-62.
232. Singh B, Dhuriya YK, Patro N, Thakur MK, Khanna VK, Patro IK. Early life exposure to poly I:C impairs striatal DA-D2 receptor binding, myelination and associated behavioural abilities in rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2021 Dec;118:102035.
233. Arrode-Brusés G, Brusés JL. Maternal immune activation by poly(I:C) induces expression of cytokines IL-1 β and IL-13, chemokine MCP-1 and colony stimulating factor VEGF in fetal mouse brain. *Journal of Neuroinflammation*. 2012 Dec 30;9(1):605.

-
234. Gasull-Camós J, Soto-Montenegro ML, Casquero-Veiga M, Desco M, Artigas F, Castañé A. Differential Patterns of Subcortical Activity Evoked by Glial GLT-1 Blockade in Prelimbic and Infralimbic Cortex: Relationship to Antidepressant-Like Effects in Rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2017 Dec 1;20(12):988-93.
235. Abella M, Vaquero JJ, Sisniega A, Pascau J, Udías A, García V, et al. Software architecture for multi-bed FDK-based reconstruction in X-ray CT scanners. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2012 Aug;107(2):218-32.
236. MacDowell KS, García-Bueno B, Madrigal JLM, Parellada M, Arango C, Micó JA, et al. Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2013 Feb 1;16(1):121-35.
237. Ratty AK, Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. 1988 Feb;39(1):69-79.
238. Fernández J, García L, Monte J, Villar C, Lombó F. Functional Anthocyanin-Rich Sausages Diminish Colorectal Cancer in an Animal Model and Reduce Pro-Inflammatory Bacteria in the Intestinal Microbiota. *Genes (Basel)*. 2018 Mar 1;9(3):133.
239. Borghammer P, Aanerud J, Gjedde A. Data-driven intensity normalization of PET group comparison studies is superior to global mean normalization. *Neuroimage*. 2009 Jul;46(4):981-8.
240. Casquero-Veiga M, García-García D, MacDowell KS, Pérez-Caballero L, Torres-Sánchez S, Fraguas D, et al. Risperidone administered during adolescence induced metabolic, anatomical and inflammatory/oxidative changes in adult brain: A PET and MRI study in the maternal immune stimulation animal model. *European Neuropsychopharmacology*. 2019 Jul;29(7):880-96.
241. Valdés-Hernández PA, Sumiyoshi A, Nonaka H, Haga R, Aubert-Vásquez E, Ogawa T, et al. An in vivo MRI template set for morphometry, tissue segmentation, and fMRI localization in rats. *Frontiers in Neuroinformatics*. 2011;
242. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 2019 Aug 24;37(8):852-7.
243. Das A, Chai JC, Kim SH, Lee YS, Park KS, Jung KH, et al. Transcriptome sequencing of microglial cells stimulated with TLR3 and TLR4 ligands. *BMC Genomics*. 2015 Dec 10;16(1):517.
244. Mattei D, Ivanov A, Ferrai C, Jordan P, Guneykaya D, Buonfiglioli A, et al. Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the

- adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Translational Psychiatry*. 2017 May 9;7(5):e1120–e1120.
245. Gandal MJ, Zhang P, Hadjimichael E, Walker RL, Chen C, Liu S, et al. Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder. *Science* (1979). 2018 Dec 14;362(6420).
246. Fromer M, Roussos P, Sieberts SK, Johnson JS, Kavanagh DH, Perumal TM, et al. Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia. *Nature Neuroscience*. 2016 Nov 26;19(11):1442–53.
247. Sabunciyan S. Gene Expression Profiles Associated with Brain Aging are Altered in Schizophrenia. *Scientific Reports*. 2019 Dec 11;9(1):5896.
248. Sanchez-Burgos L, Gómez-López G, Al-Shahrour F, Fernandez-Capetillo O. An in silico analysis identifies drugs potentially modulating the cytokine storm triggered by SARS-CoV-2 infection. *Scientific Reports*. 2022 Dec 31;12(1):1626.
249. Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, Peck DD, Natoli TE, Lu X, et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell*. 2017 Nov;171(6):1437–1452.e17.
250. Korotkevich G, Sukhov V, Budin N, Shpak B, Artyomov MN, Sergushichev A. Fast gene set enrichment analysis. *bioRxiv*.
251. Sinha S, Cheng K, Schäffer AA, Aldape K, Schiff E, Ruppin E. In vitro and in vivo identification of clinically approved drugs that modify ACE2 expression. *Molecular Systems Biology*. 2020 Jul 29;16(7).
252. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*. 2007 Jul;4(3):316–29.
253. Costa M, Bernardi J, Fiuza T, Costa L, Brandão R, Pereira ME. N-acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice. *Chemico-Biological Interactions*. 2016 Jun;253:10–7.
254. Swerdlow NR. Assessing the Validity of an Animal Model of Deficient Sensorimotor Gating in Schizophrenic Patients. *Archives of General Psychiatry*. 1994 Feb 1;51(2):139.
255. Kumari V, Soni W, Mathew VM. Prepulse Inhibition of the Startle Response in Men With Schizophrenia Effects of Age of Onset of Illness, Symptoms, and Medication. *Archives Of General Psychiatry*. 2000;57(6):609–14.
256. Rohleder C, Wiedermann D, Neumaier B, Drzezga A, Timmermann L, Graf R, et al. The Functional Networks of Prepulse Inhibition: Neuronal Connectivity Analysis Based on FDG-PET in Awake and Unrestrained Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2016 Jul 21;10.

-
257. Maas DA, Eijsink VD, van Hulten JA, Panic R, de Weerd P, Homberg JR, et al. Anti-oxidant treatment ameliorates prefrontal hypomyelination and cognitive deficits in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2021 May 9;46(6):1161–71.
258. Healy–Stoffel M, Levant B. N–3 (Omega–3) Fatty Acids: Effects on Brain Dopamine Systems and Potential Role in the Etiology and Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*. 2018 Jun 19;17(3):216–32.
259. Zhu F, Zheng Y, Liu Y, Zhang X, Zhao J. Minocycline alleviates behavioral deficits and inhibits microglial activation in the offspring of pregnant mice after administration of polyriboinosinic–polyribocytidilic acid. *Psychiatry Research*. 2014 Nov;219(3):680–6.
260. Laskaris LE, di Biase MA, Everall I, Chana G, Christopoulos A, Skafidas E, et al. Microglial activation and progressive brain changes in schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*. 2016 Feb;173(4):666–80.
261. Gober R, Ardalan M, Shiadeh SMJ, Duque L, Garamszegi SP, Ascona M, et al. Microglia activation in postmortem brains with schizophrenia demonstrates distinct morphological changes between brain regions. *Brain Pathology*. 2022 Jan 23;32(1).
262. Veijola J, Guo JY, Moilanen JS, Jääskeläinen E, Miettunen J, Kyllönen M, et al. Longitudinal Changes in Total Brain Volume in Schizophrenia: Relation to Symptom Severity, Cognition and Antipsychotic Medication. *PLoS ONE*. 2014 Jul 18;9(7):e101689.
263. Moberget T, Doan NT, Alnæs D, Kaufmann T, Córdova–Palomera A, Lagerberg T v, et al. Cerebellar volume and cerebellocerebral structural covariance in schizophrenia: a multisite mega–analysis of 983 patients and 1349 healthy controls. *Molecular Psychiatry*. 2018 Jun 16;23(6):1512–20.
264. van Erp TGM, Walton E, Hibar DP, Schmaal L, Jiang W, Glahn DC, et al. Cortical Brain Abnormalities in 4474 Individuals With Schizophrenia and 5098 Control Subjects via the Enhancing Neuro Imaging Genetics Through Meta Analysis (ENIGMA) Consortium. *Biological Psychiatry*. 2018 Nov;84(9):644–54.
265. Heckers S, Konradi C. Hippocampal neurons in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission*. 2002 May 1;109(5–6):891–905.
266. Horga G, Bernacer J, Dusi N, Entis J, Chu K, Hazlett EA, et al. Correlations between ventricular enlargement and gray and white matter volumes of cortex, thalamus, striatum, and internal capsule in schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2011 Oct 24;261(7):467–76.

267. Owens DGC, Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Jagoe JR, Kreef L. Lateral ventricular size in schizophrenia: relationship to the disease process and its clinical manifestations. *Psychological Medicine*. 1985 Feb 9;15(1):27–41.
268. Puri BK, Richardson AJ, Horrobin DF, Easton T, Saeed N, Oatridge A, et al. Eicosapentaenoic acid treatment in schizophrenia associated with symptom remission, normalisation of blood fatty acids, reduced neuronal membrane phospholipid turnover and structural brain changes. *Int J Clin Pract*. 2000;54(1):57–63.
269. Wu J, Yang S, Hua Y, Liu W, Keep RF, Xi G. Minocycline Attenuates Brain Edema, Brain Atrophy and Neurological Deficits After Intracerebral Hemorrhage. In 2010. p. 147–50.
270. Tregellas JR, Smucny J, Harris JG, Olincy A, Maharajh K, Kronberg E, et al. Intrinsic Hippocampal Activity as a Biomarker for Cognition and Symptoms in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 2014 May;171(5):549–56.
271. Cutuli D, Pagani M, Caporali P, Galbusera A, Laricchiuta D, Foti F, et al. Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Cognitive Functions and Neural Substrates: A Voxel-Based Morphometry Study in Aged Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2016 Mar 4;8.
272. Cutuli D, de Bartolo P, Caporali P, Laricchiuta D, Foti F, Ronci M, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation enhances hippocampal functionality in aged mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2014 Aug 25;6.
273. Borsini A, Stangl D, Jeffries AR, Pariante CM, Thuret S. The role of omega-3 fatty acids in preventing glucocorticoid-induced reduction in human hippocampal neurogenesis and increase in apoptosis. *Translational Psychiatry*. 2020 Dec 7;10(1):219.
274. Knuckey NW, Palm D, Primiano M, Epstein MH, Johanson CE. N-Acetylcysteine Enhances Hippocampal Neuronal Survival After Transient Forebrain Ischemia in Rats. *Stroke*. 1995 Feb;26(2):305–11.
275. Jiang Y, Liu Y, Zhu C, Ma X, Ma L, Zhou L, et al. Minocycline enhances hippocampal memory, neuroplasticity and synapse-associated proteins in aged C57 BL/6 mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2015 May;121:20–9.
276. Berens SC, Bird CM, Harrison NA. Minocycline differentially modulates human spatial memory systems. *Neuropsychopharmacology*. 2020 Dec 24;45(13):2162–9.
277. Laidi C, d'Albis MA, Wessa M, Linke J, Phillips ML, Delavest M, et al. Cerebellar volume in schizophrenia and bipolar I disorder with and without psychotic features. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2015 Mar;131(3):223–33.

-
278. Parker KL, Narayanan NS, Andreasen NC. The therapeutic potential of the cerebellum in schizophrenia. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2014 Sep 15;8.
279. Kim SE, Jung S, Sung G, Bang M, Lee SH. Impaired cerebro-cerebellar white matter connectivity and its associations with cognitive function in patients with schizophrenia. *npj Schizophrenia*. 2021 Dec 12;7(1):38.
280. Maria Sens P, Ribeiro de Almeida CI. Participation of the Cerebellum in Auditory Processing. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2007 Mar;73(2):266–70.
281. Guo X, Li J, Wang J, Fan X, Hu M, Shen Y, et al. Hippocampal and orbital inferior frontal gray matter volume abnormalities and cognitive deficit in treatment-naive, first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2014 Feb;152(2-3):339–43.
282. Lacerda ALT, Hardan AY, Yorbik O, Vemulapalli M, Prasad KM, Keshavan MS. Morphology of the orbitofrontal cortex in first-episode schizophrenia: Relationship with negative symptomatology. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2007 Mar;31(2):510–6.
283. Bradley AJ, Dinan TG. Review: A systematic review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. *Journal of Psychopharmacology*. 2010 Nov 5;24(4_suppl):91–118.
284. Tognin S, Rambaldelli G, Perlini C, Bellani M, Marinelli V, Zoccatelli G, et al. Enlarged hypothalamic volumes in schizophrenia. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2012 Nov;204(2-3):75–81.
285. Koolschijn PCMP, van Haren NEM, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Hypothalamus volume in twin pairs discordant for schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*. 2008 Apr;18(4):312–5.
286. Klomp A, Koolschijn PCMP, Hulshoff Pol HE, Kahn RS, van Haren NEM. Hypothalamus and pituitary volume in schizophrenia: a structural MRI study. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2012 Mar 20;15(02):281–8.
287. Lee DK, Lee H, Park K, Joh E, Kim CE, Ryu S. Common gray and white matter abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder. *PLOS ONE*. 2020 May 7;15(5):e0232826.
288. Sudheimer K, Keller J, Gomez R, Tennakoon L, Reiss A, Garrett A, et al. Decreased Hypothalamic Functional Connectivity with Subgenual Cortex in Psychotic Major Depression. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Mar 8;40(4):849–60.
289. Pu H, Guo Y, Zhang W, Huang L, Wang G, Liou AK, et al. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Improves Neurologic Recovery and Attenuates White

- Matter Injury after Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013 Sep 26;33(9):1474–84.
290. el Sharouny SH, Shaaban MH, Elsayed RM, Tahef AW, Abd ElWahed MK. N-acetylcysteine protects against cuprizone-induced demyelination: histological and immunohistochemical study. *Folia Morphologica*. 2021 Apr 29;
291. Gankam-Kengne F, Soupart A, Pochet R, Brion JP, Decaux G. Minocycline Protects against Neurologic Complications of Rapid Correction of Hyponatremia. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010 Dec;21(12):2099–108.
292. Kim JH, Kim JH, Son YD, Joo YH, Lee SY, Kim HK, et al. Altered interregional correlations between serotonin transporter availability and cerebral glucose metabolism in schizophrenia: A high-resolution PET study using [^{11}C]DASB and [^{18}F]FDG. *Schizophrenia Research*. 2017 Apr;182:55–65.
293. Andreasen NC, Pierson R. The Role of the Cerebellum in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 2008 Jul;64(2):81–8.
294. Monti DA, Zabrecky G, Leist TP, Wintering N, Bazzan AJ, Zhan T, et al. N-acetylcysteine Administration Is Associated With Increased Cerebral Glucose Metabolism in Patients With Multiple Sclerosis: An Exploratory Study. *Frontiers in Neurology*. 2020 Feb 14;11.
295. Pifferi F, Dorieux O, Castellano CA, Croteau E, Masson M, Guillemier M, et al. Long-chain n-3 PUFAs from fish oil enhance resting state brain glucose utilization and reduce anxiety in an adult nonhuman primate, the grey mouse lemur. *Journal of Lipid Research*. 2015 Aug;56(8):1511–8.
296. Ximenes da Silva A, Lavielle F, Gendrot G, Guesnet P, Alessandri JM, Lavielle M. Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Neurochemistry*. 2002 Jun 6;81(6):1328–37.
297. Wang L, Pavlou S, Du X, Bhuckory M, Xu H, Chen M. Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis. *Molecular Neurodegeneration*. 2019 Dec 11;14(1):2.
298. Xiang X, Wind K, Wiedemann T, Blume T, Shi Y, Briel N, et al. Microglial activation states drive glucose uptake and FDG-PET alterations in neurodegenerative diseases. *Science Translational Medicine*. 2021 Oct 13;13(615).
299. Chamera K, Trojan E, Kotarska K, Szuster-Głuszczyk M, Bryniarska N, Tylek K, et al. Role of Polyinosinic:Polycytidylic Acid-Induced Maternal Immune Activation and Subsequent Immune Challenge in the Behaviour and Microglial Cell Trajectory in Adult Offspring: A Study of the Neurodevelopmental Model of Schizophrenia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Feb 4;22(4):1558.

-
300. Ganzinelli S, Borda E, Sterin-Borda L. Autoantibodies from schizophrenia patients induce cerebral cox-1/iNOS mRNA expression with NO/PGE2/MMP-3 production. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2010 Apr 19;13(03):293.
 301. Lee JA, Song HY, Ju SM, Lee SJ, Kwon HJ, Eum WS, et al. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by superoxide dismutase in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells. *Experimental and Molecular Medicine*. 2009;41(9):629.
 302. Zhang A, Suzuki T, Adachi S, Naganuma E, Suzuki N, Hosoya T, et al. Distinct Regulations of HO-1 Gene Expression for Stress Response and Substrate Induction. *Molecular and Cellular Biology*. 2021 Oct 26;41(11).
 303. Temmingh H, Stein DJ. Anxiety in Patients with Schizophrenia: Epidemiology and Management. *CNS Drugs*. 2015 Oct 19;29(10):819-32.
 304. Eryilmaz H, Tanner AS, Ho NF, Nitenson AZ, Silverstein NJ, Petrucci LJ, et al. Disrupted Working Memory Circuitry in Schizophrenia: Disentangling fMRI Markers of Core Pathology vs Other Aspects of Impaired Performance. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Aug 22;41(9):2411-20.
 305. d'Isa R, Comi G, Leocani L. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alteration T-maze. *Scientific Reports*. 2021 Dec 27;11(1):21177.
 306. Tardiolo G, Bramanti P, Mazzone E. Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2018 Dec 13;23(12):3305.
 307. More J, Galusso N, Veloso P, Montecinos L, Finkelstein JP, Sanchez G, et al. N-Acetylcysteine Prevents the Spatial Memory Deficits and the Redox-Dependent RyR2 Decrease Displayed by an Alzheimer's Disease Rat Model. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018 Dec 6;10.
 308. Zhang Z, van Praag H. Maternal immune activation differentially impacts mature and adult-born hippocampal neurons in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015 Mar;45:60-70.
 309. Giovanoli S, Notter T, Richetto J, Labouesse MA, Vuillermot S, Riva MA, et al. Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *Journal of Neuroinflammation*. 2015 Dec 25;12(1):221.
 310. Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2008 May;22(4):469-86.

311. MacDowell KS, Munarriz-Cuezva E, Caso JR, Madrigal JLM, Zabala A, Meana JJ, et al. Paliperidone reverts Toll-like receptor 3 signaling pathway activation and cognitive deficits in a maternal immune activation mouse model of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2017 Apr;116:196-207.
312. Quagliato LA, de Matos U, Nardi AE. Maternal immune activation generates anxiety in offspring: A translational meta-analysis. *Translational Psychiatry*. 2021 Jun 26;11(1):245.
313. Mocelin R, Marcon M, D'ambros S, Mattos J, Sachett A, Siebel AM, et al. N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. *Molecular Neurobiology*. 2019 Feb 6;56(2):1188-95.
314. Mahmoodzadeh Y, Mahmoudi J, Gorgani-Firuzjaee S, Mohtavinejad N, Namvaran A. Effects of N-acetylcysteine on Noise Exposure-induced Oxidative Stress and Depressive- and Anxiety-like Behaviors in Adult Male Mice. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*. 2021 Jul 1;12(4):499-510.
315. Nery FG, Tallman MJ, Cecil KM, Blom TJ, Patino LR, Adler CM, et al. N-acetylcysteine for depression and glutamate changes in the left prefrontal cortex in adolescents and young adults at risk for bipolar disorder: A pilot study. *Early Intervention in Psychiatry*. 2022 Feb;16(2):195-9.
316. Keshavan MS, Diwadkar VA, Harenski K, Rosenberg DR, Sweeney JA, Pettegrew JW. Abnormalities of the corpus callosum in first episode, treatment naive schizophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2002 Jun 1;72(6):757-60.
317. Downhill JE, Buchsbaum MS, Wei T, Spiegel-Cohen J, Hazlett EA, Haznedar MM, et al. Shape and size of the corpus callosum in schizophrenia and schizotypal personality disorder. *Schizophrenia Research*. 2000 May;42(3):193-208.
318. Park D, Shin K, Choi EK, Choi Y, Jang JY, Kim J, et al. Protective Effects of N-Acetyl-L-Cysteine in Human Oligodendrocyte Progenitor Cells and Restoration of Motor Function in Neonatal Rats with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015:1-10.
319. Vita A, de Peri L, Deste G, Sacchetti E. Progressive loss of cortical gray matter in schizophrenia: a meta-analysis and meta-regression of longitudinal MRI studies. *Translational Psychiatry*. 2012 Nov 20;2(11):e190-e190.
320. Kang DH, Kwon KW, Gu BM, Choi JS, Jang JH, Kwon JS. Structural abnormalities of the right inferior colliculus in schizophrenia. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2008 Nov;164(2):160-5.
321. del Re EC, Bouix S, Fitzsimmons J, Blokland GAM, Meshulam-Gately R, Wojcik J, et al. Diffusion abnormalities in the corpus callosum in first episode schizophrenia:

-
- Associated with enlarged lateral ventricles and symptomatology. *Psychiatry Research*. 2019 Jul;277:45–51.
322. Foong J. Neuropathological abnormalities of the corpus callosum in schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2000 Feb 1;68(2):242–4.
323. Balevich EC, Haznedar MM, Wang E, Newmark RE, Bloom R, Schneiderman JS, et al. Corpus callosum size and diffusion tensor anisotropy in adolescents and adults with schizophrenia. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2015 Mar;231(3):244–51.
324. Gasparotti R, Valsecchi P, Carletti F, Galluzzo A, Liserre R, Cesana B, et al. Reduced fractional anisotropy of corpus callosum in first-contact, antipsychotic drug-naïve patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2009 Mar;108(1–3):41–8.
325. Klauser P, Baker ST, Cropley VL, Bousman C, Fornito A, Cocchi L, et al. White Matter Disruptions in Schizophrenia Are Spatially Widespread and Topologically Converge on Brain Network Hubs. *Schizophrenia Bulletin*. 2016 Aug 17;sbw100.
326. Li Y, Xie S, Liu B, Song M, Chen Y, Li P, et al. Diffusion magnetic resonance imaging study of schizophrenia in the context of abnormal neurodevelopment using multiple site data in a Chinese Han population. *Translational Psychiatry*. 2016 Jan 19;6(1):e715–e715.
327. Schmidt A, Lenz C, Smieskova R, Harrisberger F, Walter A, Riecher-Rössler A, et al. Brain Diffusion Changes in Emerging Psychosis and the Impact of State-Dependent Psychopathology. *Neurosignals*. 2015;23(1):71–83.
328. Vernon AC, So PW, Lythgoe DJ, Chege W, Cooper JD, Williams SCR, et al. Longitudinal in vivo maturational changes of metabolites in the prefrontal cortex of rats exposed to polyinosinic-polycytidylic acid in utero. *European Neuropsychopharmacology*. 2015 Dec;25(12):2210–20.
329. Smucny J, Carter CS, Maddock RJ. Magnetic resonance spectroscopic evidence of increased choline in the dorsolateral prefrontal and visual cortices in recent onset schizophrenia. *Neuroscience Letters*. 2022 Jan;770:136410.
330. Galińska-Skok B, Małus A, Konarzewska B, Rogowska-Zach A, Milewski R, Tarasów E, et al. Choline Compounds of the Frontal Lobe and Temporal Glutamatergic System in Bipolar and Schizophrenia Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *Disease Markers*. 2018 Nov 25;2018:1–7.
331. Urenjak J, Williams S, Gadian D, Noble M. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *The Journal of Neuroscience*. 1993 Mar 1;13(3):981–9.

332. Higley MJ, Picciotto MR. Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression. *Current Opinion in Neurobiology*. 2014 Dec;29:88–95.
333. Schwerk A, Alves FDS, Pouwels PJW, van Amelsvoort T. Metabolic alterations associated with schizophrenia: a critical evaluation of proton magnetic resonance spectroscopy studies. *Journal of Neurochemistry*. 2014 Jan;128(1):1–87.
334. Steen RG, Hamer RM, Lieberman JA. Measurement of Brain Metabolites by ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy in Patients with Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Nov 1;30(11):1949–62.
335. Bustillo JR, Jones T, Chen H, Lemke N, Abbott C, Qualls C, et al. Glutamatergic and Neuronal Dysfunction in Gray and White Matter: A Spectroscopic Imaging Study in a Large Schizophrenia Sample. *Schizophrenia Bulletin*. 2016 Aug 22;sbw122.
336. das Neves Duarte JM, Kulak A, Gholam-Razae MM, Cuenod M, Gruetter R, Do KQ. N-Acetylcysteine Normalizes Neurochemical Changes in the Glutathione-Deficient Schizophrenia Mouse Model During Development. *Biological Psychiatry*. 2012 Jun;71(11):1006–14.
337. Brandt AS, Unschuld PG, Pradhan S, Lim IAL, Churchill G, Harris AD, et al. Age-related changes in anterior cingulate cortex glutamate in schizophrenia: A ¹H MRS Study at 7Tesla. *Schizophrenia Research*. 2016 Apr;172(1–3):101–5.
338. Merritt K, Egerton A, Kempton MJ, Taylor MJ, McGuire PK. Nature of Glutamate Alterations in Schizophrenia. *JAMA Psychiatry*. 2016 Jul 1;73(7):665.
339. McQueen G, Lally J, Collier T, Zelaya F, Lythgoe DJ, Barker GJ, et al. Effects of N-acetylcysteine on brain glutamate levels and resting perfusion in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018 Oct 23;235(10):3045–54.
340. Wijtenburg A, Korenic S, Chen H, Sewell J, Elliot Hong L, Rowland L. ALTERED BRAIN MACROMOLECULES IN SCHIZOPHRENIA: A ¹H MRS STUDY. *Schizophrenia Bulletin*. 2019 Apr 9;45(Supplement_2):S340–1.
341. Makinodan M, Yamauchi T, Tatsumi K, Okuda H, Noriyama Y, Sadamatsu M, et al. Yi-Gan San Restores Behavioral Alterations and a Decrease of Brain Glutathione Level in a Mouse Model of Schizophrenia. *J Brain Dis*. 2009 Jan 12;1:JCNSD.S2255.
342. Monte AS, Mello BSF, Borella VCM, da Silva Araujo T, da Silva FER, Sousa FCF de, et al. Two-hit model of schizophrenia induced by neonatal immune activation and peripubertal stress in rats: Study of sex differences and brain oxidative alterations. *Behavioural Brain Research*. 2017 Jul;331:30–7.

-
343. Nucifora LG, Tanaka T, Hayes LN, Kim M, Lee BJ, Matsuda T, et al. Reduction of plasma glutathione in psychosis associated with schizophrenia and bipolar disorder in translational psychiatry. *Translational Psychiatry*. 2017 Aug 22;7(8):e1215–e1215.
 344. Kumar J, Liddle EB, Fernandes CC, Palaniyappan L, Hall EL, Robson SE, et al. Glutathione and glutamate in schizophrenia: a 7T MRS study. *Molecular Psychiatry*. 2020 Apr 22;25(4):873–82.
 345. Palaniyappan L, Sabesan P, Li X, Luo Q. Schizophrenia Increases Variability of the Central Antioxidant System: A Meta-Analysis of Variance From MRS Studies of Glutathione. *Frontiers in Psychiatry*. 2021 Nov 30;12.
 346. Szeligowski T, Yun AL, Lennox BR, Burnet PWJ. The Gut Microbiome and Schizophrenia: The Current State of the Field and Clinical Applications. *Frontiers in Psychiatry*. 2020 Mar 12;11.
 347. Schwarz E, Maukonen J, Hyytiäinen T, Kieseppä T, Orešič M, Sabunciyan S, et al. Analysis of microbiota in first episode psychosis identifies preliminary associations with symptom severity and treatment response. *Schizophrenia Research*. 2018 Feb;192:398–403.
 348. Koch E, Kauppi K, Chen CH. Candidates for Drug Repurposing to Address the Cognitive Symptoms in Schizophrenia. *BioRxiv*. 2022;
 349. Karunakaran KB, Chaparala S, Ganapathiraju MK. Potentially repurposable drugs for schizophrenia identified from its interactome. *Scientific Reports*. 2019 Dec 3;9(1):12682.
 350. Ferreira Mello BS, Monte AS, McIntyre RS, Soczynska JK, Custódio CS, Cordeiro RC, et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. *Journal of Psychiatric Research*. 2013 Oct;47(10):1521–9.
 351. Ben-Azu B, Omogbiya IA, Aderibigbe AO, Umukoro S, Ajayi AM, Eneni AEO, et al. Doxycycline Ameliorates Schizophrenia-Like Behaviors in Experimental Models in Mice by Targeting Underlying Oxidative Stress. *Journal of Behavioral and Brain Science*. 2016;06(13):539–62.
 352. Han Jie L, Jantan I, Yusoff SD, Jalil J, Husain K. Sinensetin: An Insight on Its Pharmacological Activities, Mechanisms of Action and Toxicity. *Frontiers in Pharmacology*. 2021 Jan 20;11.
 353. Vervoort LMT, Ronden JE, Thijssen HHW. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*. 1997 Oct;54(8):871–6.

354. Beyer RE. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1994 Aug;26(4):349–58.
355. Bajpai VK, Alam MB, Quan KT, Kwon KR, Ju MK, Choi HJ, et al. Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression by (+)-lariciresinol, a lignan isolated from *Rubia philippinensis*, through the activation of p38. *Scientific Reports*. 2017 Aug 5;7(1):46035.
356. McGuire JL, Depasquale EA, Funk AJ, O'Donovan SM, Hasselfeld K, Marwaha S, et al. Abnormalities of signal transduction networks in chronic schizophrenia. *npj Schizophrenia*. 2017 Dec 12;3(1):30.
357. Siuciak JA. The Role of Phosphodiesterases in Schizophrenia. *CNS Drugs*. 2008;22(12):983–93.
358. Zheng W, Xiang YQ, Li XB, Ungvari GS, Chiu HFK, Sun F, et al. Adjunctive huperzine A for cognitive deficits in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 2016 Jul;31(4):286–95.
359. Moormann J, Opitz K, Winterhoff H. Use of desoxypeganine for the treatment of schizophrenic psychoses. 2003.
360. Syed R, Au K, Cahill C, Duggan L, He Y, Udu V, et al. Pharmacological interventions for clozapine-induced hypersalivation. In: Syed R, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008.
361. Maletic V, Eramo A, Gwin K, Offord SJ, Duffy RA. The Role of Norepinephrine and Its α -Adrenergic Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review. *Frontiers in Psychiatry*. 2017 Mar 17;8.
362. Arnsten AmyFT. Adrenergic targets for the treatment of cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 Jun 19;174(1).

ANEXOS

ANEXO A: Código de R para la realización del análisis de DSEA

```
# Instalación de los paquetes de R necesarios
```

```
library(devtools)
```

```
install_github("ctlab/fgsea") ## para realizar el análisis de GSEA
```

```
install.packages("readxl") ## para abrir los archivos
```

```
# Abrir los paquetes de R necesarios
```

```
library(fgsea)
```

```
library(readxl)
```

```
#Preparar el archivo de "Pathways"
```

```
## Este archivo Excel contiene una primera columna con los nombres de todos los fármacos,  
y la segunda columna su mecanismo de acción (MOA), que nos indica la familia de fármacos a  
la que pertenece
```

```
datap <- read_excel("Pathways.xlsx") ## lee el archivo Excel
```

```
dflist <- split(datap$Compound, datap$MOA) ## convierte los datos a formato lista para que  
el GSEA lo reconozca como input
```

```
# Preparar los archivos de "Ranks"
```

```
## Este archivo Excel contiene una primera columna con los nombres de todos los fármacos,  
y las dos siguientes columnas contienen los scores de estos fármacos en los estudios de Mattei  
et al. y Gandal et al.
```

```
data <- read_excel("Drugs.xlsx") ## lee el archivo Excel
```

```
ranksMattei <- setNames(data$Mattei, data$Name) ## convierte los datos de Mattei et al. a  
formato numérico para que el GSEA lo reconozca como input
```

```
ranksGandal <- setNames(data$Gandal, data$Name) ## convierte los datos de Gandal et al. a  
formato numérico para que el GSEA lo reconozca como input
```

```
# Análisis de GSEA adaptado para realizar un DSEA del estudio de Mattei et al.

## Usamos la función fgsea del paquete con el mismo nombre, dando como input los archivos
que acabamos de crear

fgseaResMattei <- fgsea(pathways = dflist,
                        stats   = ranksMattei,
                        minSize = 2,
                        maxSize = 800)

## Guardamos el archivo resultante

save(fgseaResMattei, file="Mattei.RData")

## Sacamos el perfil y los datos estadísticos de las rutas enriquecidas negativamente

topPathwaysDownM <- fgseaRes[fgseaRes$pval < 0.05,][NES < 0][head(order(pval), n=10),
pathway]

plotGseaTable(dflist[topPathwaysDown], data, fgseaRes, gseaParam=0.5)

# Análisis de GSEA adaptado para realizar un DSEA del estudio de Gandal et al.

## Usamos la función fgsea del paquete con el mismo nombre, dando como input los archivos
que acabamos de crear

fgseaResGandal <- fgsea(pathways = dflist,
                        stats   = ranksGandal,
                        minSize = 2,
                        maxSize = 800)

## Guardamos el archivo resultante

save(fgseaResGandal, file="Gandal.RData")

## Sacamos el perfil y los datos estadísticos de las rutas enriquecidas negativamente

topPathwaysDownG <- fgseaRes[fgseaRes$pval < 0.05,][NES < 0][head(order(pval), n=10),
pathway]

plotGseaTable(dflist[topPathwaysDown], data, fgseaRes, gseaParam=0.5)
```

ANEXO B: Cambios en el metabolismo cerebral de glucosa tras el tratamiento preventivo con compuestos antioxidantes y antiinflamatorios durante la periadolescencia

Tabla A1. En la tabla se muestran todos los resultados significativos (p cluster < 0.05 , $k > 50$) encontrados en el análisis de SPM de las imágenes PET tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína, ácidos omega-3 y minociclina durante la periadolescencia. Abreviaturas: NAcc: núcleo accumbens, BS: tronco cerebral, Cb: cerebelo, dMN: núcleo mesencefálico profundo, OB: bulbo olfatorio, PFC: corteza prefrontal, S1: corteza somatosensorial primaria.

Estructura	Hemisferio	T	K	↑/↓	P_{unc} cluster
Efecto de MIS en Salino					
<i>Sin cambios estadísticamente significativos</i>					
Efecto de NAC en Salino					
OB/PFC	I & D	5.56	174	↑	< 0.001
Efecto de omega-3 en Salino					
<i>Sin cambios estadísticamente significativos</i>					
Efecto de minociclina en Salino					
<i>Sin cambios estadísticamente significativos</i>					
Efecto de NAC en MIS					
<i>Sin cambios estadísticamente significativos</i>					
Efecto de omega-3 en MIS					
dMN	I & D	3.86	154	↓	0.046
Efecto de minociclina en MIS					
Cb/BS	I & D	3.75	560	↓	0.001
S1	I	3.29	157	↓	0.046
NAcc	I & D	3.61	210	↑	0.024

ANEXO C: Cambios en la morfometría cerebral tras el tratamiento preventivo con compuestos antioxidantes y antiinflamatorios durante la periadolescencia

Tabla A2. En la tabla se muestran todos los resultados significativos (p_{FDR} cluster < 0.05, $k > 1000$) encontrados en el análisis de VBM y SPM tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína, ácidos omega-3 y minociclina durante la periadolescencia. Abreviaturas: 3V: tercer ventrículo, AHA: área amigdalohipocampal, Aq: acueducto de Silvio, BS: tronco cerebral, Cb: cerebelo, cc: cuerpo caloso, cic: comisura del colículo inferior, cll: comisura del lemnisco lateral, CPu: caudadoptamen, CSF (Me): líquido cefalorraquídeo a nivel mesencefálico, D3V: tercer ventrículo dorsal, DRD: núcleo dorsal del Raphe, ec: cápsula externa, Ect: corteza ectorrinal, fi: fimbria del hipocampo, fmi: fórceps menor del cuerpo caloso, fmj: fórceps mayor del cuerpo caloso, Hipp: hipocampo, HPT: hipotálamo, IC: colículo inferior, LR4V: cuarto ventrículo lateral, LV: ventrículo lateral, mt: tracto mamilotalámico, OB: bulbo olfatorio, OFC: corteza orbitofrontal, OV: ventrículo olfatorio, Pir: corteza piriforme, RS: corteza retrosplenial, S1: corteza somatosensorial primaria, SN: substantia nigra, SSC: corteza somatosensorial, Th: tálamo, vHP: hipocampo ventral, vsc: tracto espinocerebelar ventral.

SUSTANCIA GRIS (GM)					
Estructura	Hemisferio	T	K	↑/↓	P_{FDR} cluster
Efecto de MIS en Salino					
vHP	D	4.47	3080	↑	< 0.001
OB	I & D	3.49	2626	↑	0.001
Efecto de NAC en Salino					
Cb	D	3.74	2915	↑	< 0.001
Efecto de Omega-3 en Salino					
Pir	D	3.38	1449	↓	0.019
Cb	I	3.17	1191	↓	0.023
Efecto de Minociclina en Salino					
IC	I & D	3.77	1513	↑	0.004
Cb	D	3.44	2595	↑	< 0.001
Efecto de NAC en MIS					
Hipp	D	5.01	3320	↓	< 0.001
BS	I & D	5.00	1922	↓	0.004
RS	I	4.00	3327	↓	< 0.001
BS	I & D	3.72	1053	↓	0.028
OB	I & D	3.51	1521	↓	0.009
Th	I & D	3.35	1014	↓	0.029
SN	I	3.35	1325	↓	0.014
DRD	I & D	3.34	1290	↓	0.014
Cb	I	4.52	6214	↑	< 0.001
IC	I & D	4.11	5486	↑	< 0.001
Cb	D	3.93	2979	↑	< 0.001
HPT	I & D	3.26	1545	↑	0.004
CPu	D	3.12	1267	↑	0.008

Estructura	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
Efecto de Omega-3 en MIS					
OFC	I & D	5.76	4077	↓	< 0.001
AHA	I	4.42	1095	↓	0.006
SSC	I	3.87	3133	↓	< 0.001
	D	3.81	3118	↓	< 0.001
Cb	I & D	3.48	1155	↑	0.003
Efecto de Minociclina en MIS					
Ect	D	3.65	3133	↓	< 0.001
Th/HP	I	3.46	1986	↓	0.002
RS	I	3.33	2123	↓	0.002
S1	D	2.71	1170	↓	0.019
Cb	D	4.57	1596	↑	0.004
	D	3.73	1719	↑	0.004
SUSTANCIA BLANCA (WM)					
SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
Efecto de MIS en Salino					
fmj	I	3.67	2387	↓	< 0.001
Cb	I	3.58	1833	↓	< 0.001
	I & D	4.59	4673	↑	< 0.001
vsc	I & D	4.35	3460	↑	< 0.001
HPT	D	4.03	5454	↑	< 0.001
fmi	D	3.64	1169	↑	< 0.001
cII	D	3.51	1672	↑	< 0.001
cc	I	3.23	1360	↑	< 0.001
	D	3.17	1281	↑	< 0.001
Efecto de NAC en Salino					
ec	D	3.47	2260	↓	< 0.001
	I	3.45	1171	↓	< 0.001
Efecto de Omega-3 en Salino					
cII	D	4.02	1994	↑	< 0.001
	I	3.39	1364	↑	< 0.001
fi	I	3.25	1160	↑	< 0.001
Efecto de Minociclina en Salino					
ec	I	3.75	1142	↓	< 0.001
fmj	D	3.72	1836	↓	< 0.001
Cb	I & D	3.27	1111	↑	< 0.001
Efecto de NAC en MIS					
fmj	I	4.46	2241	↓	< 0.001
HPT	I & D	4.24	9183	↓	< 0.001
cic	I	3.66	1210	↓	< 0.001
cc	D	3.09	1285	↓	< 0.001
Cb	D	4.35	12238	↑	< 0.001
	I	4.19	4447	↑	< 0.001
fmj	D	3.38	1028	↑	< 0.001
Efecto de Omega-3 en MIS					

SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
cc	D	5.62	5695	↓	< 0.001
	I	4.01	5078	↓	< 0.001
HPT	I	3.96	2078	↓	< 0.001
	D	3.47	1283	↓	< 0.001
mt	I & D	3.00	1228	↓	< 0.001
fmi	I & D	5.65	2977	↑	< 0.001
fmj	D	3.81	1255	↑	< 0.001
Cb	D	3.18	1475	↑	< 0.001

Efecto de Minociclina en MIS

HPT	I & D	4.90	11386	↓	< 0.001
cc	D	4.03	2250	↓	< 0.001
cll	I	3.43	2998	↓	< 0.001
cc	I	3.24	1321	↓	< 0.001
Cb	D	5.22	7734	↑	< 0.001
	I	4.82	6139	↑	< 0.001

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (CSF)

SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
-----	------------	---	---	-----	--------------------------

Efecto de MIS en Salino

3V	I & D	4.80	4690	↑	< 0.001
----	-------	------	------	---	---------

Efecto de NAC en Salino

OV	I & D	3.82	1723	↓	< 0.001
D3V	I & D	3.47	1895	↓	< 0.001

Efecto de Omega-3 en Salino

Sin cambios estadísticamente significativos

Efecto de Minociclina en Salino

Sin cambios estadísticamente significativos

Efecto de NAC en MIS

3V	I & D	5.30	6966	↓	< 0.001
Aq	I	5.29	1712	↓	< 0.001
LR4V	D	2.43	1159	↓	0.001
LV	D	3.08	1270	↑	< 0.001

Efecto de Omega-3 en MIS

3V	I & D	4.12	2064	↓	< 0.001
CSF (Me)	D	3.12	1769	↓	< 0.001

Efecto de Minociclina en MIS

3V	I & D	3.89	2068	↓	< 0.001
----	-------	------	------	---	---------

ANEXO D: Cambios en los marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante la peria-adolescencia (Media \pm SEM)

Tabla A3. En la tabla se muestran el promedio y la desviación estándar de la media (SEM) de cada grupo, resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con N-acetilcisteína. Los parámetros no normales ni homocedásticos y que fueron transformados se representan con un *.

Marcadores	Salino VH		Salino NAC		MIS VH		MIS NAC	
	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM
iNOS								
Corteza prefrontal	100.000	2.970	97.350	4.933	134.476	3.795	106.466	6.808
Hipocampo	100.030	4.950	105.417	8.389	110.465	5.833	90.857	4.748
Amígdala	99.890	2.226	107.078	4.833	134.156	5.423	129.963	4.818
Caudado-putamen	100.000	2.232	100.947	4.988	121.027	4.383	102.555	6.760
COX2								
Corteza prefrontal	100.000	3.770	97.844	5.979	99.986	6.327	92.713	3.859
Hipocampo	100.415	6.712	84.872	6.067	90.715	6.725	74.063	8.908
Amígdala*	0.470	0.051	0.286	0.096	0.779	0.101	0.593	0.055
Caudado-putamen	100.001	5.452	91.878	8.250	111.521	11.919	87.000	7.666
MDA								
Corteza prefrontal*	0.380	0.087	0.384	0.073	0.723	0.083	0.641	0.102
Hipocampo	0.533	0.088	0.521	0.075	0.435	0.055	0.519	0.091
Amígdala*	0.759	0.123	0.884	0.204	0.853	0.152	0.836	0.091
Caudado-putamen	0.890	0.027	0.755	0.132	0.961	0.134	1.045	0.118
KEAP1								
Corteza prefrontal*	0.525	0.068	0.475	0.071	0.838	0.069	0.257	0.072
Hipocampo	100.520	4.939	83.877	7.290	90.815	5.199	71.753	5.633
Amígdala	100.001	3.628	96.669	5.953	130.383	7.835	109.589	8.136
Caudado-putamen	99.999	2.799	103.197	7.481	110.166	5.223	102.888	2.954
HO1								
Corteza prefrontal	99.995	1.934	103.343	6.481	91.624	5.950	109.321	8.078
Hipocampo	100.079	1.968	108.390	5.024	90.864	8.433	99.730	6.993
Amígdala	99.989	2.226	106.215	3.247	107.638	3.561	154.968	10.501
Caudado-putamen	99.999	3.602	111.799	9.307	99.213	5.937	116.669	5.405
NQO1								
Corteza prefrontal*	0.583	0.038	0.534	0.102	0.336	0.090	0.675	0.122
Hipocampo	100.004	4.878	107.855	4.822	95.936	5.445	102.553	6.638
Amígdala	100.001	2.528	99.753	4.311	90.223	5.963	111.585	5.597
Caudado-putamen	100.000	1.271	99.231	5.109	98.078	5.356	100.634	8.635
NRF2								
Corteza prefrontal*	0.376	0.079	0.489	0.085	0.696	0.123	0.549	0.086
Hipocampo	0.127	0.022	0.113	0.016	0.088	0.008	0.102	0.015
Amígdala*	0.411	0.094	0.585	0.116	0.444	0.066	0.688	0.099
Caudado-putamen	0.176	0.023	0.160	0.016	0.152	0.011	0.149	0.016
SOD								

Marcadores	Salino VH		Salino NAC		MIS VH		MIS NAC	
	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM
Corteza prefrontal*	0.496	0.117	0.443	0.084	0.508	0.060	0.681	0.120
Hipocampo	2.696	0.175	2.531	0.086	2.492	0.132	2.667	0.179
Amígdala*	0.548	0.077	0.598	0.129	0.319	0.078	0.664	0.071
Caudado-putamen	3.242	0.483	2.361	0.261	2.638	0.361	2.638	0.361
CAT								
Corteza prefrontal*	0,638	0.085	0.715	0.089	0.435	0.056	0.340	0.111
Hipocampo	5,969	0.711	5.133	0.545	6.950	0.718	6.393	0.517
Amígdala*	0,604	0.070	0.461	0.109	0.409	0.071	0.654	0.126
Caudado-putamen*	0,786	0.086	0.444	0.067	0.524	0.090	0.374	0.098
GPx								
Corteza prefrontal	21.307	0.353	22,096	1,303	19,114	0,606	22,790	1,810
Hipocampo*	0.559	0.123	0,560	0,072	0,519	0,074	0,490	0,131
Amígdala	29.883	2.171	25,042	1,981	27,652	1,734	27,482	1,793
Caudado-putamen	67.571	6.522	53,526	4,356	46,486	8,311	44,813	4,046
GSH_{total}								
Corteza prefrontal	1.352	0.143	1.398	0.162	1.846	0.254	2.103	0.244
Hipocampo	6.373	0.849	5.634	0.383	6.205	0.571	5.821	0.980
Amígdala	6.565	1.005	5.419	0.776	3.927	0.381	6.123	0.828
Caudado-putamen	11.666	1.763	8.181	0.928	7.163	1.143	7.467	0.967
GSH_{libre}								
Corteza prefrontal	1.086	0.122	1.167	0.143	1.505	0.202	1.672	0.188
Hipocampo*	0.559	0.123	0.560	0.072	0.519	0.074	0.490	0.131
Amígdala	4.170	0.915	3.123	0.496	2.132	0.243	3.503	0.532
Caudado-putamen	6.113	0.946	4.340	0.501	3.837	0.598	3.988	0.524
GSSG								
Corteza prefrontal*	0.468	0.078	0.369	0.060	0.590	0.096	0.701	0.125
Hipocampo	3.619	0.422	3.146	0.227	3.648	0.280	3.268	0.548
Amígdala	2.394	0.228	2.296	0.284	1.795	0.140	2.620	0.301
Caudado-putamen	5.553	0.822	3.840	0.430	3.326	0.548	3.479	0.446

ANEXO E: Cambios en los marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante la periadolescencia (ANOVA de 2 vías)

Tabla A4. En la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías para tres factores (MIS: efecto del Poly I:C, Tratamiento: efecto de la NAC, e Interacción), resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con N-acetilcisteína. Los parámetros no normales ni homocedásticos tras las transformaciones necesarias han sido analizados mediante el test de Kruskal-Wallis (KW).

IOS	MIS		Tratamiento (NAC)		Interacción		KW
iNOS							
PFC	$F_{(1,28)} = 20.240$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 10.010$	$p = 0.004^{**}$	$F_{(1,28)} = 6.851$	$p = 0.014^*$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.09$	$p = 0.744$	$F_{(1,27)} = 1.291$	$p = 0.266$	$F_{(1,27)} = 3.989$	$p = 0.056$	-
AA	$F_{(1,28)} = 3.240$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.999$	$F_{(1,28)} = 2.556$	$p = 0.121$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 5.406$	$p = 0.027^*$	$F_{(1,28)} = 3.241$	$p = 0.083$	$F_{(1,28)} = 3.979$	$p = 0.056$	-
COX2							
PFC	$F_{(1,27)} = 0.244$	$p = 0.626$	$F_{(1,27)} = 0.818$	$p = 0.374$	$F_{(1,27)} = 0.241$	$p = 0.627$	-
HP	$F_{(1,28)} = 2.037$	$p = 0.164$	$F_{(1,28)} = 5.021$	$p = 0.033^*$	$F_{(1,28)} = 0.006$	$p = 0.939$	-
AA	$F_{(1,28)} = 15.080$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 5.457$	$p = 0.027^*$	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.987$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.148$	$p = 0.704$	$F_{(1,28)} = 3.569$	$p = 0.069$	$F_{(1,28)} = 0.900$	$p = 0.351$	-
MDA							
PFC	$F_{(1,28)} = 11.940$	$p = 0.002^{**}$	$F_{(1,28)} = 0.199$	$p = 0.659$	$F_{(1,28)} = 0.240$	$p = 0.628$	-
HP	$F_{(1,28)} = 0.410$	$p = 0.527$	$F_{(1,28)} = 0.209$	$p = 0.651$	$F_{(1,28)} = 0.371$	$p = 0.548$	-
AA	$F_{(1,28)} = 0.023$	$p = 0.880$	$F_{(1,28)} = 0.132$	$p = 0.719$	$F_{(1,28)} = 0.226$	$p = 0.638$	-
Cpu							$p = 0.398$
KEAP1							
PFC	$F_{(1,27)} = 0.455$	$p = 0.506$	$F_{(1,27)} = 20.190$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,27)} = 14.300$	$p < 0.001^{***}$	-
HP	$F_{(1,28)} = 3.496$	$p = 0.072$	$F_{(1,28)} = 9.354$	$p = 0.005^{**}$	$F_{(1,28)} = 0.043$	$p = 0.837$	-
AA	$F_{(1,28)} = 10.640$	$p = 0.003^{**}$	$F_{(1,28)} = 3.304$	$p = 0.080$	$F_{(1,28)} = 1.731$	$p = 0.199$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.927$	$p = 0.344$	$F_{(1,27)} = 0.159$	$p = 0.693$	$F_{(1,27)} = 1.047$	$p = 0.315$	-
HO1							
PFC	$F_{(1,28)} = 0.039$	$p = 0.845$	$F_{(1,28)} = 3.025$	$p = 0.093$	$F_{(1,28)} = 1.406$	$p = 0.246$	-
HP							$p = 0.155$
AA	$F_{(1,28)} = 22.980$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 20.720$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 12.200$	$p = 0.002^{**}$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.102$	$p = 0.752$	$F_{(1,28)} = 5.217$	$p = 0.030^*$	$F_{(1,28)} = 0.195$	$p = 0.662$	-
NQO1							
PFC	$F_{(1,28)} = 0.317$	$p = 0.578$	$F_{(1,28)} = 2.422$	$p = 0.131$	$F_{(1,28)} = 4.324$	$p = 0.047^*$	-
HP	$F_{(1,28)} = 0.727$	$p = 0.401$	$F_{(1,28)} = 1.734$	$p = 0.199$	$F_{(1,28)} = 0.013$	$p = 0.911$	-
AA	$F_{(1,28)} = 0.046$	$p = 0.832$	$F_{(1,28)} = 4.853$	$p = 0.036^*$	$F_{(1,28)} = 5.084$	$p = 0.032^*$	-
Cpu							$p = 0.927$
NRF2							
PFC	$F_{(1,27)} = 3.925$	$p = 0.058$	$F_{(1,27)} = 0.032$	$p = 0.859$	$F_{(1,27)} = 1.840$	$p = 0.186$	-
HP	$F_{(1,28)} = 2.437$	$p = 0.130$	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.978$	$F_{(1,28)} = 0.800$	$p = 0.380$	-
AA	$F_{(1,28)} = 0.500$	$p = 0.485$	$F_{(1,28)} = 4.784$	$p = 0.037^*$	$F_{(1,28)} = 0.134$	$p = 0.037^*$	-
Cpu							$p = 0.888$
SOD							

IOS	MIS		Tratamiento (NAC)		Interacción		KW
PFC	$F_{(1,28)} = 1.608$	$p = 0.215$	$F_{(1,28)} = 0.370$	$p = 0.547$	$F_{(1,28)} = 1.331$	$p = 0.258$	-
HP	$F_{(1,28)} = 0.053$	$p = 0.819$	$F_{(1,28)} = 0.001$	$p = 0.975$	$F_{(1,28)} = 1.315$	$p = 0.261$	-
AA	$F_{(1,28)} = 0.780$	$p = 0.384$	$F_{(1,28)} = 4.608$	$p = 0.041^*$	$F_{(1,28)} = 2.750$	$p = 0.120$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.191$	$p = 0.665$	$F_{(1,28)} = 1.379$	$p = 0.250$	$F_{(1,28)} = 1.379$	$p = 0.250$	-
CAT							
PFC	$F_{(1,28)} = 10.930$	$p = 0.003^{**}$	$F_{(1,28)} = 0.010$	$p = 0.920$	$F_{(1,28)} = 0.976$	$p = 0.331$	-
HP	$F_{(1,28)} = 3.171$	$p = 0.086$	$F_{(1,28)} = 1.225$	$p = 0.278$	$F_{(1,28)} = 0.049$	$p = 0.826$	-
AA	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.999$	$F_{(1,28)} = 0.278$	$p = 0.602$	$F_{(1,28)} = 3.978$	$p = 0.056$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 3.741$	$p = 0.063$	$F_{(1,28)} = 8.209$	$p = 0.008^{**}$	$F_{(1,28)} = 1.254$	$p = 0.272$	-
GPx							
PFC							$p = 0.110$
HP	$F_{(1,28)} = 0.281$	$p = 0.600$	$F_{(1,28)} = 0,018$	$p = 0895$	$F_{(1,28)} = 0.021$	$p = 0.886$	-
AA	$F_{(1,28)} = 0.003$	$p = 0.957$	$F_{(1,28)} = 1,690$	$p = 0,204$	$F_{(1,28)} = 1.469$	$p = 0.236$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 6.042$	$p = 0.020^*$	$F_{(1,28)} = 1,681$	$p = 0.205$	$F_{(1,28)} = 1.042$	$p = 0.316$	-
GSH_{total}							
PFC	$F_{(1,28)} = 8.428$	$p = 0.007^{**}$	$F_{(1,28)} = 0.538$	$p = 0.469$	$F_{(1,28)} = 0.260$	$p = 0.614$	-
HP	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.990$	$F_{(1,28)} = 0.585$	$p = 0.585$	$F_{(1,28)} = 0.058$	$p = 0.811$	-
AA	$F_{(1,28)} = 1.530$	$p = 0.226$	$F_{(1,28)} = 0.451$	$p = 0.508$	$F_{(1,28)} = 4.570$	$p = 0.041^*$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 4.380$	$p = 0.045^*$	$F_{(1,28)} = 1.629$	$p = 0.212$	$F_{(1,28)} = 2.311$	$p = 0.140$	-
GSH_{libre}							
PFC	$F_{(1,28)} = 7.682$	$p = 0.009^{**}$	$F_{(1,28)} = 0.552$	$p = 0.464$	$F_{(1,28)} = 0.067$	$p = 0.798$	-
HP	$F_{(1,28)} = 0.281$	$p = 0.600$	$F_{(1,28)} = 0.018$	$p = 0.895$	$F_{(1,28)} = 0.021$	$p = 0.886$	-
AA	$F_{(1,28)} = 1.929$	$p = 0.176$	$F_{(1,28)} = 0.073$	$p = 0.788$	$F_{(1,28)} = 4.105$	$p = 0.052$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 3.883$	$p = 0.059$	$F_{(1,28)} = 1.478$	$p = 0.234$	$F_{(1,28)} = 2.081$	$p = 0.160$	-
GSSG							
PFC	$F_{(1,28)} = 5.999$	$p = 0.021^*$	$F_{(1,28)} = 0.004$	$p = 0,947$	$F_{(1,28)} = 1,278$	$p = 0.268$	-
HP	$F_{(1,28)} = 0.037$	$p = 0.845$	$F_{(1,28)} = 1.196$	$p = 0.283$	$F_{(1,28)} = 0.014$	$p = 0.905$	-
AA	$F_{(1,28)} = 0.313$	$p = 0.580$	$F_{(1,28)} = 2.174$	$p = 0.151$	$F_{(1,28)} = 3.515$	$p = 0.071$	-
Cpu	$F_{(1,28)} = 4.926$	$p = 0.035^*$	$F_{(1,28)} = 1.791$	$p = 0.192$	$F_{(1,28)} = 2.558$	$p = 0.121$	-

ANEXO F: Cambios en los marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con Omega-3 durante la periadolescencia (Media \pm SEM)

Tabla A5. En la tabla se muestran el promedio y la desviación estándar de la media (SEM) de cada grupo, resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con omega-3. Los parámetros no normales ni homocedásticos y que fueron transformados se representan con un *.

Marcadores	Salino VH		Salino Omega		MIS VH		MIS Omega		
	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	
iNOS									
Corteza prefrontal	98.990	3.221	106.520	5.883	134.475	3.795	103.830	6.356	
Hipocampo	101.117	5.577	89.193	7.796	110.465	5.833	90.847	8.137	
Amígdala	98.867	2.163	104.565	4.986	134.156	5.423	116.793	9.391	
Caudado-putamen	99.173	2.394	106.047	5.502	121.027	4.383	107.839	5.263	
COX2									
Corteza prefrontal	97.862	3.585	98.459	5.294	99.985	6.327	109.990	6.509	
Hipocampo	99.410	7.663	81.898	5.785	90.715	6.726	92.092	5.917	
Amígdala	101.491	2.119	93.755	3.856	118.507	6.257	114.575	7.719	
Caudado-putamen	100.554	6.263	84.973	7.467	111.521	11.919	98.064	11.621	
MDA									
Corteza prefrontal*	0.409	0.086	0.441	0.071	0.671	0.061	0.567	0.172	
Hipocampo	0.580	0.086	0.396	0.052	0.435	0.055	0.442	0.066	
Amígdala	0.699	0.124	0.769	0.100	0.853	0.152	0.773	0.261	
Caudado-putamen	1.080	0.176	0.887	0.093	0.961	0.134	0.728	0.085	
KEAP1									
Corteza prefrontal	99.686	3.333	106.244	4.109	129.300	8.367	83.840	5.820	
Hipocampo	97.498	4.510	73.325	5.958	90.815	5.200	84.314	9.778	
Amígdala	100.102	4.188	99.049	3.995	130.383	7.835	124.827	6.828	
Caudado-putamen	99.307	3.132	105.869	6.423	110.166	5.223	120.229	4.836	
HO1									
Corteza prefrontal	100.854	2.002	102.780	4.845	91.624	5.950	96.161	5.200	
Hipocampo	100.885	2.072	100.978	6.613	90.864	8.434	101.532	5.147	
Amígdala*	1.997	0.011	2.128	0.026	2.030	0.014	2.282	0.029	
Caudado-putamen	101.482	3.791	137.818	8.303	99.213	5.937	127.935	5.167	
NQO1									
Corteza prefrontal	99.667	2.566	96.593	4.003	81.061	6.939	95.465	7.289	
Hipocampo*	1.995	0.025	2.011	0.054	1.977	0.024	2.046	0.076	
Amígdala	101.504	2.347	107.130	3.804	90.223	5.963	131.931	7.814	
Caudado-putamen	100.709	1.218	100.095	4.115	98.078	5.356	101.120	7.128	
NRF2									
Corteza prefrontal	0.078	0.007	0.088	0.013	0.107	0.014	0.115	0.012	
Hipocampo	0.112	0.011	0.099	0.005	0.088	0.008	0.118	0.019	
Amígdala	0.159	0.026	0.228	0.065	0.154	0.012	0.211	0.039	
Caudado-putamen	0.154	0.010	0.169	0.012	0.152	0.011	0.135	0.013	
SOD									

Marcadores	Salino VH		Salino Omega		MIS VH		MIS Omega	
	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM
Corteza prefrontal	2.759	0.185	2.899	0.201	2.856	0.077	2.424	0.217
Hipocampo	2.690	0.202	3.034	0.122	2.492	0.132	2.017	0.057
Amígdala	2.845	0.206	3.195	0.222	2.272	0.115	2.522	0.250
Caudado-putamen	3.465	0.494	3.286	0.439	2.125	0.204	2.564	0.470
CAT								
Corteza prefrontal	5.872	0.448	5.006	0.497	4.862	0.167	5.008	0.449
Hipocampo	5.552	0.665	7.458	0.591	6.950	0.718	4.443	0.714
Amígdala	9.156	0.548	8.638	0.636	7.474	0.443	6.387	0.410
Caudado-putamen	11.659	1.350	13.451	2.093	7.523	0.694	10.776	2.039
GPx								
Corteza prefrontal	21.461	0.375	22.074	1.575	19.113	0.607	23.444	1.362
Hipocampo	29.368	3.433	28.014	1.273	29.199	2.129	22.917	0.731
Amígdala	30.795	2.275	23.523	2.340	27.652	1.734	23.983	1.630
Caudado-putamen	71.035	6.381	64.497	6.799	46.486	8.311	54.097	9.281
GSH_{total}								
Corteza prefrontal*	0.340	0.110	0.554	0.090	0.537	0.072	0.646	0.120
Hipocampo	6.746	0.881	5.975	0.622	6.205	0.571	4.084	0.305
Amígdala	6.882	1.101	6.289	0.801	3.927	0.381	4.048	0.470
Caudado-putamen	12.183	1.946	12.134	2.277	7.163	1.143	6.864	1.391
GSH_{libre}								
Corteza prefrontal	1.122	0.134	1.587	0.262	1.505	0.202	2.397	0.545
Hipocampo*	0.441	0.062	0.384	0.043	0.392	0.042	0.278	0.033
Amígdala	4.434	1.012	3.571	0.494	2.132	0.243	2.170	0.232
Caudado-putamen	6.363	1.053	6.389	1.161	3.837	0.598	3.675	0.750
GSSG								
Corteza prefrontal*	0.280	0.029	0.367	0.068	0.341	0.057	0.500	0.116
Hipocampo	3.807	0.436	3.453	0.316	3.648	0.280	2.153	0.168
Amígdala	2.448	0.255	2.718	0.332	1.795	0.140	1.878	0.241
Caudado-putamen	5.819	0.898	5.744	1.118	3.326	0.548	3.190	0.641

ANEXO G: Cambios en los marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con Omega-3 durante la periadolescencia (ANOVA de 2 vías)

Tabla A6. En la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías para tres factores (MIS: efecto del Poly I:C, Tratamiento: efecto del Omega-3, e Interacción), resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con minociclina.

IOS	MIS		Tratamiento (omega-3)		Interacción	
INOS						
PFC	$F_{(1,26)} = 10.700$	$p = 0.003^{**}$	$F_{(1,26)} = 5.317$	$p = 0.029^*$	$F_{(1,26)} = 14.500$	$p < 0.001^{***}$
HP	$F_{(1,26)} = 0.625$	$p = 0.436$	$F_{(1,26)} = 5.139$	$p = 0.032^*$	$F_{(1,26)} = 0.306$	$p = 0.585$
AA	$F_{(1,26)} = 15.910$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 0.923$	$p = 0.346$	$F_{(1,26)} = 3.778$	$p = 0.063$
Cpu	$F_{(1,26)} = 6.499$	$p = 0.017^*$	$F_{(1,26)} = 0.463$	$p = 0.502$	$F_{(1,26)} = 4.678$	$p = 0.040^*$
COX2						
PFC	$F_{(1,26)} = 1.476$	$p = 0.235$	$F_{(1,26)} = 0.890$	$p = 0.354$	$F_{(1,26)} = 0.701$	$p = 0.410$
HP	$F_{(1,26)} = 0.013$	$p = 0.910$	$F_{(1,26)} = 1.514$	$p = 0.229$	$F_{(1,26)} = 2.075$	$p = 0.162$
AA	$F_{(1,26)} = 12.160$	$p = 0.002^{**}$	$F_{(1,26)} = 1.156$	$p = 0.292$	$F_{(1,26)} = 0.123$	$p = 0.729$
Cpu	$F_{(1,26)} = 1.527$	$p = 0.228$	$F_{(1,26)} = 2.224$	$p = 0.148$	$F_{(1,26)} = 0.012$	$p = 0.194$
MDA						
PFC	$F_{(1,24)} = 3.818$	$p = 0.062$	$F_{(1,24)} = 0.130$	$p = 0.721$	$F_{(1,24)} = 0.473$	$p = 0.498$
HP	$F_{(1,26)} = 0.578$	$p = 0.454$	$F_{(1,26)} = 1.854$	$p = 0.185$	$F_{(1,26)} = 2.162$	$p = 0.153$
AA	$F_{(1,26)} = 0.224$	$p = 0.640$	$F_{(1,26)} = <0.001$	$p = 0.976$	$F_{(1,26)} = 0.199$	$p = 0.659$
Cpu	$F_{(1,27)} = 1.251$	$p = 0.273$	$F_{(1,27)} = 2.953$	$p = 0.097$	$F_{(1,27)} = 0.025$	$p = 0.875$
KEAP1						
PFC	$F_{(1,26)} = 0.373$	$p = 0.546$	$F_{(1,26)} = 10.870$	$p = 0.003^{**}$	$F_{(1,26)} = 19.440$	$p < 0.001^{***}$
HP	$F_{(1,26)} = 0.107$	$p = 0.746$	$F_{(1,26)} = 5.455$	$p = 0.027^*$	$F_{(1,26)} = 1.810$	$p = 0.190$
AA	$F_{(1,26)} = 21.710$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 0.302$	$p = 0.587$	$F_{(1,26)} = 0.140$	$p = 0.711$
Cpu	$F_{(1,26)} = 5.900$	$p = 0.022$	$F_{(1,26)} = 2.564$	$p = 0.121$	$F_{(1,26)} = 0.114$	$p = 0.739$
HO1						
PFC	$F_{(1,26)} = 2.650$	$p = 0.116$	$F_{(1,26)} = 0.441$	$p = 0.513$	$F_{(1,26)} = 0.072$	$p = 0.791$
HP	$F_{(1,26)} = 0.563$	$p = 0.460$	$F_{(1,26)} = 0.728$	$p = 0.401$	$F_{(1,26)} = 0.702$	$p = 0.410$
AA	$F_{(1,26)} = 18.620$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 77.420$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 7.705$	$p = 0.010^*$
Cpu	$F_{(1,26)} = 0.948$	$p = 0.339$	$F_{(1,26)} = 27.180$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 0.372$	$p = 0.547$
NQO1						
PFC	$F_{(1,26)} = 3.097$	$p = 0.090$	$F_{(1,26)} = 1.021$	$p = 0.322$	$F_{(1,26)} = 2.430$	$p = 0.131$
HP	$F_{(1,26)} = 0.030$	$p = 0.864$	$F_{(1,26)} = 0.746$	$p = 0.400$	$F_{(1,26)} = 0.294$	$p = 0.593$
AA	$F_{(1,26)} = 1.585$	$p = 0.219$	$F_{(1,26)} = 19.430$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 11.290$	$p = 0.002^{**}$
Cpu	$F_{(1,26)} = 0.026$	$p = 0.872$	$F_{(1,26)} = 0.060$	$p = 0.808$	$F_{(1,26)} = 0.137$	$p = 0.715$
NRF2						
PFC	$F_{(1,26)} = 5.538$	$p = 0.026^*$	$F_{(1,26)} = 0.588$	$p = 0.450$	$F_{(1,26)} = 0.003$	$p = 0.960$
HP	$F_{(1,25)} = 0.051$	$p = 0.823$	$F_{(1,25)} = 0.526$	$p = 0.475$	$F_{(1,25)} = 3.403$	$p = 0.077$
AA	$F_{(1,26)} = 0.070$	$p = 0.794$	$F_{(1,26)} = 2.287$	$p = 0.142$	$F_{(1,26)} = 0.024$	$p = 0.879$
Cpu	$F_{(1,26)} = 2.405$	$p = 0.133$	$F_{(1,26)} = 0.004$	$p = 0.949$	$F_{(1,26)} = 1.833$	$p = 0.187$
SOD						
PFC	$F_{(1,26)} = 1.155$	$p = 0.292$	$F_{(1,26)} = 0.684$	$p = 0.416$	$F_{(1,26)} = 2.643$	$p = 0.116$

IOS	MIS	Tratamiento (omega-3)	Interacción
HP	F _(1,25) = 18.230 p < 0.001***	F _(1,25) = 0.211 p = 0.650	F _(1,25) = 8.299 p = 0.008**
AA	F _(1,24) = 9.966 p = 0.004**	F _(1,24) = 2.319 p = 0.141	F _(1,24) = 0.064 p = 0.803
Cpu	F _(1,27) = 6.207 p = 0.019*	F _(1,27) = 0.098 p = 0.757	F _(1,27) = 0.558 p = 0.461
CAT			
PFC	F _(1,26) = 1.528 p = 0.227	F _(1,26) = 0.782 p = 0.385	F _(1,26) = 1.538 p = 0.226
HP	F _(1,26) = 1.435 p = 0.242	F _(1,26) = 0.199 p = 0.659	F _(1,26) = 10.690 p = 0.003**
AA	F _(1,25) = 13.460 p = 0.001**	F _(1,25) = 2.240 p = 0.147	F _(1,25) = 0.281 p = 0.601
Cpu	F _(1,27) = 4.160 p = 0.051	F _(1,27) = 2.282 p = 0.142	F _(1,27) = 0.191 p = 0.665
GPx			
PFC	F _(1,25) = 0.176 p = 0.678	F _(1,25) = 4.519 p = 0.044*	F _(1,25) = 2.556 p = 0.122
HP	F _(1,26) = 1.561 p = 0.223	F _(1,26) = 3.284 p = 0.081	F _(1,26) = 1.368 p = 0.253
AA	F _(1,26) = 0.435 p = 0.515	F _(1,26) = 7.225 p = 0.012*	F _(1,26) = 0.784 p = 0.384
Cpu	F _(1,27) = 4.902 p = 0.035*	F _(1,27) = 0.005 p = 0.946	F _(1,27) = 0.803 p = 0.378
GSH_{total}			
PFC	F _(1,25) = 2.215 p = 0.149	F _(1,25) = 2.772 p = 0.108	F _(1,25) = 0.298 p = 0.590
HP	F _(1,26) = 3.759 p = 0.063	F _(1,26) = 5.314 p = 0.029*	F _(1,26) = 1.157 p = 0.292
AA	F _(1,25) = 11.870 p = 0.002**	F _(1,25) = 0.098 p = 0.756	F _(1,25) = 0.224 p = 0.640
Cpu	F _(1,27) = 8.750 p = 0.006**	F _(1,27) = 0.010 p = 0.921	F _(1,27) = 0.005 p = 0.943
GSH_{libre}			
PFC	F _(1,26) = 3.568 p = 0.070	F _(1,26) = 4.614 p = 0.041*	F _(1,26) = 0.458 p = 0.505
HP	F _(1,26) = 2.834 p = 0.104	F _(1,26) = 3.414 p = 0.076	F _(1,26) = 0.391 p = 0.537
AA	F _(1,25) = 9.944 p = 0.004**	F _(1,25) = 0.494 p = 0.489	F _(1,25) = 0.588 p = 0.450
Cpu	F _(1,27) = 8.248 p = 0.009**	F _(1,27) = 0.006 p = 0.941	F _(1,27) = 0.011 p = 0.918
GSSG			
PFC	F _(1,26) = 1.749 p = 0.198	F _(1,26) = 2.851 p = 0.103	F _(1,26) = 0.241 p = 0.628
HP	F _(1,26) = 5.400 p = 0.028*	F _(1,26) = 8.667 p = 0.008**	F _(1,26) = 3.295 p = 0.081
AA	F _(1,25) = 8.480 p = 0.007**	F _(1,25) = 0.471 p = 0.499	F _(1,25) = 0.132 p = 0.719
Cpu	F _(1,27) = 9.247 p = 0.005**	F _(1,27) = 0.016 p = 0.899	F _(1,27) = 0.001 p = 0.971

ANEXO H: Cambios en los marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con minociclina durante la periadolescencia (Media \pm SEM)

Tabla A7. En la tabla se muestran el promedio y la desviación estándar de la media (SEM) de cada grupo, resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con minociclina. Los parámetros no normales ni homocedásticos y que fueron transformados se representan con un *.

Marcadores	Salino VH		Salino MIN		MIS VH		MIS MIN	
	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM
iNOS								
Corteza prefrontal	100.000	2.967	110.201	5.203	134.475	3.795	105.227	6.208
Hipocampo	100.030	4.950	95.884	9.164	110.465	5.833	97.276	6.641
Amígdala	99.890	2.226	108.353	5.817	134.156	5.423	119.476	9.156
Caudado-putamen	100.000	2.232	96.617	3.838	121.027	4.383	99.153	5.747
COX2								
Corteza prefrontal	100.000	3.770	104.073	7.024	99.985	6.327	105.851	8.331
Hipocampo	100.415	6.712	101.463	7.874	90.715	6.726	92.094	9.572
Amígdala	100.908	1.925	94.402	4.792	118.507	6.257	102.027	2.320
Caudado-putamen	100.001	5.452	89.719	8.690	111.521	11.919	96.031	7.194
MDA								
Corteza prefrontal*	0.450	0.078	0.338	0.105	0.709	0.077	0.594	0.080
Hipocampo*	0.524	0.117	0.645	0.100	0.510	0.067	0.388	0.095
Amígdala	0.759	0.123	0.857	0.166	0.853	0.152	1.016	0.269
Caudado-putamen	1.045	0.156	0.786	0.099	0.961	0.134	0.934	0.110
KEAP1								
Corteza prefrontal*	0.389	0.071	0.313	0.079	0.713	0.083	0.676	0.074
Hipocampo	100.521	4.939	68.903	4.654	90.815	5.200	81.055	7.339
Amígdala	100.001	3.628	92.672	3.305	130.383	7.835	118.134	4.843
Caudado-putamen	99.999	2.799	96.734	8.546	110.166	5.223	113.575	5.153
HO1								
Corteza prefrontal	99.997	1.934	103.450	7.858	91.624	5.950	121.860	6.670
Hipocampo	100.078	1.968	100.116	4.663	90.864	8.434	111.902	11.189
Amígdala	99.989	2.226	113.438	4.552	107.638	3.561	164.248	12.481
Caudado-putamen	99.998	3.602	107.006	5.461	99.213	5.937	120.311	7.843
NQO1								
Corteza prefrontal	99.999	2.247	95.984	6.859	81.061	6.939	89.691	7.399
Hipocampo	100.004	4.878	113.509	6.320	95.938	5.445	124.587	5.951
Amígdala	100.001	2.528	99.259	10.165	90.223	5.963	116.742	8.061
Caudado-putamen	100.000	1.271	103.669	4.385	98.078	5.356	100.403	6.762
NRF2								
Corteza prefrontal*	0.409	0.075	0.595	0.096	0.621	0.120	0.454	0.092
Hipocampo*	0.609	0.085	0.501	0.136	0.405	0.107	0.559	0.063
Amígdala	0.155	0.023	0.162	0.023	0.154	0.012	0.178	0.027
Caudado-putamen*	0.537	0.082	0.514	0.125	0.473	0.079	0.545	0.106
SOD								

Marcadores	Salino VH		Salino MIN		MIS VH		MIS MIN	
	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM
Corteza prefrontal	2.831	0.176	2.732	0.144	2.856	0.077	2.917	0.217
Hipocampo	2.696	0.175	2.883	0.127	2.492	0.132	2.646	0.185
Amígdala	2.791	0.187	2.618	0.140	2.272	0.115	3.190	0.369
Caudado-putamen	3.242	0.483	2.635	0.637	2.125	0.204	3.849	0.499
CAT								
Corteza prefrontal	5.808	0.393	4.843	0.493	4.862	0.167	4.554	0.543
Hipocampo	5.969	0.711	6.589	0.599	6.950	0.718	5.560	0.271
Amígdala	8.945	0.520	8.106	0.743	7.474	0.443	8.584	0.901
Caudado-putamen*	3.386	0.183	3.246	0.267	2.867	0.137	2.382	0.422
GPx								
Corteza prefrontal	21.306	0.352	19.628	0.993	19.113	0.607	21.501	1.424
Hipocampo	29.604	2.982	25.493	0.554	29.199	2.129	22.462	1.116
Amígdala	29.883	2.171	26.933	3.358	27.652	1.734	30.556	2.404
Caudado-putamen*	6.025	0.152	5.670	0.140	5.384	0.251	5.823	0.226
GSH_{total}								
Corteza prefrontal*	0.383	0.143	0.751	0.292	0.807	0.171	1.201	0.298
Hipocampo**	2.589	0.181	2.390	0.093	2.598	0.116	2.071	0.112
Amígdala	6.565	1.005	5.352	0.939	3.927	0.381	6.850	0.876
Caudado-putamen*	1.024	0.078	0.855	0.086	0.821	0.064	0.920	0.049
GSH_{libre}								
Corteza prefrontal*	0.060	0.152	0.452	0.285	0.515	0.168	0.865	0.319
Hipocampo*	1.349	0.212	1.216	0.099	1.302	0.140	0.862	0.138
Amígdala	4.170	0.915	2.921	0.538	2.132	0.243	3.776	0.545
Caudado-putamen*	0.744	0.078	0.578	0.085	0.551	0.063	0.645	0.050
GSSG								
Corteza prefrontal*	0.415	0.066	0.396	0.123	0.519	0.074	0.721	0.091
Hipocampo	3.619	0.422	2.955	0.181	3.648	0.280	2.415	0.162
Amígdala	2.394	0.227	2.430	0.418	1.795	0.140	3.075	0.361
Caudado-putamen	5.553	0.822	3.915	0.871	3.326	0.548	4.084	0.507

ANEXO I: Cambios en los marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con minociclina durante la periadolescencia (ANOVA de 2 vías)

Tabla A8. En la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías para tres factores (MIS: efecto del Poly I:C, Tratamiento: efecto de la minociclina, e Interacción), resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con minociclina.

	IOS		MIS		Tratamiento (minociclina)		Interacción	
iNOS								
PFC	$F_{(1,28)} = 9.800$	$p = 0.004^{**}$	$F_{(1,28)} = 4.085$	$p = 0.053$	$F_{(1,28)} = 17.520$	$p < 0.001^{***}$		
HP	$F_{(1,28)} = 0.749$	$p = 0.394$	$F_{(1,28)} = 1.610$	$p = 0.215$	$F_{(1,28)} = 0.438$	$p = 0.513$		
AA	$F_{(1,28)} = 13.550$	$p = 0.001^{**}$	$F_{(1,28)} = 0.254$	$p = 0.618$	$F_{(1,28)} = 3.523$	$p = 0.071$		
Cpu	$F_{(1,28)} = 7.716$	$p = 0.009^{**}$	$F_{(1,28)} = 8.865$	$p = 0.006^{**}$	$F_{(1,28)} = 4.752$	$p = 0.039^*$		
COX2								
PFC	$F_{(1,28)} = 0.018$	$p = 0.894$	$F_{(1,28)} = 0.571$	$p = 0.456$	$F_{(1,28)} = 0.019$	$p = 0.892$		
HP	$F_{(1,28)} = 1.491$	$p = 0.232$	$F_{(1,28)} = 0.024$	$p = 0.878$	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.983$		
AA	$F_{(1,28)} = 8.935$	$p = 0.006^{**}$	$F_{(1,28)} = 7.420$	$p = 0.011^*$	$F_{(1,28)} = 1.397$	$p = 0.247$		
Cpu	$F_{(1,28)} = 1.063$	$p = 0.311$	$F_{(1,28)} = 2.221$	$p = 0.147$	$F_{(1,28)} = 0.091$	$p = 0.765$		
MDA								
PFC	$F_{(1,27)} = 8.811$	$p = 0.006^{**}$	$F_{(1,27)} = 1.718$	$p = 0.201$	$F_{(1,27)} = <0.001$	$p = 0.989$		
HP	$F_{(1,27)} = 2.027$	$p = 0.166$	$F_{(1,27)} = <0.001$	$p = 0.993$	$F_{(1,27)} = 1.623$	$p = 0.213$		
AA	$F_{(1,28)} = 0.463$	$p = 0.502$	$F_{(1,28)} = 0.494$	$p = 0.488$	$F_{(1,28)} = 0.032$	$p = 0.859$		
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.065$	$p = 0.800$	$F_{(1,28)} = 1.261$	$p = 0.271$	$F_{(1,28)} = 0.838$	$p = 0.368$		
KEAP1								
PFC	$F_{(1,27)} = 20.080$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,27)} = 0.540$	$p = 0.469$	$F_{(1,27)} = 0.067$	$p = 0.798$		
HP	$F_{(1,28)} = 0.047$	$p = 0.830$	$F_{(1,28)} = 13.490$	$p = 0.001^{**}$	$F_{(1,28)} = 3.763$	$p = 0.062$		
AA	$F_{(1,28)} = 28.630$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 3.519$	$p = 0.071$	$F_{(1,28)} = 0.222$	$p = 0.641$		
Cpu	$F_{(1,28)} = 5.415$	$p = 0.027^*$	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.990$	$F_{(1,28)} = 0.331$	$p = 0.570$		
HO1								
PFC	$F_{(1,28)} = 0.693$	$p = 0.412$	$F_{(1,28)} = 7.807$	$p = 0.009^{**}$	$F_{(1,28)} = 4.934$	$p = 0.035^*$		
HP	$F_{(1,28)} = 0.030$	$p = 0.864$	$F_{(1,28)} = 2.001$	$p = 0.168$	$F_{(1,28)} = 1.987$	$p = 0.170$		
AA	$F_{(1,28)} = 17.600$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 25.280$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 9.595$	$p = 0.004^{**}$		
Cpu	$F_{(1,28)} = 1.123$	$p = 0.298$	$F_{(1,28)} = 5.660$	$p = 0.024^*$	$F_{(1,28)} = 1.423$	$p = 0.243$		
NQO1								
PFC	$F_{(1,28)} = 4.108$	$p = 0.052$	$F_{(1,28)} = 0.137$	$p = 0.714$	$F_{(1,28)} = 1.032$	$p = 0.318$		
HP	$F_{(1,28)} = 0.382$	$p = 0.542$	$F_{(1,28)} = 13.800$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 1.781$	$p = 0.193$		
AA	$F_{(1,28)} = 0.282$	$p = 0.599$	$F_{(1,28)} = 3.160$	$p = 0.086$	$F_{(1,28)} = 3.535$	$p = 0.070$		
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.283$	$p = 0.599$	$F_{(1,28)} = 0.377$	$p = 0.544$	$F_{(1,28)} = 0.019$	$p = 0.891$		
NRF2								
PFC	$F_{(1,27)} = 0.134$	$p = 0.712$	$F_{(1,27)} = 0.009$	$p = 0.923$	$F_{(1,27)} = 3.410$	$p = 0,076$		
HP	$F_{(1,26)} = 0.533$	$p = 0.472$	$F_{(1,26)} = 0.054$	$p = 0.818$	$F_{(1,26)} = 1.698$	$p = 0.204$		
AA	$F_{(1,28)} = 0.127$	$p = 0.724$	$F_{(1,28)} = 0.512$	$p = 0.480$	$F_{(1,28)} = 0.149$	$p = 0.702$		
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.027$	$p = 0.870$	$F_{(1,27)} = 0.059$	$p = 0.810$	$F_{(1,27)} = 0.224$	$p = 0.640$		

IOS	MIS		Tratamiento (minociclina)		Interacción	
SOD						
PFC	$F_{(1,28)} = 0.425$	$p = 0.520$	$F_{(1,28)} = 0.014$	$p = 0.908$	$F_{(1,28)} = 0.246$	$p = 0.624$
HP	$F_{(1,28)} = 1.975$	$p = 0.171$	$F_{(1,28)} = 1.185$	$p = 0.286$	$F_{(1,28)} = 0.011$	$p = 0.917$
AA	$F_{(1,28)} = 0.013$	$p = 0.909$	$F_{(1,28)} = 2.724$	$p = 0.110$	$F_{(1,28)} = 5.840$	$p = 0.022^*$
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.010$	$p = 0.921$	$F_{(1,28)} = 1.345$	$p = 0.256$	$F_{(1,28)} = 5.844$	$p = 0.022^*$
CAT						
PFC	$F_{(1,28)} = 2.117$	$p = 0.157$	$F_{(1,28)} = 2.248$	$p = 0.145$	$F_{(1,28)} = 0.597$	$p = 0.446$
HP	$F_{(1,28)} = 0.001$	$p = 0.969$	$F_{(1,28)} = 0.408$	$p = 0.528$	$F_{(1,28)} = 2.783$	$p = 0.106$
AA	$F_{(1,28)} = 0.537$	$p = 0.470$	$F_{(1,28)} = 0.040$	$p = 0.842$	$F_{(1,28)} = 2.075$	$p = 0.161$
Cpu	$F_{(1,28)} = 6.332$	$p = 0.018^*$	$F_{(1,28)} = 1.291$	$p = 0.265$	$F_{(1,28)} = 0.394$	$p = 0.535$
GPx						
PFC	$F_{(1,27)} = 0.027$	$p = 0.870$	$F_{(1,27)} = 0.135$	$p = 0.716$	$F_{(1,27)} = 4.428$	$p = 0.045^*$
HP	$F_{(1,27)} = 0.737$	$p = 0.398$	$F_{(1,27)} = 7.354$	$p = 0.011^*$	$F_{(1,27)} = 0.431$	$p = 0.517$
AA	$F_{(1,28)} = 0.078$	$p = 0.782$	$F_{(1,28)} = <0.001$	$p = 0.993$	$F_{(1,28)} = 1.383$	$p = 0.249$
Cpu	$F_{(1,28)} = 1.517$	$p = 0.228$	$F_{(1,28)} = 0.045$	$p = 0.834$	$F_{(1,28)} = 4.012$	$p = 0.055$
GSH_{total}						
PFC	$F_{(1,28)} = 3.412$	$p = 0.075$	$F_{(1,28)} = 2.594$	$p = 0.118$	$F_{(1,28)} = 0.003$	$p = 0.956$
HP	$F_{(1,28)} = 1.432$	$p = 0.242$	$F_{(1,28)} = 7.801$	$p = 0.009^{**}$	$F_{(1,28)} = 1.589$	$p = 0.218$
AA	$F_{(1,28)} = 0.462$	$p = 0.502$	$F_{(1,28)} = 1.043$	$p = 0.316$	$F_{(1,28)} = 6.100$	$p = 0.020^*$
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.964$	$p = 0.335$	$F_{(1,28)} = 0.245$	$p = 0.623$	$F_{(1,28)} = 3.596$	$p = 0.068$
GSH_{libre}						
PFC	$F_{(1,28)} = 3.213$	$p = 0.084$	$F_{(1,28)} = 2.345$	$p = 0.137$	$F_{(1,28)} = 0.007$	$p = 0.933$
HP	$F_{(1,28)} = 1.722$	$p = 0.200$	$F_{(1,28)} = 3.502$	$p = 0.072$	$F_{(1,28)} = 1.012$	$p = 0.323$
AA	$F_{(1,28)} = 0.944$	$p = 0.339$	$F_{(1,28)} = 0.105$	$p = 0.748$	$F_{(1,28)} = 5.642$	$p = 0.025^*$
Cpu	$F_{(1,28)} = 0.810$	$p = 0.376$	$F_{(1,28)} = 0.255$	$p = 0.617$	$F_{(1,28)} = 3.402$	$p = 0.076$
GSSG						
PFC	$F_{(1,27)} = 5.837$	$p = 0.023^*$	$F_{(1,27)} = 1.063$	$p = 0.312$	$F_{(1,27)} = 1.558$	$p = 0.223$
HP	$F_{(1,28)} = 0.830$	$p = 0.370$	$F_{(1,28)} = 11.420$	$p = 0.002^{**}$	$F_{(1,28)} = 1.027$	$p = 0.320$
AA	$F_{(1,28)} = 0.005$	$p = 0.942$	$F_{(1,28)} = 4.593$	$p = 0.041^*$	$F_{(1,28)} = 4.104$	$p = 0.052$
Cpu	$F_{(1,28)} = 2.125$	$p = 0.156$	$F_{(1,28)} = 0.389$	$p = 0.538$	$F_{(1,28)} = 2.880$	$p = 0.101$

ANEXO J: Cambios conductuales y neuroanatómicas tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante 7 días durante la gestación (ANOVA de 2 vías)

Tabla A9. En la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías para tres factores (MIS: efecto del Poly I:C, Tratamiento: efecto de la N-acetilcisteína durante 7 días, e Interacción), resultado de los análisis conductuales (laberinto en T y laberinto en cruz elevado) y neuroanatómicos (ROIs, DTI y H₁-MRS) tras el tratamiento con N-acetilcisteína durante 7 días.

Prueba	MIS		NAC7d		Interacción		KW
Laberinto en T							
Nº de alternancias	F _(1,40) = 3.260	p=0.078	F _(1,40) = 0.011	p=0.916	F _(1,40) = 1.365	p=0.250	-
Laberinto en cruz elevado							
Brazos abiertos	F _(1,40) = 0.612	p=0.438	F _(1,40) = 12.270	p=0.001**	F _(1,40) = 5.435	p=0.025*	-
Brazos cerrados	F _(1,40) = 0.841	p=0.365	F _(1,40) = 9.906	p=0.003**	F _(1,40) = 4.234	p=0.044*	-
Nº de asomos	F _(1,40) = 12.380	p=0.001**	F _(1,40) = 5.053	p=0.030*	F _(1,40) = 5.854	p=0.020*	-
Volumetría: regiones de interés							
Cerebro	F _(1,33) = 18.620	p<0.001***	F _(1,33) = 1.077	p=0.307	F _(1,33) = 0.171	p=0.682	-
Corteza prefrontal	F _(1,33) = 10.780	p=0.002**	F _(1,33) = 6.336	p=0.017*	F _(1,33) = 0.002	p=0.968	-
Corteza	F _(1,33) = 3.080	p=0.089	F _(1,33) = 10.340	p=0.003**	F _(1,33) = 4.063	p=0.052	-
Hipocampo	F _(1,33) = 9.856	p=0.004**	F _(1,33) = 9.830	p=0.004**	F _(1,33) = 2.513	p=0.122	-
Ventrículos	F _(1,32) = 4.498	p=0.042*	F _(1,32) = 1.409	p=0.244	F _(1,32) = 6.394	p=0.017*	-
Cuerpo calloso	F _(1,32) = 4.987	p=0.033*	F _(1,32) = 35.210	p<0.001***	F _(1,32) = 5.100	p=0.031*	-
Cerebelo	F _(1,33) = 15.240	p<0.001***	F _(1,33) = 5.875	p=0.021*	F _(1,33) = 0.312	p=0.576	-
DTI							
Cuerpo calloso (FA)	F _(1,33) = 1.343	p=0.255	F _(1,33) = 2.966	p=0.094	F _(1,33) = 26.040	p<0.001***	-
Cuerpo calloso (MD)							p=0.002**
Corteza (FA)							p=0.919
Corteza (MD)							p=0.001**
Hipocampo (FA)	F _(1,31) = 0.371	p=0.547	F _(1,31) = 2.644	p=0.114	F _(1,31) = 0.503	p=0.484	-
Hipocampo (MD)							p<0.001***
H₁-MRS							
GPC + PCh (PFC)	F _(1,26) = 0.001	p=0.968	F _(1,26) = 0.652	p=0.427	F _(1,26) = 0.676	p=0.418	-
NAA + NAAG (PFC)	F _(1,31) = 0.105	p=0.747	F _(1,31) = 0.024	p=0.878	F _(1,31) = 0.472	p=0.497	-
Glu + Gln (PFC)	F _(1,31) = 0.139	p=0.712	F _(1,31) = 1.114	p=0.299	F _(1,31) = 0.041	p=0.840	-
MM09 + Lip09 (PFC)	F _(1,31) = 0.622	p=0.436	F _(1,31) = 2.037	p=0.163	F _(1,31) = 0.938	p=0.340	-
MM20 + Lip20 (PFC)	F _(1,30) = 2.056	p=0.162	F _(1,30) = 0.443	p=0.511	F _(1,30) = 0.032	p=0.860	-
GPC + PCh (HP)	F _(1,28) = 2.220	p=0.147	F _(1,28) = 1.317	p=0.261	F _(1,28) = 1.178	p=0.287	-
NAA + NAAG (HP)	F _(1,31) = 2.911	p=0.098	F _(1,31) = < 0.001	p=0.983	F _(1,31) = 0.396	p=0.534	-
Glu + Gln (HP)							p=0.270
MM09 + Lip09 (HP)	F _(1,30) = 4.802	p=0.036*	F _(1,30) = 11.340	p=0.002**	F _(1,30) = 1.635	p=0.211	-
MM20 + Lip20 (HP)	F _(1,25) = 5.405	p=0.028*	F _(1,25) = 8.929	p=0.006**	F _(1,25) = 0.189	p=0.669	-

ANEXO K: Cambios conductuales y neuroanatómicas tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante 21 días durante la gestación (ANOVA de 2 vías)

Tabla A10. En la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías para tres factores (MIS: efecto del Poly I:C, Tratamiento: efecto de la N-acetilcisteína durante 21 días, e Interacción), resultado de los análisis conductuales (laberinto en T y laberinto en cruz elevado) y neuroanatómicos (ROIs, DTI y H₁-MRS) tras el tratamiento con NAC durante 21 días.

Prueba	MIS		NAC21d		Interacción		KW
Laberinto en T							
Nº de alternancias	F _(1,39) = 0.103	p=0.750	F _(1,39) = 1.187	p=0.283	F _(1,39) = 0.080	p=0.778	-
Laberinto en cruz elevado							
Brazos abiertos	F _(1,40) = 0.391	p=0.535	F _(1,40) = 6.306	p=0.016*	F _(1,40) = 11.110	p=0.002**	-
Brazos cerrados	F _(1,40) = 0.002	p=0.965	F _(1,40) = 9.348	p=0.004**	F _(1,40) = 12.030	p=0.001**	-
Nº de asomos	F _(1,40) = 7.861	p=0.008**	F _(1,40) = 8.099	p=0.007**	F _(1,40) = 20.160	p<0.001***	-
Volumetría: regiones de interés							
Cerebro	F _(1,33) = 1.662	p=0.206	F _(1,33) = 0.842	p=0.365	F _(1,33) = 9.351	p=0.004**	-
Corteza prefrontal	F _(1,33) = 3.177	p=0.084	F _(1,33) = 0.600	p=0.447	F _(1,33) = 2.898	p=0.099	-
Corteza	F _(1,33) = 0.985	p=0.328	F _(1,33) = 1.245	p=0.273	F _(1,33) = 0.547	p=0.465	-
Hipocampo	F _(1,33) = 6.560	p=0.015*	F _(1,33) = 6.319	p=0.017*	F _(1,33) = 5.512	p=0.025*	-
Ventrículos	F _(1,32) = 3.980	p=0.055	F _(1,32) = 0.392	p=0.536	F _(1,32) = 2.325	p=0.137	-
Cuerpo caloso	F _(1,32) = 0.056	p=0.814	F _(1,32) = 32.030	p<0.001***	F _(1,32) = 22.750	p<0.001***	-
Cerebelo	F _(1,33) = 2.393	p=0.436	F _(1,33) = 0.622	p=0.436	F _(1,33) = 9.220	p=0.005**	-
DTI							
Cuerpo caloso (FA)	F _(1,33) = 10.990	p=0.002**	F _(1,33) = 16.400	p<0.001***	F _(1,33) = 6.527	p=0.015*	-
Cuerpo caloso (MD)							p=0.002**
Corteza (FA)							p=0.919
Corteza (MD)							p=0.001**
Hipocampo (FA)	F _(1,31) = 0.195	p=0.662	F _(1,31) = 2.452	p=0.127	F _(1,31) = 0.272	p=0.606	-
Hipocampo (MD)							p<0.001***
H₁-MRS							
GPC + PCh (PFC)	F _(1,26) = 0.500	p=0.487	F _(1,26) = 4.538	p=0.043*	F _(1,26) = 0.111	p=0.742	-
NAA + NAAG (PFC)	F _(1,31) = 0.118	p=0.734	F _(1,31) = 2.856	p=0.101	F _(1,31) = 0.001	p=0.972	-
Glu + Gln (PFC)	F _(1,31) = 0.702	p=0.408	F _(1,31) = 0.097	p=0.757	F _(1,31) = 0.460	p=0.502	-
MM09 + Lip09 (PFC)	F _(1,31) = 0.451	p=0.507	F _(1,31) = 8.367	p=0.007**	F _(1,31) = 0.183	p=0.671	-
MM20 + Lip20 (PFC)	F _(1,29) = 0.244	p=0.625	F _(1,29) = 4.716	p=0.038*	F _(1,29) = 0.829	p=0.370	-
GPC + PCh (HP)	F _(1,28) = 6.303	p=0.018*	F _(1,28) = 7.612	p=0.010*	F _(1,28) = 0.015	p=0.903	-
NAA + NAAG (HP)	F _(1,31) = 0.779	p=0.384	F _(1,31) = 0.691	p=0.412	F _(1,31) = 0.800	p=0.379	-
Glu + Gln (HP)							p=0.270
MM09 + Lip09 (HP)	F _(1,30) = 0.011	p=0.918	F _(1,30) = 3.438	p=0.074	F _(1,30) = 0.778	p=0.385	-
MM20 + Lip20 (HP)	F _(1,25) = 0.549	p=0.465	F _(1,25) = 6.019	p=0.021*	F _(1,25) = 0.795	p=0.381	-

ANEXO L: Alteraciones en la morfometría cerebral tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante la gestación

Tabla A11. En la tabla se muestran todos los resultados significativos (p_{FDR} cluster < 0.05 , $k > 1000$) encontrados en el análisis de VBM y SPM tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante la gestación. Abreviaturas: 3V: tercer ventrículo, 4V: cuarto ventrículo, ac: comisura anterior, Au1: corteza auditiva primaria, BS: tronco cerebral, Cb: cerebelo, cc: cuerpo caloso, cp: pedúnculo cerebral, CPu: caudado-putamen, esc: comisura del colículo superior, ctg: tracto tegmental central, D3V: tercer ventrículo dorsal, dlf: fascículo longitudinal dorsal, dMN: núcleo mesencefálico profundo, ec: cápsula externa, Ect: corteza ectorrinal, Ent: corteza entorrinal, fmj: fórceps mayor del cuerpo caloso, HPT: hipotálamo, ic: cápsula interna, IC: colículo inferior, iml: lámina medular interna, imvc: comisura talámica intermedioventral, lab: fascículo de asociación longitudinal, LGP: globo pálido lateral, lo: tracto olfatorio lateral, LR4V: cuarto ventrículo lateral, LV: ventrículo lateral, mfb: fascículo preencefálico medial, ml: lemnisco medial, MnPO: núcleo preóptico mediano, NAcc: núcleo accumbens, OV: ventrículo olfatorio, PFC: corteza prefrontal, Pir: corteza piriforme, py: tracto piramidal, rcc: rostrum del cuerpo caloso, RS: corteza retrosplenial, S2: corteza somatosensorial secundaria, SAS: espacio subaracnoideo, SC: colículo superior, sol: tracto solitario, sp5: tracto trigémino espinal, Spt: septo, Th: tálamo, V1: corteza visual primaria, vHP: hipocampo ventral.

SUSTANCIA GRIS (GM)					
SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P_{FDR} cluster
Efecto de NAC7d en Salino					
NAcc	I & D	6.42	3247	↓	< 0.001
Pir	I	4.75	10240	↓	< 0.001
	D	4.65	3952	↓	< 0.001
dMN	I	4.24	1010	↓	0.023
PFC	D	3.31	2731	↓	< 0.001
Cb/IC/SC/Th	I & D	7.14	56091	↑	< 0.001
HPT	I & D	5.35	28895	↑	< 0.001
RS	I	5.49	5228	↑	< 0.001
	D	4.69	1047	↑	0.022
BS	I & D	3.79	1645	↑	0.003
Efecto de NAC21d en Salino					
CPu	D	4.54	2291	↓	0.001
MnPO	I & D	4.47	2927	↓	< 0.001
RS	I & D	3.51	2137	↓	0.001
vHP	I	3.24	1173	↓	0.013
Cb/IC/SC/Th	I & D	7.31	139170	↑	< 0.001
HPT	I & D	5.72	13529	↑	< 0.001
RS	I & D	4.85	6464	↑	< 0.001
Spt	I & D	4.40	1025	↑	0.020
S2	D	4.02	4347	↑	< 0.001
	I	3.63	1143	↑	0.015
Ent	I	4.89	1034	↓	0.039

SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
Efecto de NAC7d en MIS					
Cpu	D	4.51	3757	↓	< 0.001
	I	4.23	2116	↓	0.002
Cb/IC/SC/Th	I & D	7.69	59329	↑	< 0.001
BS	I & D	5.49	7914	↑	< 0.001
Cb	D	4.88	4732	↑	< 0.001
BS	D	4.69	2042	↑	0.001
HPT	I & D	4.44	8213	↑	< 0.001
		4.37	6746	↑	< 0.001
PFC	I	4.26	2385	↑	< 0.001
	D	3.91	2827	↑	< 0.001
Th	I & D	3.41	1257	↑	0.007
LGP	I	3.31	1274	↑	0.007
Au1	D	3.29	2970	↑	< 0.001
Efecto de NAC21d en MIS					
CPu	D	5.37	7979	↓	< 0.001
DpMe	I & D	5.16	3921	↓	< 0.001
CPu	I	5.11	7391	↓	< 0.001
BS	I & D	4.22	1874	↓	0.001
RS	I & D	3.72	2466	↓	< 0.001
PFC	D	3.49	3000	↓	< 0.001
Cb/IC/SC/Th	I & D	7.94	127271	↑	< 0.001
	I	4.66	2084	↑	0.001
BS	D	4.40	1769	↑	0.001
Au1	D	4.24	4329	↑	< 0.001
	I	3.86	1038	↑	0.014
PFC	D	3.79	1750	↑	0.001
SUSTANCIA BLANCA (WM)					
SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
Efecto de NAC7d en Salino					
ctg/csc	I & D	5.97	34050	↓	< 0.001
mfb	I & D	5.44	12852	↓	< 0.001
rcc	I & D	4.92	2615	↓	< 0.001
Cb	D	4.91	1196	↓	< 0.001
RS	D	4.36	1109	↓	< 0.001
Ent	D	4.31	1624	↓	< 0.001
Cb	I	4.27	1006	↓	< 0.001
sp5	I	4.00	2733	↓	< 0.001
py	I & D	3.31	1049	↓	< 0.001
fmj	I	4.64	2422	↑	< 0.001
cc	D	3.44	1061	↑	< 0.001
Efecto de NAC21d en Salino					
mfb	I & D	5.70	8090	↓	< 0.001
Cb	D	5.58	2591	↓	< 0.001
cc	I	4.70	5738	↓	< 0.001

SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
Cb	I	4.69	1364	↓	< 0.001
	I	4.59	2801	↓	< 0.001
RS	D	4.58	1183	↓	< 0.001
iml	I	4.34	1480	↓	< 0.001
sol	I & D	4.23	3370	↓	< 0.001
Cb	I & D	4.16	5260	↓	< 0.001
sp5	D	4.13	5346	↓	< 0.001
cc	D	4.07	4238	↓	< 0.001
rcc	I & D	4.07	1801	↓	< 0.001
imvc	I & D	4.04	3189	↓	< 0.001
ec	I	3.76	2159	↓	< 0.001
mf b	I	3.31	1567	↓	< 0.001
ml	I & D	3.23	1331	↓	< 0.001
lo	I & D	4.83	2207	↑	< 0.001
cc	I	4.64	9167	↑	< 0.001
Cb	I & D	4.51	4538	↑	< 0.001
	D	4.35	2430	↑	< 0.001
cp	I	3.84	1153	↑	< 0.001
		3.75	1347	↑	< 0.001
cc	D	3.64	6124	↑	< 0.001
Efecto de NAC7d en MIS					
Cb	I & D	6.43	24993	↓	< 0.001
sp5	D	5.15	8608	↓	< 0.001
mf b	I	5.10	3008	↓	< 0.001
lo	I	4.63	1058	↓	< 0.001
mf b	I & D	4.55	10883	↓	< 0.001
RS	D	4.44	1567	↓	< 0.001
lo	D	4.31	2957	↓	< 0.001
fmj	I	4.21	1541	↓	< 0.001
ml	D	3.82	1053	↓	< 0.001
sp5	I	3.74	1096	↓	< 0.001
Cb	I	3.73	2266	↓	< 0.001
cc	D	3.58	1326	↓	< 0.001
cc	I	5.21	4402	↑	< 0.001
Cb	I & D	5.01	8497	↑	< 0.001
ac	I & D	4.79	4167	↑	< 0.001
lab	D	4.07	2470	↑	< 0.001
cc	D	3.72	1200	↑	< 0.001
Efecto de NAC21d en MIS					
mf b		8.17		↓	< 0.001
cp	I & D	6.90	139005	↓	< 0.001
Cb/sp5		6.62		↓	< 0.001
ml/ic/cc	I & D	5.53	10711	↓	< 0.001
lo	I & D	5.53	1970	↓	< 0.001
lab/ec/cc	D	5.23	8440	↑	< 0.001
	I	4.46	3445	↑	< 0.001
cc	I	4.15	2465	↑	< 0.001

SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
Cb	I	4.10	1814	↑	< 0.001
cc	I	4.08	2620	↑	< 0.001
dlf	D	3.44	1019	↑	< 0.001

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (CSF)

SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
-----	------------	---	---	-----	--------------------------

Efecto de NAC7d en Salino

LR4V	I & D	5.59	9763	↓	< 0.001
3V/SAS	I & D	5.54	40593	↓	< 0.001
Cb	I & D	5.44	2500	↓	< 0.001
SAS	I & D	5.39	1199	↓	< 0.001
Cb	D	4.89	3563	↓	< 0.001
OV	I & D	4.71	2529	↓	< 0.001
LR4V	D	4.56	3656	↓	< 0.001
D3V	I & D	4.29	2271	↓	< 0.001
OV	D	3.92	5232	↓	< 0.001

Efecto de NAC21d en Salino

3V/SAS	I & D	5.95	61229	↓	< 0.001
Cb	I & D	5.44	2467	↓	< 0.001
		4.92	5530	↓	< 0.001
LR4V	I	4.48	1356	↓	< 0.001
3V	I & D	3.90	1968	↑	< 0.001

Efecto de NAC7d en MIS

SAS	D	5.64	13828	↓	< 0.001
LV	I	5.39	2604	↓	< 0.001
LR4V	D	5.11	5432	↓	< 0.001
LV	D	5.06	2278	↓	< 0.001
CSF (PFC)	I & D	5.06	21018	↓	< 0.001
3V	I & D	4.15	7092	↓	< 0.001
CSF (V1)	I	3.85	1564	↓	< 0.001
Cb	D	3.49	1038	↓	< 0.001
OV	I & D	3.47	1914	↓	< 0.001
CSF (RS)	I & D	3.35	1500	↓	< 0.001
CSF (Ect)	D	3.29	1015	↓	< 0.001
LR4V	I	3.26	1108	↓	< 0.001

Efecto de NAC21d en MIS

OV	I & D	6.04	6829	↓	< 0.001
CSF (PFC)	I	5.64	9207	↓	< 0.001
3V/LR4V/4V	I & D	5.46	44638	↓	< 0.001
CSF (Ect)	I	5.23	8225	↓	< 0.001
Cb	D	5.10	2558	↓	< 0.001
CSF (SAS)	I	5.09	1082	↓	< 0.001
CSF (PFC)	D	5.07	6799	↓	< 0.001
SAS	D	4.82	5546	↓	< 0.001
CSF (Ect)	D	4.53	1982	↓	< 0.001
CSF (RS)	I & D	4.24	7722	↓	< 0.001

SPM	Hemisferio	T	K	↑/↓	P _{FDR} cluster
CSF (PFC)	I & D	4.10	1125	↓	< 0.001
SAS	D	3.90	1707	↓	< 0.001
D3V	I & D	3.88	1138	↓	< 0.001
Cb	D	3.72	1506	↓	< 0.001
CSF (V1)	I	3.72	2239	↓	< 0.001
Cb	I	3.63	1137	↓	< 0.001

ANEXO M: Alteraciones en marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante la gestación (Media \pm SEM)

Tabla A12. En la tabla se muestran el promedio y la desviación estándar de la media (SEM) de cada grupo, resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con N-acetilcisteína. Los parámetros no normales ni homocedásticos y que fueron transformados se representan con un *.

IOS	Sal VH		Sal NAC7d		Sal NAC21d		MIS VH		MIS NAC7d		MIS NAC21	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
iNOS												
PFC	100.000	4.414	91.766	4.839	90.217	3.223	131.918	6.202	95.997	9.313	101.060	3.140
HP	100.125	4.265	102.623	4.539	97.435	2.299	89.242	9.980	126.767	6.665	119.714	6.499
AA	100.089	2.208	105.239	6.681	112.537	6.463	127.644	5.292	114.113	6.261	115.386	6.512
Cpu	100.080	3.791	102.065	2.701	101.857	3.073	104.092	4.943	105.436	4.291	108.800	7.563
COX2												
PFC	100.081	6.276	100.431	6.524	98.557	7.921	121.958	10.662	97.479	9.969	96.911	6.408
HP*	0.339	0.042	0.358	0.079	0.488	0.086	0.768	0.124	0.599	0.085	0.563	0.100
AA*	0.564	0.051	0.348	0.103	0.430	0.094	0.868	0.084	0.379	0.039	0.536	0.101
Cpu*	0.352	0.034	0.320	0.098	0.484	0.038	0.510	0.105	0.641	0.101	0.764	0.101
MDA												
PFC*	0.369	0.073	0.468	0.118	0.764	0.062	0.396	0.077	0.684	0.098	0.436	0.098
HP*	0.533	0.120	0.604	0.070	0.637	0.029	0.505	0.069	0.603	0.043	0.683	0.073
AA	0.760	0.121	0.736	0.060	0.921	0.085	0.798	0.116	1.028	0.089	1.076	0.304
Cpu	0.890	0.120	0.883	0.120	0.886	0.093	0.772	0.093	0.977	0.129	0.533	0.052
KEAP1												
PFC	100.671	9.455	105.880	11.678	104.803	7.675	85.272	7.845	106.654	5.971	115.376	17.458
HP	100.041	3.986	109.495	9.584	112.216	16.892	84.930	10.301	100.113	5.078	115.391	19.184
AA	100.013	5.945	91.395	4.114	94.294	5.348	93.977	5.352	109.062	4.661	94.758	4.155
Cpu	100.069	6.039	108.360	5.323	102.038	5.817	76.245	7.680	100.645	1.413	94.985	6.236
HO1												
PFC	99.999	1.612	95.643	8.824	84.751	4.357	92.019	5.992	84.301	9.043	93.796	6.661
HP	100.042	1.340	94.326	6.203	91.853	4.466	91.497	2.619	88.065	6.854	103.782	9.305
AA	100.085	1.076	99.457	5.335	95.785	4.019	90.919	3.499	105.367	3.023	101.290	5.602
Cpu	100.004	2.656	94.866	4.061	94.328	4.974	90.178	3.914	83.684	5.935	104.528	3.745
NQO1												
PFC	100.002	3.559	88.767	4.444	94.710	14.118	80.842	11.812	89.890	6.555	79.734	11.834
HP	100.251	6.304	108.658	10.966	105.387	12.306	80.418	13.844	98.459	6.785	143.955	20.335
AA	100.126	3.185	110.249	7.751	117.504	5.310	93.817	6.541	106.243	3.841	127.209	10.257
Cpu	100.001	3.864	113.483	6.768	115.636	9.591	91.842	5.291	115.765	8.178	124.208	10.545
NRF2												
PFC	0.075	0.007	0.048	0.003	0.053	0.010	0.046	0.002	0.043	0.005	0.042	0.003
HP	0.154	0.044	0.073	0.010	0.088	0.008	0.127	0.038	0.068	0.009	0.085	0.008
AA*	0.743	0.108	0.654	0.120	0.478	0.107	0.461	0.076	0.443	0.069	0.376	0.090
CPu*	0.571	0.114	0.736	0.083	0.355	0.083	0.391	0.100	0.564	0.121	0.524	0.062

IOS	Sal VH		Sal NAC7d		Sal NAC21d		MIS VH		MIS NAC7d		MIS NAC21	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
SOD												
PFC	2.831	0.243	2.586	0.334	2.241	0.209	2.706	0.142	2.379	0.177	2.756	0.148
HP	2.696	0.410	3.080	0.365	3.130	0.246	2.956	0.245	2.276	0.228	2.714	0.217
AA	2.791	0.337	3.188	0.154	3.164	0.484	2.875	0.170	3.214	0.463	4004	0.348
Cpu	3.241	0.319	2.465	0.282	2.349	0.333	2.828	0.140	2.927	0.348	2.742	0.199
CAT												
PFC*	0.490	0.041	0.614	0.113	0.530	0.118	0.375	0.054	0.596	0.109	0.524	0.133
HP*	0.203	0.060	0.593	0.120	0.761	0.041	0.324	0.091	0.574	0.071	0.603	0.085
AA	7.181	0.741	10.390	1.120	10.496	1.201	8.908	1.023	10.644	1.716	12.012	1.584
Cpu	11.036	1.100	11.223	1.322	8.595	1.219	10.569	0.895	6.389	1.134	6.824	0.841
GPx												
PFC*	0.609	0.107	0.601	0.090	0.640	0.096	0.409	0.095	0.439	0.112	0.449	0.103
HP	29.604	3.127	30.441	2.569	28.682	1.646	26.993	2.345	28.674	1.952	29.783	1.733
AA	29.883	4.746	25.455	1.587	29.761	2.848	26.693	3.195	30.951	2.342	34.072	4.360
Cpu	67.571	5.996	70.643	7.236	67.536	4.885	58.683	4.154	77.779	6.149	54.993	2.477
GSH_{total}												
PFC*	0.524	0.124	0.490	0.103	0.675	0.086	0.528	0.110	0.469	0.091	0.450	0.105
HP	6.373	1.283	5.383	0.294	5.963	0.457	6.536	1.226	4.961	0.451	6.315	0.614
AA*	0.771	0.084	0.604	0.057	0.738	0.060	0.706	0.081	0.781	0.043	0.829	0.101
Cpu	11.666	2.071	10.223	1.713	10.651	1.083	11.392	1.910	11.321	1.637	8.429	0.515
GSH_{libre}												
PFC*	0.587	0.127	0.468	0.102	0.661	0.080	0.550	0.112	0.435	0.086	0.443	0.104
HP	2.754	0.532	2.436	0.190	2.511	0.199	2.884	0.535	2.239	0.210	2.767	0.250
AA*	0.531	0.115	0.359	0.076	0.539	0.084	0.450	0.124	0.614	0.062	0.644	0.125
Cpu	6.112	1.203	5.799	1.031	6.442	0.616	5.733	0.973	6.807	0.912	5.048	0.301
GSSG												
PFC*	0.486	0.130	0.514	0.105	0.666	0.081	0.498	0.112	0.496	0.091	0.471	0.105
HP	3.619	0.766	2.902	0.180	3.479	0.266	3.628	0.690	2.682	0.275	3.532	0.373
AA*	0.716	0.101	0.289	0.097	0.489	0.094	0.544	0.091	0.494	0.066	0.629	0.112
Cpu	5.553	0.869	4.129	0.636	3.633	0.504	5.817	1.020	3928	0.764	2.960	0208

ANEXO N: Alteraciones en marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante 7 días en la gestación (ANOVA de 2 vías)

Tabla A13. En la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías para tres factores (MIS: efecto del Poly I:C, Tratamiento: efecto de la NAC7d, e Interacción), resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con N-acetilcisteína durante 7 días en la gestación. Los parámetros no normales ni homocedásticos tras las transformaciones necesarias han sido analizados mediante el test de Kruskal-Wallis (KW).

	IOS	MIS	NAC7d		Interacción		KW
iNOS							
PFC	$F_{(1,27)} = 7.453$	$p=0.011^*$	$F_{(1,27)} = 11.120$	$p=0.002^{**}$	$F_{(1,27)} = 4.373$	$p=0.046^*$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.918$	$p=0.346$	$F_{(1,27)} = 8.366$	$p=0.007^{**}$	$F_{(1,27)} = 6.408$	$p=0.017^*$	-
AA	$F_{(1,27)} = 10.700$	$p=0.003^{**}$	$F_{(1,27)} = 0.566$	$p=0.458$	$F_{(1,27)} = 2.813$	$p=0.105$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.833$	$p=0.369$	$F_{(1,27)} = 0.169$	$p=0.684$	$F_{(1,27)} = 0.006$	$p=0.937$	-
COX2							
PFC	$F_{(1,27)} = 1.169$	$p=0.289$	$F_{(1,27)} = 1.901$	$p=0.179$	$F_{(1,27)} = 2.013$	$p=0.167$	-
HP	$F_{(1,27)} = 13.800$	$p<0.001^{***}$	$F_{(1,27)} = 0.690$	$p=0.413$	$F_{(1,27)} = 1.083$	$p=0.307$	-
AA	$F_{(1,26)} = 4.663$	$p=0.040^*$	$F_{(1,26)} = 20.780$	$p<0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 3.090$	$p=0.090$	-
Cpu	$F_{(1,25)} = 5.708$	$p=0.025^*$	$F_{(1,25)} = 0.245$	$p=0.625$	$F_{(1,25)} = 0.662$	$p=0.423$	-
MDA							
PFC	$F_{(1,27)} = 1.655$	$p=0.209$	$F_{(1,27)} = 4.152$	$p=0.051$	$F_{(1,27)} = 0.989$	$p=0.329$	-
HP							$p=0.727$
AA							$p=0.385$
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.010$	$p=0.921$	$F_{(1,27)} = 0.716$	$p=0.405$	$F_{(1,27)} = 0.834$	$p=0.369$	-
KEAP1							
PFC	$F_{(1,27)} = 0.662$	$p=0.423$	$F_{(1,27)} = 2.190$	$p=0.150$	$F_{(1,27)} = 0.810$	$p=0.376$	-
HP	$F_{(1,27)} = 2.370$	$p=0.135$	$F_{(1,27)} = 2.398$	$p=0.133$	$F_{(1,27)} = 0.130$	$p=0.722$	-
AA	$F_{(1,26)} = 1.309$	$p=0.263$	$F_{(1,26)} = 0.405$	$p=0.530$	$F_{(1,26)} = 5.436$	$p=0.028^*$	-
Cpu	$F_{(1,25)} = 6.858$	$p=0.015^*$	$F_{(1,25)} = 7.368$	$p=0.012^*$	$F_{(1,25)} = 1.789$	$p=0.193$	-
HO1							
PFC							$p=0.568$
HP							$p=0.332$
AA							$p=0.193$
Cpu	$F_{(1,27)} = 5.681$	$p=0.024^*$	$F_{(1,27)} = 1.742$	$p=0.198$	$F_{(1,27)} = 0.024$	$p=0.879$	-
NQO1							
PFC							$p=0.247$
HP	$F_{(1,26)} = 2.078$	$p=0.161$	$F_{(1,26)} = 1.611$	$p=0.215$	$F_{(1,26)} = 0.214$	$p=0.648$	-
AA	$F_{(1,27)} = 0.791$	$p=0.382$	$F_{(1,27)} = 3.780$	$p=0.062$	$F_{(1,27)} = 0.039$	$p=0.844$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.212$	$p=0.649$	$F_{(1,27)} = 8.577$	$p=0.007^{**}$	$F_{(1,27)} = 0.668$	$p=0.421$	-
NRF2							
PFC							$p=0.011^*$
HP							$p=0.154$
AA	$F_{(1,26)} = 6.484$	$p=0.017^*$	$F_{(1,26)} = 0.309$	$p=0.583$	$F_{(1,26)} = 0.134$	$p=0.718$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 2.804$	$p=0.106$	$F_{(1,27)} = 2.565$	$p=0.121$	$F_{(1,27)} = 0.001$	$p=0.971$	-

IOS	MIS		NAC7d		Interacción		KW
SOD							
PFC	$F_{(1,27)} = 0.495$	$p=0.488$	$F_{(1,27)} = 1.469$	$p=0.236$	$F_{(1,27)} = 0.031$	$p=0.862$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.740$	$p=0.397$	$F_{(1,27)} = 0.219$	$p=0.643$	$F_{(1,27)} = 2.838$	$p=0.104$	-
AA	$F_{(1,26)} = 0.030$	$p=0.863$	$F_{(1,26)} = 1.361$	$p=0.254$	$F_{(1,26)} = 0.008$	$p=0.929$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.007$	$p=0.932$	$F_{(1,27)} = 1.441$	$p=0.240$	$F_{(1,27)} = 2.407$	$p=0.132$	-
CAT							
PFC	$F_{(1,26)} = 0.531$	$p=0.473$	$F_{(1,26)} = 3.599$	$p=0.069$	$F_{(1,26)} = 0.287$	$p=0.596$	-
HP	$F_{(1,26)} = 0.300$	$p=0.589$	$F_{(1,26)} = 11.840$	$p=0.002^{**}$	$F_{(1,26)} = 0.561$	$p=0.460$	-
AA	$F_{(1,26)} = 0.606$	$p=0.443$	$F_{(1,26)} = 3.783$	$p=0.063$	$F_{(1,26)} = 0.335$	$p=0.567$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 5.517$	$p=0.026^*$	$F_{(1,27)} = 3.130$	$p=0.088$	$F_{(1,27)} = 3.742$	$p=0.064$	-
GPx							
PFC	$F_{(1,27)} = 3.188$	$p=0.085$	$F_{(1,27)} = 0.012$	$p=0.912$	$F_{(1,27)} = 0.034$	$p=0.855$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.768$	$p=0.389$	$F_{(1,27)} = 0.254$	$p=0.618$	$F_{(1,27)} = 0.028$	$p=0.867$	-
AA	$F_{(1,27)} = 0.141$	$p=0.710$	$F_{(1,27)} = <0.001$	$p=0.978$	$F_{(1,27)} = 2.002$	$p=0.169$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.021$	$p=0.885$	$F_{(1,27)} = 3.404$	$p=0.076$	$F_{(1,27)} = 1.779$	$p=0.193$	-
GSH_{total}							
PFC	$F_{(1,27)} = 0.007$	$p=0.933$	$F_{(1,27)} = 0.189$	$p=0.667$	$F_{(1,27)} = 0.013$	$p=0.910$	-
HP							$p=0.698$
AA	$F_{(1,27)} = 0.694$	$p=0.412$	$F_{(1,27)} = 0.473$	$p=0.498$	$F_{(1,27)} = 3.241$	$p=0.083$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.051$	$p=0.824$	$F_{(1,27)} = 0.171$	$p=0.682$	$F_{(1,27)} = 0.140$	$p=0.711$	-
GSH_{libre}							
PFC	$F_{(1,27)} = 0.106$	$p=0.747$	$F_{(1,27)} = 1.206$	$p=0.282$	$F_{(1,27)} = <0.001$	$p=0.983$	-
HP							$p=0.754$
AA	$F_{(1,27)} = 0.802$	$p=0.378$	$F_{(1,27)} = 0.002$	$p=0.964$	$F_{(1,27)} = 3.013$	$p=0.094$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.094$	$p=0.762$	$F_{(1,27)} = 0.137$	$p=0.714$	$F_{(1,27)} = 0.456$	$p=0.505$	-
GSSG							
PFC	$F_{(1,27)} = <0.001$	$p=0.979$	$F_{(1,27)} = 0.015$	$p=0.903$	$F_{(1,27)} = 0.018$	$p=0.894$	-
HP							$p=0.446$
AA	$F_{(1,27)} = 0.034$	$p=0.855$	$F_{(1,27)} = 7.118$	$p=0.013^*$	$F_{(1,27)} = 4.446$	$p=0.044^*$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.001$	$p=0.970$	$F_{(1,27)} = 3.939$	$p=0.057$	$F_{(1,27)} = 0.077$	$p=0.783$	-

ANEXO O: Alteraciones en marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento preventivo con N-acetilcisteína durante 21 días en la gestación (ANOVA de 2 vías)

Tabla A14. En la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías para tres factores (MIS: efecto del Poly I:C, Tratamiento: efecto de la NAC21d, e Interacción), resultado de los análisis de los diferentes marcadores de inflamación y estrés oxidativo tras el tratamiento con N-acetilcisteína durante toda la gestación. Los parámetros no normales ni homocedásticos tras las transformaciones necesarias han sido analizados mediante el test de Kruskal-Wallis (KW).

	IOS	MIS	NAC21d	Interacción	KW	
iNOS						
PFC	$F_{(1,27)} = 23.220$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,27)} = 20.970$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,27)} = 5.639$ $p = 0.025^*$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.752$	$p = 0.393$	$F_{(1,27)} = 4.470$	$p = 0.044^*$	$F_{(1,27)} = 6.369$ $p = 0.018^*$	-
AA	$F_{(1,27)} = 7.430$	$p = 0.011^*$	$F_{(1,27)} = < 0.001$	$p = 0.986$	$F_{(1,27)} = 4.905$ $p = 0.035^*$	-
Cpu	$F_{(1,26)} = 1.045$	$p = 0.316$	$F_{(1,26)} = 0.366$	$p = 0.550$	$F_{(1,26)} = 0.075$ $p = 0.787$	-
COX2						
PFC	$F_{(1,27)} = 1.543$	$p = 0.225$	$F_{(1,27)} = 2.661$	$p = 0.114$	$F_{(1,27)} = 2.086$ $p = 0.160$	-
HP	$F_{(1,27)} = 6.916$	$p = 0.014^*$	$F_{(1,27)} = 0.086$	$p = 0.772$	$F_{(1,27)} = 3.411$ $p = 0.076$	-
AA	$F_{(1,27)} = 5.586$	$p = 0.026^*$	$F_{(1,27)} = 7.221$	$p = 0.012^*$	$F_{(1,27)} = 1.293$ $p = 0.266$	-
Cpu	$F_{(1,24)} = 6.129$	$p = 0.021^*$	$F_{(1,24)} = 4.773$	$p = 0.039^*$	$F_{(1,24)} = 0.472$ $p = 0.498$	-
MDA						
PFC	$F_{(1,27)} = 3.594$	$p = 0.069$	$F_{(1,27)} = 7.572$	$p = 0.010^*$	$F_{(1,27)} = 5.044$ $p = 0.033^*$	-
HP						$p = 0.727$
AA						$p = 0.385$
Cpu	$F_{(1,27)} = 6.675$	$p = 0.015^*$	$F_{(1,27)} = 1.788$	$p = 0.192$	$F_{(1,27)} = 1.661$ $p = 0.208$	-
KEAP1						
PFC	$F_{(1,27)} = 0.044$	$p = 0.835$	$F_{(1,27)} = 2.217$	$p = 0.148$	$F_{(1,27)} = 1.276$ $p = 0.269$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.172$	$p = 0.682$	$F_{(1,27)} = 2.194$	$p = 0.150$	$F_{(1,27)} = 0.404$ $p = 0.531$	-
AA	$F_{(1,27)} = 0.286$	$p = 0.597$	$F_{(1,27)} = 0.225$	$p = 0.639$	$F_{(1,27)} = 0.389$ $p = 0.538$	-
Cpu	$F_{(1,26)} = 5.487$	$p = 0.027^*$	$F_{(1,26)} = 2.468$	$p = 0.128$	$F_{(1,26)} = 1.619$ $p = 0.214$	-
HO1						
PFC						$p = 0.568$
HP						$p = 0.332$
AA						$p = 0.193$
Cpu	$F_{(1,26)} = 0.002$	$p = 0.962$	$F_{(1,26)} = 1.226$	$p = 0.278$	$F_{(1,26)} = 6.535$ $p = 0.017^*$	-
NQO1						
PFC						$p = 0.247$
HP	$F_{(1,27)} = 0.415$	$p = 0.525$	$F_{(1,27)} = 5.583$	$p = 0.026^*$	$F_{(1,27)} = 4.038$ $p = 0.055$	-
AA	$F_{(1,27)} = 0.056$	$p = 0.814$	$F_{(1,27)} = 12.640$	$p = 0.001^{**}$	$F_{(1,27)} = 1.258$ $p = 0.272$	-
Cpu	$F_{(1,26)} = < 0.001$	$p = 0.979$	$F_{(1,26)} = 9.103$	$p = 0.006^{**}$	$F_{(1,26)} = 1.106$ $p = 0.303$	-
NRF2						
PFC						$p = 0.011^*$
HP						$p = 0.154$
AA	$F_{(1,27)} = 4.026$	$p = 0.055$	$F_{(1,27)} = 3.371$	$p = 0.077$	$F_{(1,27)} = 0.893$ $p = 0.353$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.004$	$p = 0.950$	$F_{(1,27)} = 0.214$	$p = 0.647$	$F_{(1,27)} = 3.699$ $p = 0.065$	-

IOS	MIS		NAC21d		Interacción		KW
SOD							
PFC	$F_{(1,27)} = 1.095$	$p=0.305$	$F_{(1,27)} = 2.094$	$p=0.159$	$F_{(1,27)} = 2.937$	$p=0.098$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.077$	$p=0.783$	$F_{(1,27)} = 0.116$	$p=0.736$	$F_{(1,27)} = 1.451$	$p=0.239$	-
AA	$F_{(1,26)} = 1.600$	$p=0.217$	$F_{(1,26)} = 4.234$	$p=0.049^*$	$F_{(1,26)} = 1.074$	$p=0.310$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.001$	$p=0.968$	$F_{(1,27)} = 3.617$	$p=0.068$	$F_{(1,27)} = 2.458$	$p=0.129$	-
CAT							
PFC	$F_{(1,26)} = 0.357$	$p=0.555$	$F_{(1,26)} = 0.864$	$p=0.361$	$F_{(1,26)} = 0.287$	$p=0.597$	-
HP	$F_{(1,26)} = 0.066$	$p=0.799$	$F_{(1,26)} = 31.500$	$p<0.001^{***}$	$F_{(1,26)} = 3.507$	$p=0.072$	-
AA	$F_{(1,26)} = 1.701$	$p=0.204$	$F_{(1,26)} = 6.670$	$p=0.016^*$	$F_{(1,26)} = 0.007$	$p=0.933$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 1.195$	$p=0.284$	$F_{(1,27)} = 9.128$	$p=0.005^{**}$	$F_{(1,27)} = 0.405$	$p=0.530$	-
GPx							
PFC	$F_{(1,27)} = 3.794$	$p=0.062$	$F_{(1,27)} = 0.127$	$p=0.725$	$F_{(1,27)} = 0.002$	$p=0.966$	-
HP	$F_{(1,27)} = 0.114$	$p=0.738$	$F_{(1,27)} = 0.175$	$p=0.679$	$F_{(1,27)} = 0.692$	$p=0.413$	-
AA	$F_{(1,27)} = 0.021$	$p=0.884$	$F_{(1,27)} = 0.905$	$p=0.350$	$F_{(1,27)} = 0.966$	$p=0.334$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 5.762$	$p=0.023^*$	$F_{(1,27)} = 0.174$	$p=0.680$	$F_{(1,27)} = 0.168$	$p=0.685$	-
GSH_{total}							
PFC	$F_{(1,27)} = 1.091$	$p=0.305$	$F_{(1,27)} = 0.119$	$p=0.733$	$F_{(1,27)} = 1.155$	$p=0.292$	-
HP							$p=0.698$
AA	$F_{(1,27)} = 0.024$	$p=0.877$	$F_{(1,27)} = 0.283$	$p=0.599$	$F_{(1,27)} = 0.883$	$p=0.356$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.698$	$p=0.411$	$F_{(1,27)} = 1.774$	$p=0.194$	$F_{(1,27)} = 0.425$	$p=0.520$	-
GSH_{libre}							
PFC	$F_{(1,27)} = 1.455$	$p=0.238$	$F_{(1,27)} = 0.025$	$p=0.876$	$F_{(1,27)} = 0.733$	$p=0.399$	-
HP							$p=0.754$
AA	$F_{(1,27)} = 0.011$	$p=0.918$	$F_{(1,27)} = 0.783$	$p=0.384$	$F_{(1,27)} = 0.673$	$p=0.419$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 1.167$	$p=0.289$	$F_{(1,27)} = 0.047$	$p=0.830$	$F_{(1,27)} = 0.382$	$p=0.542$	-
GSSG							
PFC	$F_{(1,27)} = 0.731$	$p=0.400$	$F_{(1,27)} = 0.519$	$p=0.478$	$F_{(1,27)} = 0.932$	$p=0.343$	-
HP							$p=0.446$
AA	$F_{(1,27)} = 0.025$	$p=0.874$	$F_{(1,27)} = 0.502$	$p=0.485$	$F_{(1,27)} = 2.423$	$p=0.131$	-
Cpu	$F_{(1,27)} = 0.082$	$p=0.777$	$F_{(1,27)} = 11.160$	$p=0.002^{**}$	$F_{(1,27)} = 0.429$	$p=0.518$	-

ANEXO P: Alteraciones en el microbioma intestinal, a nivel de filo, tras el tratamiento con N-acetilcisteína durante la gestación

Tabla A15. En la tabla se muestran la proporción (%) de miembros de cada filo bacteriano en cada grupo de estudio. Concretamente, se muestran el promedio y la desviación estándar de la media. En la columna de la derecha se muestran asimismo los resultados del análisis de Kruskal-Wallis [$*p < 0.05$].

Filo	Sal VH		MIS VH		Sal NAC7d		MIS NAC7d		Sal NAC21d		MIS NAC21d		KW (p valor)
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	
<i>Actinobacteria</i>	0.112	0.049	0.126	0.055	0.072	0.028	0.099	0.072	0.086	0.034	0.036	0.018	0.744
<i>Bacteroidetes</i>	32.980	1.505	31.640	2.700	33.560	1.287	39.310	2.841	40.030	2.318	32.530	3.106	0.052
<i>Firmicutes</i>	64.870	1.673	64.880	3.574	64.600	1.307	57.440	3.174	56.110	2.258	64.670	3.153	0.031*
<i>Proteobacteria</i>	1.623	0.288	2.933	1.273	1.383	0.247	2.664	0.792	3.510	0.515	2.557	0.480	0.057
<i>Cyanobacteria</i>	0.050	0.003	0.000	0.000	0.002	0.002	0.003	0.003	0.018	0.010	0.007	0.004	0.343
<i>Deferribacteres</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.030	0.085	0.047	0.033*
<i>Tenericutes</i>	0.337	0.266	0.378	0.132	0.357	0.228	0.464	0.214	0.133	0.046	0.112	0.094	0.092
Unclassified Bacteria	0.069	0.055	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.044	0.039	0.000	0.000	0.791
<i>Verrumicrobia</i>	0.000	0.000	0.027	0.018	0.010	0.008	0.005	0.004	0.010	0.005	0.012	0.009	0.708

ANEXO R: Alteraciones en el microbioma intestinal, a nivel de géneros y especies, tras el tratamiento con N-acetilcisteína durante la gestación

Tabla A17. En la tabla se muestran la proporción (%) de miembros de cada género y especie bacterianas en cada grupo de estudio. Concretamente, se muestran el promedio y la desviación estándar de la media. En la columna de la derecha se muestran asimismo los resultados del análisis de Kruskal-Wallis [$*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$].

Gén/Esp.	Sal VH		MIS VH		Sal NAC7d		MIS NAC7d		Sal NAC21d		MIS NAC21d		KW (p valor)
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	0.00	0.00	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09
<i>Corynebacterium stationis</i>	0.10	0.05	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	0.05	0.03	0.00	0.00	0.009**
Bacteroides (gén.)	0.59	0.18	5.39	1.94	1.35	0.43	2.02	0.71	0.85	0.28	1.25	0.41	0.67
<i>Bacteroides acidifaciens</i>	0.00	0.00	0.09	0.04	0.03	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.038*
<i>Bacteroides dorei</i>	0.59	0.18	3.26	1.48	0.97	0.31	1.40	0.40	0.84	0.28	1.13	0.41	0.93
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0.00	0.00	0.26	0.15	0.14	0.07	0.32	0.30	0.00	0.00	0.08	0.04	0.07
<i>Bacteroides uniformis</i>	0.00	0.00	1.50	0.76	0.08	0.06	0.18	0.13	0.00	0.00	0.03	0.01	0.014*
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.01	0.01	0.12	0.07	0.06	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.026*
Prevotella (gén.)	2.61	0.63	2.45	0.54	2.66	0.53	3.52	0.84	4.47	0.73	3.03	0.48	0.25
Alistipes (gén.)	1.14	0.42	0.83	0.23	0.69	0.29	0.63	0.24	1.00	0.25	0.38	0.16	0.19
Lactobacillus (gén.)	4.00	0.94	10.79	2.05	6.61	1.01	6.10	2.27	3.59	0.64	7.70	2.00	0.017*
<i>Lactobacillus hominis</i>	0.03	0.03	0.05	0.03	0.19	0.09	0.09	0.03	0.15	0.10	0.04	0.02	0.20
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	0.01	0.01	0.14	0.04	0.56	0.14	0.62	0.25	0.24	0.08	0.27	0.11	0.003**
<i>Lactobacillus animalis</i>	0.01	0.01	0.14	0.04	0.09	0.04	0.08	0.04	0.01	0.01	0.22	0.09	0.023*
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0.81	0.21	1.24	0.36	0.51	0.12	0.42	0.24	0.48	0.09	0.51	0.10	0.07
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	0.00	0.00	0.13	0.06	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.007**
<i>Lactobacillus murinus</i>	0.35	0.13	1.08	0.28	0.81	0.22	0.75	0.25	0.37	0.10	1.13	0.46	0.22
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0.11	0.07	0.26	0.09	0.18	0.03	0.15	0.09	0.10	0.04	0.14	0.02	0.06
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	0.31	0.11	0.56	0.24	0.55	0.08	0.51	0.32	0.31	0.07	0.37	0.06	0.10
<i>Candidatus arthromitus</i>	0.04	0.04	0.01	0.01	0.09	0.04	0.04	0.02	0.15	0.10	0.08	0.05	0.19
Clostridium (gén.)	7.50	0.56	7.91	0.76	7.40	0.61	6.35	0.37	6.81	0.88	8.24	1.07	0.42
<i>Clostridium hiranonis</i>	0.05	0.03	0.02	0.01	0.05	0.02	0.07	0.03	0.11	0.05	0.08	0.03	0.30
<i>Clostridium sp.</i>	2.39	0.25	2.23	0.36	2.36	0.26	1.84	0.17	1.68	0.27	2.77	0.51	0.16
<i>Clostridium vincentii</i>	0.05	0.02	0.03	0.03	0.02	0.01	0.15	0.04	0.33	0.11	0.14	0.04	<0.001***
Eubacterium (gén.)	0.10	0.04	0.10	0.05	0.28	0.12	0.15	0.10	0.15	0.03	0.10	0.03	0.63
Acetatifactor (gén.)	0.14	0.03	0.03	0.01	0.12	0.03	0.17	0.04	0.18	0.05	0.15	0.04	0.043*
Coprococcus (gén.)	1.01	0.44	0.35	0.15	0.66	0.35	0.59	0.26	0.40	0.13	0.28	0.16	0.61
<i>Eubacterium hadrum</i>	0.34	0.30	0.02	0.01	0.01	0.01	0.09	0.05	0.26	0.13	0.02	0.01	0.14

Gén/Esp.	Sal VH		MIS VH		Sal NAC7d		MIS NAC7d		Sal NAC21d		MIS NAC21d		KW (p valor)
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	
<i>Lachnoanaerobaculum</i> (gén.)	0.44	0.17	0.05	0.03	0.35	0.09	0.44	0.10	0.24	0.07	0.28	0.10	0.030*
<i>Lachnoclostridium</i> (gén.)	0.25	0.09	0.19	0.07	0.20	0.07	0.19	0.06	0.09	0.04	0.21	0.06	0.66
<i>Roseburia</i> (gén.)	0.31	0.16	0.05	0.05	0.23	0.07	0.26	0.12	0.38	0.13	0.83	0.29	0.001**
<i>Ruminococcus</i> (gén.)	4.61	0.78	4.99	0.89	5.44	0.56	4.31	0.70	3.41	0.47	4.23	0.64	0.25
<i>Oscillibacter</i> (gén.)	0.11	0.05	0.12	0.03	0.05	0.02	0.05	0.02	0.13	0.02	0.11	0.03	0.11
<i>Faecalibacterium</i> (gén.)	5.19	0.93	7.30	1.10	3.87	0.47	4.23	0.63	5.47	0.60	5.98	0.72	0.05
<i>Ruminiclostridium</i> (gén.)	0.09	0.01	0.04	0.02	0.07	0.01	0.06	0.02	0.07	0.02	0.05	0.02	0.24
<i>Turcibacter</i> (gén.)	0.55	0.20	0.18	0.11	0.65	0.12	0.58	0.20	0.60	0.23	1.27	0.46	0.023*
<i>Parasutterella excrementihominis</i>	0.09	0.03	0.25	0.11	0.05	0.02	0.31	0.12	0.23	0.11	0.15	0.06	0.52
<i>Bilophila wadsworthia</i>	0.73	0.20	1.89	0.95	0.05	0.02	0.77	0.43	0.38	0.16	0.70	0.38	0.009**
<i>Desulfovibrio</i> (gén.)	0.11	0.05	0.00	0.00	0.15	0.08	0.01	0.01	0.45	0.22	0.15	0.05	0.014*

ANEXO S: Búsqueda de fármacos con una firma transcriptómica opuesta a firmas transcripcionales relacionadas con esquizofrenia. Análisis con Connectivity Map

En este Anexo se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de los datos transcriptómicos obtenidos a partir de los artículos previamente citados mediante el Connectivity Map. Por la longitud de los mismos, se habilita un enlace a una carpeta de Google Drive con acceso libre:

<https://drive.google.com/drive/folders/1jLvQ-F8UJPeBBC9bspiFBB6bb4WeaM7L?usp=sharing>

Dentro de la carpeta de Drive se encuentra un archivo de Microsoft Excel en el que se muestran los datos procedentes de cada artículo, uno por pestaña. En cada una de las pestañas, cada tabla muestra varias categorías, ordenadas por columnas:

- **Rank:** el orden que recibe cada compuesto en base a su “score”.
- **Score:** valor numérico que indica la similitud del compuesto respecto a la firma transcripcional proporcionada. Cuanto más positivo, más similar a esta firma y, cuanto más negativo, más opuesto. En las tablas mostradas en la sección de Resultados se encuentran aquellos fármacos con un “score” más negativo y, por tanto, más reversor. Se consideran significativos aquellos con un “score” entre 90 y 100 (compuestos similares a la firma transcriptómica) y entre -90 y -100 (compuestos opuestos).
- **Type:** el tipo de cambio que genera una firma transcripcional opuesta o similar a la introducida. Existen cuatro tipos: “cp” (compound, compuesto), “cc” (CMap class, clase de CMap), “oe” (overexpression, sobreexpresión) y “kd” (knockdown, pérdida de función de un gen). La categoría “cp” ha sido la más nombrada en la Tesis y hace referencia directa a fármacos y compuestos químicos. “cc” hace referencia a las distintas familias de compuestos, generalmente agrupadas en base a su función biológica. Por último, “oe” y “kd” indican genes cuya ganancia o pérdida de función tendría un efecto similar u opuesta a la presente en la firma transcripcional proporcionada al Connectivity Map.
- **ID:** identidad del compuesto en el Connectivity Map.
- **Name:** nombre del compuesto, clase de fármaco o gen correspondiente.
- **Description:** función biológica del compuesto, clase de fármaco o gen correspondiente.

ANEXO T: Comparativa de scores entre varios fármacos antipsicóticos, la doxiciclina y el ácido alfa-linolénico en los cinco estudios analizados mediante el Connectivity Map

Figura A1. En la Figura se muestra el “score” de cinco fármacos antipsicóticos (clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina y clorpromazina) comparado con el “score” del ácido alfa-linolénico -un ácido omega-3- y la doxiciclina -homólogo de la minociclina-. Mientras que estos últimos muestran un “score” muy próximo a -100, indicando un gran potencial reversor en los cinco estudios, no ocurre lo mismo con los fármacos antipsicóticos, cuyo “score” es tremendamente heterogéneo entre los diferentes estudios, con valores positivos en algunos casos, lo que podría ser indicativo del posible efecto deletéreo que acompaña a sus evidentes efectos terapéuticos en el trastorno.

