



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGIA

MANUEL VELASCO SUAREZ

**Perfil inflamatorio en pacientes con un primer episodio de psicosis
antes y después del tratamiento antipsicótico**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA

EN PSIQUIATRÍA

PRESENTA

Luis Felipe Rivera Chávez

TUTOR DE TESIS

Pablo León Ortiz



Ciudad de México, Julio 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGIA Y
NEUROCIRUGIA
DIRECCION DE ENSEÑANZA

DRA. SONIA ILIANA MEJIA PEREZ
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DR. DANIEL CRAIL MELÉNDEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE PSIQUIATRÍA

DR. PABLO LEÓN ORTIZ
TUTOR DE TESIS

Contenido

Resumen	4
Agradecimientos	5
Lista de abreviaciones	6
Introducción	8
Fisiopatología de la psicosis y esquizofrenia	8
Inflamación sistémica y esquizofrenia	10
Marcadores de neuroinflamación.....	11
Hipótesis.....	12
Objetivo.....	12
Métodos	13
Diseño	13
Muestra.....	13
Marcadores de inflamación sistémica.....	14
Metabolitos cerebrales	15
Análisis estadístico.....	17
Resultados	18
Características demográficas y clínicas	18
Función inmunológica alterada en primer episodio de psicosis	20
Perfil inflamatorio después del tratamiento antipsicótico.....	20
Neuroinflamación en primer episodio de psicosis.....	23
Metabolitos cerebrales después del tratamiento antipsicótico	23
Discusión	25
Predominio de respuesta Th2 en primer episodio de psicosis	25
Existe una relación entre inflamación sistémica y neuroinflamación	26
Función inmunológica mejorada con el tratamiento antipsicótico	27
Conclusiones.....	27
Referencias	
Referencias.....	28

Resumen

Estudios previos sobre perfiles celulares y citocinas han contribuido a la hipótesis de la inflamación en esquizofrenia; sin embargo, marcadores precisos de disfunción inflamatoria aún son poco claros. Estudios con espectroscopía por resonancia magnética de protón (^1H -MRS) han demostrado niveles aumentados de mio-inositol (mI) y colina (Cho) en pacientes con primer episodio de psicosis (PEP), sugiriendo neuroinflamación. Aquí, presentamos perfiles inflamatorios en pacientes con PEP sin tratamiento previo antes y después del tratamiento antipsicótico y en controles sanos (CS), así como niveles corticales de mI y Cho utilizando ^1H -MRS.

Los perfiles inflamatorios se analizaron mediante producción espontánea de citocinas de células mononucleares de sangre periférica, y ante la estimulación mitogénica, en 48 pacientes con PEP y 23 CS. La ^1H -MRS fue realizada en un escáner 3T, centrado en la corteza prefrontal medial y utilizando LCModel (PEP=27, CS=17). Las mediciones de marcadores inflamatorios sistémicos y los neurometabolitos de corteza cerebral por ^1H -MRS de pacientes, se realizó antes y después de recibir dos semanas de tratamiento con risperidona. Los perfiles inflamatorios sistémicos se compararon entre grupos y se realizaron correlaciones con los hallazgos de ^1H -MRS.

El grupo de PEP mostró mayor proporción en el valor proinflamatorio de Th1/Th17 comparado con CS. El mismo grupo presentó un incremento en la producción espontánea de IL-6, IL-2, IL-4. Igualmente, los sujetos con PEP mostraron mayores niveles de Cho. No se encontraron diferencias en los niveles de mI u otros metabolitos. Finalmente, los niveles de Cho correlacionaron con las células T reguladoras, y con monocitos clásicos.

El grupo de PEP se caracterizó por una desregulación inmunológica, afectando la respuesta inmune innata y adaptativa, con una marca predominantemente Th2, la cual mejoró posterior al tratamiento antipsicótico. Adicionalmente, se encontraron niveles aumentados de Cho que correlacionaron con células T reguladoras. La intensa marca de Th2 y la respuesta proinflamatoria en sujetos, junto con los hallazgos de ^1H -MRS, sugieren cambios que pueden asociarse con procesos inflamatorios sistémicos y centrales en la esquizofrenia.

Agradecimientos

El presente proyecto es parte del trabajo realizado por el equipo de Psiquiatría Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, por lo que incluye trabajo previo realizado por el equipo de investigación. De igual manera, este trabajo fue posible gracias a la colaboración con el departamento de Inmunología y Reumatología, y de la Unidad de Citometría de Flujo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, quienes realizaron una parte de los estudios. El trabajo de laboratorio que no he realizado yo, se señala de manera clara.

Muchas gracias a las principales personas colaboradoras del proyecto: Pablo León Ortiz, Jiram Torres Ruíz, Francisco Reyes Madrigal, Daniel Carrillo Vázquez, Tomás Moncada Habib, Kristin Cadenhead, Diana Gómez Martín, Camilo de la Fuente Sandoval.

Además, también agradezco mucho el apoyo brindado por: Melanie Malacara Aguilera, Luz Andrea González Manríquez, Fernanda Menéndez Manjarrez, Marcela Cisneros Otero, Victoria Martínez Ángeles, Paulina Romero Luna, Francisco Martínez De Velasco.

Lista de abreviaciones

3T: 3 Teslas

CS: Controles sanos

Cho: Colina

CMN: Células mononucleares

DUP: Duración de psicosis no tratada

FBS: Suero fetal bovino

NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico

GABA: Ácido γ -aminobutírico

$^1\text{H-MRS}$: Espectroscopía por resonancia magnética de protón

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

INCMNSV: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

INNNMVS: Instituto Nacional de Neurología Manuel Velasco Suárez

IRM: Imagen de resonancia magnética

Lip: Lípidos

mi: Mio-inositol

NK: célula *natural killer*

PANSS: Escala de síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia

PBS: Buffer fosfato salino

PCP: Fenilciclidina

PEP: Primer episodio de psicosis

PET: Tomografía por emisión de positrones

PMA: Forbol miristato acetato

SCID-I: Entrevista Clínica Estructurada para el DSM, eje I

tCr: Creatinina total

TGF- β : Factor transformante de crecimiento- β

TNF: Factor de necrosis tumoral

Tregs: Células T reguladoras

SNC: Sistema nervioso central

Introducción

La esquizofrenia es una enfermedad mental grave asociada a un alto nivel de discapacidad, y es considerada un serio problema de salud pública por la Organización Mundial de la Salud(1). En México, se estima que alrededor de 1 millón de personas padece la enfermedad, con una prevalencia poblacional del 1%, de los cuales el 20% se encuentra severamente incapacitado(2). En el mundo, 21 millones de personas padecen esquizofrenia, y esta contribuye 13.4 millones de años de vida vividos con discapacidad(3). El costo en países occidentales es aproximadamente del 1.6% al 2.6% del costo total en salud, lo cual equivale del 7% al 12% del producto interno bruto(4). Un estudio de costos en México, reveló que el costo anual de esta enfermedad para las instituciones públicas es de 18 millones de dólares, el cual ha incrementado con los años(5). Por lo tanto, desarrollar nuevas intervenciones que impacten en el curso natural de la esquizofrenia, es algo que se necesita de manera urgente, y para ello, es imperativo ampliar el entendimiento de su fisiopatología.

Fisiopatología de la psicosis y esquizofrenia

El término psicosis es producto de una larga evolución conceptual. Mientras que antes de 1980 se empleaba para describir un mal funcionamiento mental que genera disfunción(6), actualmente se utiliza para describir un síndrome más específico. La pérdida de la prueba de realidad es un concepto que hace alusión a que la persona no es capaz de distinguir la experiencia interna de la realidad externa, por lo que brinda una descripción global de dicho síndrome. A su vez, este puede estar compuesto por los llamados síntomas positivos; alteraciones sensoriales, ideas delirantes, desorganización del pensamiento y/o de la conducta. Para realizar el diagnóstico del trastorno psicótico primario más común, la esquizofrenia, es necesario que la persona haya presentado al menos dos de estos síntomas(7). Entender los mecanismos detrás de estas manifestaciones, ha sido objeto de estudio por muchos años. Actualmente, queda claro el involucro del exceso de dopamina en la vía mesolímbica (i.e. teoría dopaminérgica de la esquizofrenia)(6). De hecho, es el sitio de acción de los únicos medicamentos actualmente aprobados para tratar los síntomas

positivos de la enfermedad. Sin embargo, el 20-35% de los pacientes muestran respuesta parcial o no respuesta al tratamiento, el cual además tiene una eficacia clínica mínima para los síntomas negativos y cognitivos que también se presentan en esta enfermedad(8). Esto, aunado a que la teoría dopaminérgica no explica los cambios neuroanatómicos documentados en pacientes con esquizofrenia, nos obliga a concluir que no es una teoría que explique por completo su fisiopatología(8). La teoría glutamatérgica es una posible respuesta a este dilema, que no necesariamente excluye el componente dopaminérgico.

Se ha encontrado que esta alteración dopaminérgica puede ser precedida por fallas en el sistema glutamatérgico a nivel cortical y del hipocampo(6). Se ha demostrado que la fenciclidina (PCP) y ketamina, ambos antagonistas del glutamato, reproducen no solo los síntomas positivos de la enfermedad, sino también los negativos y los cognitivos en las personas (8). Mientras que la disfunción glutamatérgica explica de una manera más integral el fenotipo clínico de la esquizofrenia, los mecanismos detrás de esta falla siguen siendo objeto de estudio. Se cree que la excitotoxicidad glutamatérgica es precedida por una disfunción del receptor anti-N-metil-D-aspartato (NMDA) en las interneuronas ácido γ -aminobutírico (GABA)(8). Incluso, en muestras *post mortem* de personas con esquizofrenia, se ha encontrado un menor número de interneuronas GABA en el hipocampo(9).

Además de la población neuronal, las células de la glía también se han encontrado alteradas en personas con esquizofrenia(10). Algunos estudios experimentales sugieren que la activación de la microglía en períodos cruciales de la embriogénesis altera la proliferación y diferenciación competente de las células gliales progenitoras, generando alteraciones en la diferenciación y maduración de oligodendrocitos y astrocitos(10). A pesar del avance en estos mecanismos a nivel de poblaciones celular, circuitos y neurotransmisores, persiste el reto de integrar todas estas teorías etiológicas con los factores de riesgo y la clínica observada en los pacientes.

Inflamación sistémica y esquizofrenia

Uno de los marcos que promete integrar los conocidos factores de riesgo y mecanismos de la enfermedad, es la teoría inflamatoria en esquizofrenia. La hipótesis inflamatoria se sustenta en que numerosos estudios han demostrado que la inflamación y la disfunción inmunológica pueden contribuir al desarrollo de síntomas característicos de la enfermedad(11–14). Por ejemplo, el riesgo que confieren las infecciones virales durante la infancia para el eventual desarrollo de psicosis, sugiere que su mecanismo pudiera involucrar el efecto de la respuesta inflamatoria sistémica sobre el cerebro en desarrollo(13). Esta hipótesis inflamatoria-inmunológica, puede hablarse en términos de tres componentes clásicamente descritos. El primero de ellos, concierne una activación crónica de macrófagos y linfocitos T, con subsecuente liberación de citocinas (15). Previamente, se demostró que personas con un primer episodio de psicosis (PEP), que nunca han tomado antipsicótico, tienen mayores niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias(16). Alteraciones de algunas citocinas (e.g. interleucina [IL]-1 β , factor transformante de crecimiento- β [TGF- β]) en pacientes con PEP o con recaídas agudas, que además pueden revertir con tratamiento, sugieren su potencial como marcadores de estado agudo de la enfermedad(17). Las citocinas inflamatorias IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ , e IL-18 actúan como inductores de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)-1. Esta enzima está involucrada en la conversión del triptófano a quinurenina(18). Después, la quinurenina es convertida a ácido-quinurénico en los astrocitos, y funciona como antagonista del receptor NMDA, cuya hipofunción se asocia a la aparición de síntomas psicóticos(18).

La hipótesis Th2 de la esquizofrenia, el segundo componente, propone que al menos un subgrupo de los pacientes presenta un cambio a una reactividad inmunológica tipo Th2 que se asocia a un peor pronóstico(19). Estudios realizados con la finalidad de investigar el desbalance Th1/Th2 por medio de análisis de citocinas han mostrado diversos resultados(20,21). Mientras que algunos autores sostienen un predominio Th2(19), también se ha encontrado un predominio de respuesta Th1 en pacientes con psicosis previo al tratamiento(22), controversias que se esperan resolver en un futuro.

Concomitante a la activación de linfocitos, existe una activación de la microglía, liberándose IL-1 β , IL-5, y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , lo cual se relaciona con apoptosis e inhibición de la neurogénesis(23,24). Esto nos lleva al tercer componente de la hipótesis inflamatoria-inmunológica en esquizofrenia, la microglía(25). No solo se ha visto que estos pacientes presentan una mayor activación de la microglía(26), sino que además la sobre-activación de la microglía disminuye la densidad de las espinas y de las sinapsis en neuronas piramidales glutamatérgicas corticales(27).

Sin embargo, no todos los estudios individuales han mostrado homogeneidad en sus resultados, y algunos autores sugieren que esta variabilidad está relacionada con el estado clínico de pacientes, el uso de antipsicóticos, la sensibilidad de las mediciones y la cercanía del tejido analizado con el sistema nervioso central (SNC) (28). El desarrollo de técnicas para medir neuroinflamación, es actualmente un área de interés con potencial.

Marcadores de neuroinflamación

Actualmente, la evidencia sugiere que la neuroinflamación incide en el desarrollo cerebral durante períodos críticos perinatales y peripuberales, generando alteraciones en la sustancia blanca, fallas en la conectividad neuronal y por tanto podría desencadenar el inicio de síntomas psicóticos(29,30). Por lo tanto, se requieren herramientas para analizar la inflamación en SNC de una manera más eficiente. Un método descrito para visualizar neuroinflamación *in vivo*, es utilizar el radio-trazador ^{11}C -(R)-PK11195 en estudios de tomografía por emisión de positrones (PET), el cual es un marcador de la activación de la microglía(31). Efectivamente, estudios previos realizados con ^{11}C -(R)-PK11195, han demostrado mayores niveles de inflamación en el cerebro de personas con esquizofrenia en comparación con controles sanos(31,32). Por otro lado, la investigación de enfermedades neurológicas por medio de espectroscopía por resonancia magnética de protón (^1H -MRS), ha revelado que existe una asociación entre la neuroinflamación con activación glial y niveles elevados de algunos neurometabolitos como mio-inositol (mI), creatina total (tCr) y compuestos que contienen colina (Cho)(33).

Hipótesis

Las personas con un primer episodio de psicosis diferirán de los controles sanos, en cuanto a su perfil inflamatorio sistémico, así como en valores de mI y Cho en la corteza prefrontal medial, mostrando una tendencia hacia valores proinflamatorios. Se espera que dicha diferencia disminuya, o incluso revierta, posterior al tratamiento con antipsicótico.

Objetivo

Analizar el perfil inflamatorio sistémico y niveles de metabolitos relacionados con neuroinflamación, en sujetos con un primer episodio de psicosis antes y después del tratamiento, y en un grupo control sano.

Métodos

Diseño

Se trata de un estudio comparativo, abierto, antes y después en sujetos con un primer episodio de psicosis (PEP) sugestivo de esquizofrenia y controles sanos. Se estudiaron 48 individuos que cursaban al momento del muestreo con un PEP y 23 controles sanos (CS), de cualquier sexo, mayores de 15 años y con una escolaridad mínima de primaria. Los sujetos se captaron principalmente de la clínica de primer episodio psicótico y los departamentos de urgencias y neuropsiquiatría del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS). A manera de resumen visual, en la *Figura 1* se muestra un flujograma de las técnicas empleadas durante el presente protocolo.

Muestra

Se consideró que un tamaño de muestra mínimo de 20 personas por grupo, brindaría suficiente poder estadístico (0.80) para detectar diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) si el tamaño del efecto fuera de moderado a grande ($d = 0.5-0.8$). El tamaño de muestra total fue de 48 pacientes con PEP y 23 CS pareados por sexo y edad, a quienes se les realizó el perfil inflamatorio sistémico. A una submuestra de esta misma población, 27 sujetos y 17 controles, se les realizó además el estudio de resonancia magnética para la obtención de metabolitos cerebrales por espectroscopía.

Los sujetos del grupo de PEP debían cumplir con los criterios de algún trastorno psicótico no afectivo (trastorno psicótico breve, esquizofreniforme o esquizofrenia) de acuerdo a los criterios de la Asociación Psiquiátrica Americana(7) y corroborado con una entrevista estructurada para la evaluación clínica en psiquiatría, SCID-I(34). Como criterios de exclusión, se consideraron los siguientes: sujetos que, de acuerdo a la evaluación clínica o a exámenes de gabinete o laboratorio, presentaran evidencia de enfermedad médica que pudiera condicionar la presencia de síntomas psicóticos, que hubieran recibido tratamiento farmacológico específico para el manejo de estos síntomas, que presentaran abuso y/o dependencia a sustancias en los 3 meses previos al estudio (a excepción de nicotina y

cafeína), que utilizaran fármacos que pudieran condicionar cuadros psicóticos (e.g. esteroides, hormonas tiroideas) o que tuvieran implantes metálicos y/o marcapaso que imposibilitaran un estudio de imagen de resonancia magnética (IRM). Los pacientes con PEP fueron evaluados mediante IRM al momento de ser captados y antes de recibir tratamiento antipsicótico. Así mismo, se aplicó la Escala de Síntomas Positivos y Negativos de la Esquizofrenia (PANSS). Posterior a estas evaluaciones, se inició tratamiento con risperidona de manera abierta y con dosis inicial de 1mg y hasta 5mg al día, en un esquema de dosis flexible y de acuerdo a criterio clínico y respuesta clínica al tratamiento.

Marcadores de inflamación sistémica

Al momento del reclutamiento (basal) y un mes después del tratamiento antipsicótico, se obtuvieron 20ml de sangre periférica de cada sujeto. De la muestra, se aislaron células mononucleares (CMN) por gradiente de densidad después de su centrifugación con Ficoll-Paque (GE Healthcare scientific, Waltham Massachusetts, USA). Después de dos lavados con buffer fosfato salino (PBS) (Fisher scientific, Waltham Massachusetts, USA), se seleccionaron las células vivas utilizando el marcador de viabilidad Zombie Aqua (Biolegend, San Diego, California, USA). Posteriormente, se lavaron dos veces las células utilizando suero fetal bovino al 5% (FBS) (Fisher scientific, Waltham Massachusetts, USA) en PBS. Para la caracterización de inmunofenotipo, se marcaron las CMN con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromo: CD3-APC/Fire 750, CD19-APC, CD4-Alexa Fluor 488, CD8-PE/Dazzle 594, CD25-PE, FoxP3-Brilliant Violet 421, CD56-PE, NKp46-Brilliant Violet 605, CD14-PerCP, CD16-APC (todos de Biolegend, San Diego, California, USA). Para evaluar las subpoblaciones de CD4+ T colaboradores (*helper*, en inglés), se estimularon las CMN con 50ng/mL forbol miristato acetato (PMA), 1 μ /mL ionomicina (ambos de Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) y monensina (BD, Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) por 5 horas. Después de dos lavados con FBS al 5% en PBS, se fijaron y se permeabilizaron las células utilizando el kit cytofix/cytoperm (BD, Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) según las instrucciones del fabricante. Analizamos las siguientes citocinas intracitoplasmáticas con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromo: IFN- γ -APC, IL-4-PE, IL-17A-Brilliant Violet 421 (todos de Biolegend, San Diego, California, USA). Se

adquirieron un millón de eventos de todas las muestras en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD, Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Se cuantificaron las proporciones de las siguientes poblaciones celulares utilizando citometría de flujo: Células B (CD3⁻, CD19⁺), células T CD8⁺ (CD3⁺, CD8⁺), células T CD4⁺ (CD3⁺, CD4⁺), células T reguladoras (Tregs) (CD3⁺, CD4⁺, CD25^{hi}, FoxP3⁺), monocitos clásicos (CD14⁺, CD16⁻), monocitos intermedios (CD14⁺, CD16⁺), monocitos no clásicos (CD14⁺, CD16⁺⁺). Se definieron las células NK como CD3⁻, NKp46⁺, y posteriormente se dividieron en CD56^{hi} y CD56^{dim}. Se caracterizaron las proporciones de subpoblaciones T cooperadoras de la siguiente manera: Th1 (CD4⁺, IFN- γ ⁺), Th2 (CD4⁺, IL-4⁺), Th17 (CD4⁺, IFN-17A⁺), Th1/Th17 (CD4⁺, IFN- γ ⁺, IL-17A⁺). El análisis se realizó utilizando el programa FlowJo v10.8.1 para Mac OS X.

Se cultivaron dos millones de CMN durante 72 horas con y sin estimulación con 50ng/mL de PMA y 1 μ /mL de ionomicina. Después, se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 1600rpm. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Las concentraciones de IL17A, IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 se evaluaron en suero y en sobrenadantes de cultivo celular utilizando el kit human Th1/Th2/Th17 cytometric bead array (CBA) kit (BD, Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) acorde a las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron utilizando el programa FCAP array v3.0.

En todos los pacientes disponibles, se hicieron dos mediciones: antes y después del tratamiento antipsicótico. Todas las muestras de sangre se procesaron en laboratorios del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por personal ciego para el estatus clínico de las personas participantes en el estudio.

Metabolitos cerebrales

Los estudios de resonancia magnética se realizaron en el INNN en un escáner de tres teslas (Magnetom Skyra, Siemens, Alemania), utilizando una antena receptora de fase de 20 canales exclusiva para cráneo. Inicialmente, se obtuvo una adquisición rápida de alta resolución ponderada en T1 tridimensional magnetizada con eco de gradiente (MPRAGE

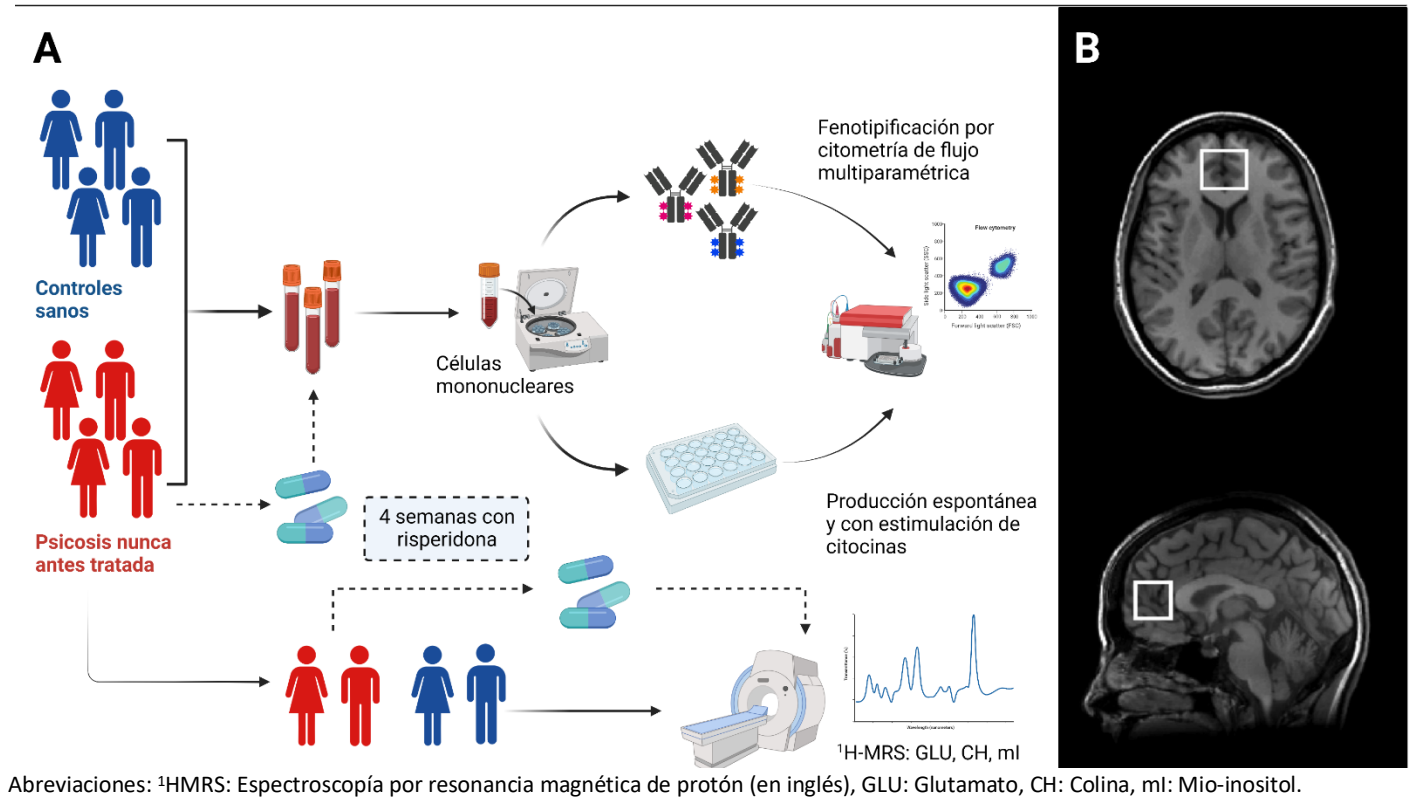
por sus siglas en inglés; TE = 5ms, TR = 12 ms, tiempo de inversión = 450 ms, ángulo de vuelta = 20°, FOV = 25.6cm, matrix 256 x 256, 186 cortes, grosor del corte = 1mm), orientada sobre y paralelo a la línea comisura anterior-comisura posterior. Para la adquisición de ¹H-MRS, la imagen estructural se reformateó a cortes sagital y coronal para el posicionamiento de voxeles. Para obtener el espectro ¹H-MRS, se realizó una espectroscopía PRESS (TE = 35 ms, TR = 2000 ms; ancho del espectro = 5000 Hz; se usaron 4096 puntos de datos; el promedio de agua suprimida fue 128 y el del agua no suprimida fue 16) en un voxel de 2.5 x 2.5 x 2.5 cm³ centrado de manera bilateral en la corteza medial prefrontal (porciones de las áreas de Broadmann 10, 24, 32, y la corteza del cíngulo anterior pregenual).

El espectro con agua suprimida se analizó utilizando LCModel versión 6.3-1L(35), el cual fue referenciado a la señal de agua no suprimida, y los metabolitos se expresaron en unidades institucionales. Un set basado en simulación de metabolitos (incluido en LCModel), consistente en L-alanina, aspartato, creatinina, grupo creatinina metileno, ácido y-aminobutírico, glucosa, glutamato, glutamina, glutatión, glicerofosfocolina, guanidinoacetato, L-lactato, mio-inositol, N-acetilaspártato, N-acetilaspártilglutamato, fosfocolina, fosfocreatina, scyllo-inositol, y taurina, así como lípidos (Lip), y macromoléculas (MM; Lip09, Lip13a, Lip13b, Lip20, MM09, MM12, MM14, MM17 y MM20) fue usado para análisis. Posteriormente, las imágenes ponderadas en T1 se usaron para localización del voxel y segmentación. Los voxeles fueron segmentados en sustancia gris, sustancia blanca y líquido cefalorraquídeo usando Statistical Parametric Mapping 8 (SPM8, Wellcome, Department of Imaging Neurosciences, University College London, UK). Los niveles del metabolito glutamato fueron después corregidos por proporción de tejido de sustancia gris, blanca y líquido cefalorraquídeo acorde a lo descrito por Gasparovic et al(36). Los valores de glutamato con un %DE del índice *Cramér-Rao Lower Bound* (CRLB) excediendo 20% de espectro con un ancho de banda a la mitad del máximo (FWHM, por sus siglas en inglés) excediendo 12Hz, como reportado por LCModel, se consideraron de mala calidad y se excluyeron para análisis posteriores.

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk), y en base a la distribución de los datos, se analizaron con pruebas paramétricas y no paramétricas. La comparación de características demográficas y clínicas de sujetos y controles sanos, se realizó mediante chi-cuadrada para variables categóricas y con t de Student o U de Mann-Whitney para las ordinales. Los datos se reportaron utilizando medias con desviación estándar, o medianas con rango intercuartil. Para el análisis del perfil inflamatorio sistémico y de neurometabolitos se utilizaron también pruebas de comparación de medias o medianas, t de Student o U de Mann-Whitney. La comparación de las variables en sujetos antes y después del tratamiento, se realizó mediante t pareada o prueba de Wilcoxon, dependiendo de la normalidad de los datos. Finalmente, se buscaron relaciones entre las variables del perfil inflamatorio sistémico y los valores de neurometabolitos de ^1H -MRS con correlaciones lineales de Pearson o Spearman. El nivel de significancia se estableció en un valor $p < 0.05$.

Figura 1. Metodología: (A) Flujograma de técnicas empleadas. (B) Posicionamiento del voxel en corteza prefrontal medial.



Resultados

Características demográficas y clínicas

Las características demográficas y clínicas de las personas que participaron en el estudio se muestran en la *Tabla 1*. No se encontraron diferencias significativas entre grupos para las variables de edad ($U = 521, P = .71$) y género ($X^2 = 1.80, P = .18$). Por otro lado, en el grupo de sujetos se encontró menor nivel educativo personal en comparación con controles (media 11.21, media controles 15.55, $t = 5.22, P < .001$), así como menor nivel educativo parental (media 9.23, media controles 12.73 $U = 326, P = .01$). La media de DUP en sujetos fue de 232 (± 415) semanas (rango 1-1729).

Los participantes finales del estudio fueron 48 sujetos y 23 controles, con una media de edad de 30-31 años, y del 40 al 57% mujeres, sin diferencias significativas en estas variables. El nivel educativo tanto de los sujetos como de sus padres, fue significativamente menor al del grupo control. La media de la duración de la psicosis no tratada (DUP) fue de 1 hasta 1729 semanas, con una media 232. Importante recalcar que es un rango amplio, con una media alta, sobre todo en comparación a estudios en pacientes *naïve* a tratamiento. La media del puntaje total de la PANSS fue de 107.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de participantes del estudio

Característica	Media (DE)		Estadística	Valor de <i>P</i>
	Sujetos (n=48)	Controles (n=23)		
Edad, años	30.7 (12.2)	31.6 (12.4)	U = 521	.71
Femenino, No. (%)	19 (.40)	13 (.57)	$\chi^2 = 1.80$.18
Nivel educativo, años	11.21 (3.48)	15.55 (2.58)	$t = 5.22$	<.001
Nivel educativo parental, años	9.23 (4.85)	12.73 (4.98)	U = 326	.01
DUP, media (DE) [rango], semanas	232 (415) [1-1729]	NA	NA	NA
PANSS puntaje total	107.1 (20.2)	NA	NA	NA
PANSS puntaje subescalas				
Síntomas positivos	28.98 (5.01)	NA	NA	NA
Síntomas negativos	25.68 (8.03)	NA	NA	NA
Psicopatología general	52.43 (10.75)	NA	NA	NA

Abreviaciones: DE, desviación estándar; DUP, duración de psicosis no tratada; PANSS, *Positive and Negative Syndrome Scale* (escala de síndromes positivos y negativos); NA, no aplica.

Función inmunológica alterada en primer episodio de psicosis

Se encontraron algunas diferencias en el perfil inflamatorio sistémico entre el grupo de sujetos con PEP y controles sanos (*Tabla 2*). El grupo de PEP mostró mayor proporción en el valor proinflamatorio de Th1/Th17 (mediana .265) comparado con CS (mediana .11; U=325, $P=.03$). El mismo grupo presentó un incremento en la producción espontánea de IL-6 (mediana 2340, CS mediana 2.695; U=193, $p=.02$), IL-2 (mediana 11.61, CS mediana 3.86; U=196, $p=.03$), e IL-4 (mediana 3.785, CS mediana 2.05, U=144, $P<.01$).

Perfil inflamatorio después del tratamiento antipsicótico

Posterior a las 4 semanas de recibir tratamiento con antipsicótico (i.e. risperidona), se observaron cambios significativos en ciertos marcadores de inflamación (*Tabla 3*). Se encontró un aumento en las poblaciones celulares de CD8 (medianas PRE vs POST, 21.75 vs 27.20, $t = 2.77$, $P = .01$) y CD4 (medianas PRE vs POST, 24 vs 29.20, $t = 3.05$, $P < .01$), así como en los niveles de TNF (medianas PRE vs POST, 7.66 vs 190.7, $W = -102$, $P = .04$). Por otro lado, se encontró una disminución significativa en los niveles de Th2 (medianas PRE vs POST, 2.91 vs 1.15, $W = 303$, $P<.01$).

Tabla 2. Perfil inflamatorio de sujetos con primer episodio de psicosis y controles sanos

Marcador inflamatorio	Sujetos Mediana (percentil 25 – percentil 75)	Controles Mediana (percentil 25 – percentil 75)	Psicosis vs Controles (P)
CD8 (%)	21.75 (14.55-26.55)	17.45 (14.30-22.80)	.10
CD4 (%)	24 (14.65-30.78)	28 (18.50-35.60)	.59
T regulators (%)	1.09 (0.37-2)	1.15 (0.54-1.67)	.86
Lymphocytes B (%)	12.90 (7.81-16.75)	9.86 (7.5-14.20)	.19
NK (%)	11.85 (7.99-14.08)	9.70 (6.12-12.87)	.30
CD56 High (%)	5.23 (3-8.56)	9.98 (5.29-18.09)	.01
CD56 Low (%)	94.70 (91.25-97)	89.88 (81.44-94.70)	.01
Classic Monocytes (%)	81.02 (77.96-86.10)	81.70 (69.60-88.13)	.38
Intermediate Monocytes (%)	6.70 (4.03-9.79)	7.31 (4.18-11)	.52
No Classic Monocytes (%)	6.88 (4.37-10.15)	6.71 (3.81-14.48)	.20
Th1 (%)	1.05 (0.39-7.26)	0.51 (0.23-1.64)	.18
Th2 (%)	2.91 (1.45-5.49)	2.55 (0.84-5.99)	.40
Th17 (%)	1.43 (0.54-2.68)	1.40 (0.13-2.98)	.89
Th1/Th17 (%)	0.60 (0.15-2.9)	0.11 (0.02-0.47)	.03
SNE IL6	6785 (1699-11673)	315.7 (0-6242)	<.01
SN IL6	402.4 (37.51-14592)	2.70 (0-12093)	.02
SNE IFNg	582.8 (19.57-2604)	1730 (631.2-5988)	.69
SN IFNg	7.61 (0-28.28)	0 (0-96.13)	.81
SNE TNF	74.18 (10.57-746.8)	57.69 (6.49-2113)	.60
SN TNF	7.66 (6.41-111.2)	5.25 (1.54-46.99)	.62
SNE IL4	41.48 (12.64-111.5)	50.29 (6.76-152.3)	.80
SN IL4	3.68 (3.15-7.74)	2.05 (0.32-3.29)	<.01
SNE IL10	10.53 (5.27-113.2)	25.50 (2.67-220.4)	.97
SN IL10	9.53 (7.87-195.2)	65.51 (7.44-948.5)	.67
SNE IL2	195 (12.72-4042)	1372 (245.1-10971)	.43
SN IL2	15.40 (4.75-35)	3.86 (0.35-17.60)	.03
SNE IL17	25.09 (10.07-63.18)	59.04 (14.59-940.3)	.47
SN IL17	13.57 (4.83-16.81)	5.35 (3.43-7.72)	.12

Abreviaciones: SNE, Sobrenadante con estimulación; SN, Sobrenadante.

Tabla 3. Perfil inflamatorio de sujetos con primer episodio de psicosis antes y después del tratamiento

Marcador inflamatorio	Previo al tratamiento	Posterior al tratamiento	Pre vs Post Tratamiento (P)
	Mediana (percentil 25 – percentil 75)	Mediana (percentil 25 – percentil 75)	
CD8 (%)	21.75 (14.55-26.55)	27.20 (21.25-31.23)	.01
CD4 (%)	24 (14.65-30.78)	29.20 (22.07-43.13)	<.01
T regulators (%)	1.09 (0.37-2)	1.19 (0.65-2.12)	.65
Lymphocytes B (%)	12.90 (7.81-16.75)	13.95 (12.39-15.10)	.91
NK (%)	11.85 (7.99-14.08)	14.05 (9.71-18.48)	.14
CD56 High (%)	5.23 (3-8.56)	3.68 (2.71-6.97)	.34
CD56 Low (%)	94.70 (91.25-97)	94.90 (89.93-97)	.83
Classic Monocytes (%)	81.02 (77.96-86.10)	81.60 (68.55-86.58)	.38
Intermediate Monocytes (%)	6.70 (4.03-9.79)	7.83 (5-15.78)	.12
No Classic Monocytes (%)	6.88 (4.37-10.15)	4.98 (3.51-9.08)	.08
Th1 (%)	1.05 (0.39-7.26)	1.76 (0.63-2.4)	.10
Th2 (%)	2.91 (1.45-5.49)	1.15 (0.74-2.31)	<.01
Th17 (%)	1.43 (0.54-2.68)	1.3 (0.59-3.28)	.42
Th1/Th17 (%)	0.60 (0.15-2.9)	0.84 (0.16-1.62)	.96
SNE IL6	6785 (1699-11673)	7358 (2834-29728)	.18
SN IL6	402.4 (37.51-14592)	5518 (1505-27094)	.09
SNE IFNg	582.8 (19.57-2604)	77.36 (11.39-916.6)	.21
SN IFNg	7.61 (0-28.28)	28.04 (7.63-127.8)	.25
SNE TNF	74.18 (10.57-746.8)	107.6 (7.22-1070)	.98
SN TNF	7.66 (6.41-111.2)	190.7 (8.91-3182)	.04
SNE IL4	41.48 (12.64-111.5)	57.76 (31.84-126)	.77
SN IL4	3.68 (3.15-7.74)	3.79 (3.28-4.54)	.60
SNE IL10	10.53 (5.27-113.2)	15.94 (2.46-219.2)	.62
SN IL10	9.53 (7.87-195.2)	57.74 (13.48-978.9)	.33
SNE IL2	195 (12.72-4042)	37.73 (7.49-3068)	.26
SN IL2	15.40 (4.75-35)	11.35 (4.27-39.34)	.92
SNE IL17	25.09 (10.07-63.18)	23.42 (5.7-102.5)	.77
SN IL17	13.57 (4.83-16.81)	14.90 (4.18-19.57)	.54

Abreviaciones: SNE, Sobrenadante con estimulación; SN, Sobrenadante.

Neuroinflamación en primer episodio de psicosis

Dentro de los resultados obtenidos por ¹H-MRS en condiciones basales (*Tabla 4*), se encontraron mayores niveles de colina en el grupo de personas con PEP en comparación con CS (media 1.69, media CS 1.37, $t = 2.72$, $P = <.01$). En los niveles de glutamato (mediana 8.46, mediana CS 7.15, $U = 151$, $P = .11$) y mio-inositol (4.72, mediana CS 4.21, $U = 202$, $P = .52$) no se encontraron diferencias significativas en comparación con CS. Más aún, en relación a los niveles de colina, la población de células T reguladoras correlacionó de manera directa ($r_{26} = .44$, $P = .02$), y los monocitos clásicos de manera inversa ($r_{26} = -.53$, $P < .01$), como puede observarse en la *Figura 2*.

Metabolitos cerebrales después del tratamiento antipsicótico

En comparación con condiciones pre-tratamiento, después de 4 semanas de recibir risperidona, se observaron menores niveles de glutamato (media 8.43 ± 1.83 , POST 7.58 ± 1.79 , $t = 1.82$, $P = .09$), colina (media $1.72 \pm .212$, POST $1.64 \pm .282$, $t = 1.50$, $P = .15$), y mio-inositol (mediana 4.81 [4.08-5.07], POST 4.72 [3.98-4.93], $W = 6$, $P = .92$). Sin embargo, ningún valor disminuyó de una manera estadísticamente significativa (*Tabla 4*).

Tabla 4. Neurometabolitos en sujetos con PEP y controles sanos

Metabolito	Sujetos Mediana (percentil 25 – percentil 75)	Controles Mediana (percentil 25 – percentil 75)	Sujetos vs Controles (P)
Glutamato	8.46 (7.52-9.27)	7.15 (4.68-9.12)	.11
Colina, media (±DE)	1.69 (±.22)	1.37 (±.56)	<.01
Mio-inositol	4.72 (4.11-5.11)	4.21 (3.62-5.39)	.52

Abreviaciones: DE, Desviación estándar.

Figura 2. Relación entre niveles basales de colina con (A) Linfocitos T reguladores, y (B) Monocitos clásicos

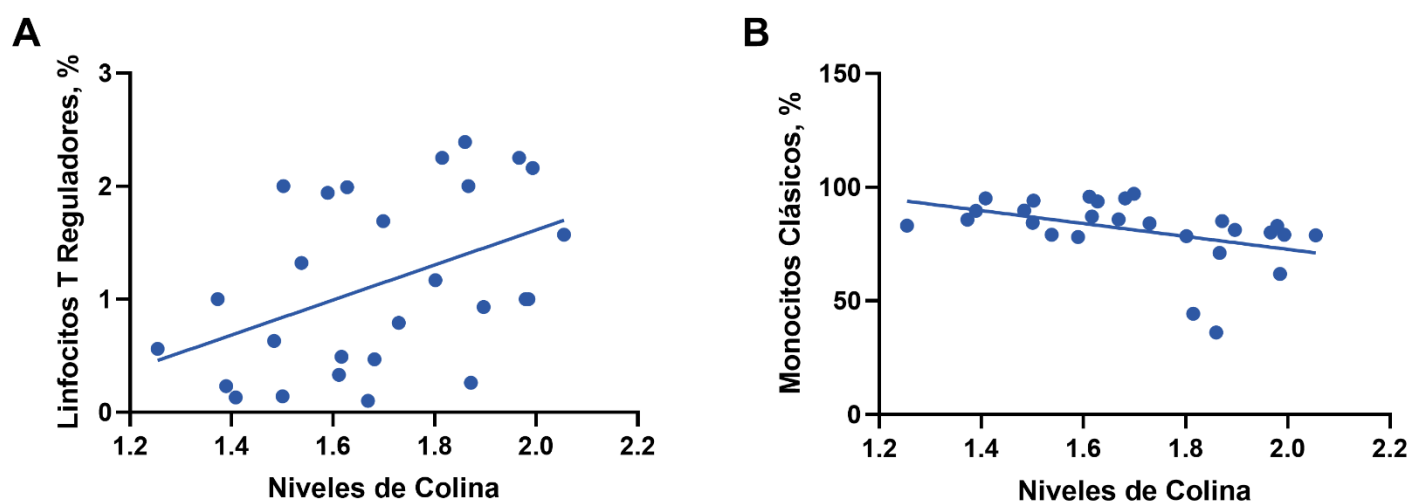


Tabla 5. Neurometabolitos en sujetos con PEP antes y después del tratamiento

Metabolito	Previo al tratamiento Mediana (percentil 25 – percentil 75)	Posterior al tratamiento Mediana (percentil 25 – percentil 75)	Pre vs Post Tratamiento (P)
Glutamato, media (±DE)	8.43 (±1.83)	7.58 (±1.79)	.09
Colina, media (±DE)	1.72 (±.212)	1.64 (±.282)	.15
Mio-inositol	4.81 (4.08-5.07)	4.72 (3.98-4.93)	.92

Abreviaciones: DE, desviación estándar.

Discusión

Predominio de respuesta Th2 en primer episodio de psicosis

En los resultados de los marcadores inflamatorios sistémicos, pudimos observar diferencias entre el grupo control y el grupo de PEP, el cual presentó una respuesta predominantemente Th2. En relación a los valores elevados de CD56^{low} encontrados en PEP, se ha demostrado que las células NK adquieren dicho fenotipo citotóxico en contexto de IL-2 e IL-4, y promueven una respuesta Th2 (37). Es interesante que también se han encontrado mayores niveles de Th1/Th17 en el grupo de PEP, porque se ha visto que estas subpoblaciones celulares que promueven un estado pro inflamatorio, podrían contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes como la encefalomiелitis o la esclerosis múltiple(38). De hecho, se ha postulado que las infecciones perinatales alteran el desarrollo fetal cerebral y aumentan el riesgo de esquizofrenia a través de producción de IL-6, la cual induce la diferenciación de células Th17, que a su vez podrían tener una respuesta amplificada en el contexto de hiperactividad dopaminérgica(39).

Precisamente, la IL-6 fue una de las citocinas que su producción espontánea se encontró aumentada en las células cultivadas de muestras obtenidas del grupo PEP, lo cual concuerda con lo reportado consistentemente en la literatura(17). Más aún, los niveles séricos aumentados de IL-6 a los 9 años de edad se han asociado a un riesgo dos veces mayor para desarrollar un trastorno psicótico a los 18 años(40). También se encontraron niveles aumentados de IL-4, la cual es producto de una respuesta Th2(14,38), y es una citocina que se ha encontrado aumentada en líquido cefalorraquídeo de jóvenes con esquizofrenia(12). El comportamiento de la IL-2 en esquizofrenia no ha sido consistente en la literatura actual (17). En estudios realizados por medio de cultivo celular en pacientes con esquizofrenia libres de tratamiento, se han reportado menores niveles de producción de IL-2(41), pero también niveles aumentados(42), tal como fue el caso en el presente proyecto. Interesantemente, algunos autores han asociado mayores niveles de esta interleucina con mejores rendimientos en pruebas cognitivas en pacientes crónicos con esquizofrenia resistente a tratamiento, sugiriendo un posible efecto neuroprotector(43).

Existe una relación entre inflamación sistémica y neuroinflamación

Dentro de los datos obtenidos por espectroscopía se pudo observar que el grupo de PEP presentó mayores niveles de colina, un posible marcador de neuroinflamación. El pico en espectroscopía de compuestos que contienen colina es un marcador de metabolismo, densidad y proliferación celular(33,44). La colina, encontrada de dos a tres veces más en la glía que en las neuronas(45,46), se ha asociado con neuroinflamación(33), encontrándose incrementada en padecimientos neurodegenerativos con gliosis(46). Acorde a nuestros hallazgos, un reciente estudio encontró que personas con un primer episodio psicótico sin tratamiento previo, tenían mayores niveles de Cho y MI, este último correlacionando de manera directa con síntomas positivos(47). Más aún, en línea con nuestros resultados de marcadores sistémicos, el balance Th1/Th2 se asocia a la activación de astrocitos y microglía, y parece ser un determinante clave para regular la magnitud y duración de la inflamación en sistema nervioso central(48).

Explorando correlaciones de marcadores sistémicos de inflamación con neurometabolitos, se encontró correlación de colina con linfocitos T reguladores y con monocitos clásicos, de manera positiva y negativa respectivamente. Una de las funciones más estudiadas actualmente de los linfocitos T reguladores es la supresión inmunológica en el microambiente tumoral(49,50). Actualmente se ha demostrado que los linfocitos T reguladores tienen la habilidad de promover reparación y regeneración de tejido, ejerciendo control sobre la función inmune tanto adaptativa como innata(51). Su correlación positiva encontrada con colina, podría explicarse en el contexto de una respuesta para intentar modular la inflamación mediante neutralización de citocinas inflamatorias (e.g. IL-6), siendo esta una función ya descrita(51). Sin embargo, debido a que la metodología del estudio no fue dirigida a esto, es meramente especulativo y se requieren más estudios para explorar la naturaleza de dicha relación.

Función inmunológica mejorada con el tratamiento antipsicótico

Dentro de los cambios significativos que se documentaron después de 4 semanas con tratamiento antipsicótico, se observó que el porcentaje de la subpoblación de linfocitos CD4 aumentó. Steiner y colaboradores, ya habían encontrado previamente un incremento en células T totales y linfocitos T CD4+ posterior a 6 semanas de tratamiento antipsicótico(52), lo cual se ha propuesto como mecanismo neuroprotector(53). Asimismo, encontramos que el porcentaje de la subpoblación Th2 disminuyó de manera significativa con el tratamiento. Esto podría sugerir un posible efecto inmunomodulador en el tipo de actividad que encontramos alterada en pacientes con psicosis antes de recibir el tratamiento. En cuanto a producción de citocinas *in vitro*, se encontraron mayores niveles de TNF a las 2 semanas de recibir risperidona. Anteriormente, se ha encontrado un incremento en TNF sérico en pacientes con esquizofrenia posterior al tratamiento con clozapina (54). Adicionalmente, y en acuerdo con nuestros resultados, un estudio con la línea celular SW872 que expresa el receptor dopaminérgico D2, encontró también mayor producción de TNF después de la estimulación *in vitro* con risperidona(55). El hallazgo en el presente estudio puede sugerir una optimización de la respuesta inmunológica de los pacientes, aunque las repercusiones clínicas que esto pudiera generar quedan como una interesante pregunta para futuras investigaciones.

Conclusiones

Personas con un primer episodio psicótico que nunca han recibido tratamiento antipsicótico presentan una desregulación inmunológica que afecta la respuesta inmune innata y adaptativa. Estos pacientes se caracterizan por presentar una respuesta pro inflamatoria en comparación con controles sanos, con una predominante respuesta Th2, la cual es modificable con el tratamiento antipsicótico. Finalmente, los altos niveles de colina presentes en PEP pueden indicar presencia de neuroinflamación, lo cual es congruente y se relaciona con los marcadores inflamatorios sistémicos.

Referencias

1. Warner R, de Girolamo G. Epidemiology of mental disorders and psychosocial problemas Schizophrenia. World Health Organization; 1995. 139 p.
2. Nicolini H. Estudio del primer episodio de psicosis y sus fases prodrómicas. Gaceta Médica de México [Internet]. 2009;146(2):79–80. Available from: www.anmm.org.mx
3. Charlson FJ, Ferrari AJ, Santomauro DF, Diminic S, Stockings E, Scott JG, et al. Global epidemiology and burden of schizophrenia: Findings from the global burden of disease study 2016. Schizophrenia Bulletin. 2018 Oct 17;44(6):1195–203.
4. Chong HY, Teoh SL, Wu DBC, Kotirum S, Chiou CF, Chaiyakunapruk N. Global economic burden of schizophrenia: A systematic review. Vol. 12, Neuropsychiatric Disease and Treatment. Dove Medical Press Ltd; 2016. p. 357–73.
5. Arredondo A, Díaz-Castro L, Cabello-Rangel H, Arredondo P, Recaman AL. Análisis de costos de atención médica para esquizofrenia y depresión en México para el periodo 2005-2013. Cadernos de Saude Publica. 2018;34(1).
6. Lieberman JA, First MB. Psychotic Disorders. Ropper AH, editor. New England Journal of Medicine [Internet]. 2018 Jul 19;379(3):270–80. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1801490>
7. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision. Washington, DC; 2022.
8. Plitman E, Nakajima S, de la Fuente-Sandoval C, Gerretsen P, Chakravarty MM, Kobylanski J, et al. Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: A review. Vol. 24, European Neuropsychopharmacology. Elsevier B.V.; 2014. p. 1591–605.
9. Konradi C, Yang CK, Zimmerman EI, Lohmann KM, Gresch P, Pantazopoulos H, et al. Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia. Schizophrenia Research. 2011 Sep;131(1–3):165–73.

10. Dietz AG, Goldman SA, Nedergaard M. Glial cells in schizophrenia: a unified hypothesis. Vol. 7, *The Lancet Psychiatry*. Elsevier Ltd; 2020. p. 272–81.
11. Müller N. Inflammation in schizophrenia: Pathogenetic aspects and therapeutic considerations. *Schizophrenia Bulletin*. 2018 Aug 20;44(5):973–82.
12. Muller N, J. Schwarz M. The Role of Immune System in Schizophrenia. *Current Immunology Reviews*. 2010 Aug 1;6(3):213–20.
13. Khandaker GM, Zimbron J, Dalman C, Lewis G, Jones PB. Childhood infection and adult schizophrenia: A meta-analysis of population-based studies. *Schizophrenia Research*. 2012 Aug;139(1–3):161–8.
14. Upthegrove R, Barnes NM. The immune system and schizophrenia: an update for clinicians. *Advances in Psychiatric Treatment*. 2014 Mar 2;20(2):83–91.
15. Smith RS, Maes M. The macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia: Additional evidence. *Medical Hypotheses*. 1995 Aug;45(2):135–41.
16. Upthegrove R, Manzanares-Teson N, Barnes NM. Cytokine function in medication-naive first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research*. 2014;155(1–3):101–8.
17. 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 1;70(7):663–71.
18. Schwarcz R, Stone TW. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*. 2017 Jan;112:237–47.
19. Schwarz MJ, Müller N, Riedel M, Ackenheil M. The Th2-hypothesis of schizophrenia: a strategy to identify a subgroup of schizophrenia caused by immune mechanisms. *Medical Hypotheses*. 2001 Apr;56(4):483–6.

20. Kim YK, Kim L, Lee MS. Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. *Schizophrenia Research*. 2000 Sep;44(3):165–75.
21. Cazzullo CL, Sacchetti E, Galluzzo A, Panariello A, Colombo F, Zagliani A, et al. Cytokine profiles in drug-naive schizophrenic patients. *Schizophrenia Research*. 2001 Mar;47(2–3):293–8.
22. Kim YK, Myint AM, Lee BH, Han CS, Lee HJ, Kim DJ, et al. Th1, Th2 and Th3 cytokine alteration in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2004 Nov;28(7):1129–34.
23. García-Bueno B, Bioque M, Mac-Dowell KS, Barcones MF, Martínez-Cengotitabengoa M, Pina-Camacho L, et al. Pro-/Anti-inflammatory Dysregulation in Patients With First Episode of Psychosis: Toward an Integrative Inflammatory Hypothesis of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2014 Mar;40(2):376–87.
24. Doorduyn J, de Vries EFJ, Willemsen ATM, de Groot JC, Dierckx RA, Klein HC. Neuroinflammation in Schizophrenia-Related Psychosis: A PET Study. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009 Nov;50(11):1801–7.
25. Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2009 Jun;63(3):257–65.
26. Bloomfield PS, Selvaraj S, Veronese M, Rizzo G, Bertoldo A, Owen DR, et al. Microglial Activity in People at Ultra High Risk of Psychosis and in Schizophrenia: An [¹¹C]PBR28 PET Brain Imaging Study. *American Journal of Psychiatry*. 2016 Jan;173(1):44–52.
27. Glausier JR, Lewis DA. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience*. 2013 Oct;251:90–107.
28. Garver DL, Tamas RL, Holcomb JA. Elevated interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of a previously delineated schizophrenia subtype. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Aug;28(8):1515–20.

29. Barron H, Hafizi S, Andrezza A, Mizrahi R. Neuroinflammation and Oxidative Stress in Psychosis and Psychosis Risk. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Mar 17;18(3):651.
30. Najjar S, Pearlman DM. Neuroinflammation and white matter pathology in schizophrenia: systematic review. *Schizophrenia Research*. 2015 Jan;161(1):102–12.
31. Doorduyn J, de Vries EFJ, Willemsen ATM, de Groot JC, Dierckx RA, Klein HC. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: A PET study. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009 Nov 1;50(11):1801–7.
32. van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitmaker A, Caspers E, et al. Microglia Activation in Recent-Onset Schizophrenia: A Quantitative (R)-[11C]PK11195 Positron Emission Tomography Study. *Biological Psychiatry*. 2008 Nov 1;64(9):820–2.
33. Chang L, Munsaka SM, Kraft-Terry S, Ernst T. Magnetic resonance spectroscopy to assess neuroinflammation and neuropathic pain. Vol. 8, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013. p. 576–93.
34. Spitzer RL, Williams JBW. Revised diagnostic criteria and a new structured Interview for diagnosing anxiety disorders. Vol. 22, *J. psychi&. Res*. 1988.
35. Provencher SW. Automatic quantitation of localized *in vivo* ¹H spectra with LCModel. *NMR in Biomedicine*. 2001 Jun;14(4):260–4.
36. Gasparovic C, Song T, Devier D, Bockholt HJ, Caprihan A, Mullins PG, et al. Use of tissue water as a concentration reference for proton spectroscopic imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2006 Jun;55(6):1219–26.
37. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death & Differentiation*. 2008 Feb 1;15(2):226–33.

38. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cellular & Molecular Immunology*. 2010 May 12;7(3):182–9.
39. Debnath M, Berk M. Th17 Pathway-Mediated Immunopathogenesis of Schizophrenia: Mechanisms and Implications. *Schizophrenia Bulletin*. 2014 Nov 1;40(6):1412–21.
40. Khandaker GM, Pearson RM, Zammit S, Lewis G, Jones PB. Association of Serum Interleukin 6 and C-Reactive Protein in Childhood With Depression and Psychosis in Young Adult Life. *JAMA Psychiatry*. 2014 Oct 1;71(10):1121.
41. Na KS, Kim YK. Monocytic, Th1 and Th2 Cytokine Alterations in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2007;56(2–3):55–63.
42. O'Donnell MC, Catts S v., Ward PB, Liebert B, Lloyd A, Wakefield D, et al. Increased production of interleukin-2 (IL-2) but not soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in unmedicated patients with schizophrenia and schizophreniform disorder. *Psychiatry Research*. 1996 Dec;65(3):171–8.
43. Asevedo E, Rizzo LB, Gadelha A, Mansur RB, Ota VK, Berberian AA, et al. Peripheral interleukin-2 level is associated with negative symptoms and cognitive performance in schizophrenia. *Physiology & Behavior*. 2014 Apr;129:194–8.
44. Malhi GS, Valenzuela M, Wen W, Sachdev P. Magnetic Resonance Spectroscopy and its Applications in Psychiatry. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2002 Feb 17;36(1):31–43.
45. Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR Studies on the Energy Metabolism of Glial and Neuronal Cells. *Developmental Neuroscience*. 1993;15(3–5):289–98.
46. Bustillo JR. Use of proton magnetic resonance spectroscopy in the treatment of psychiatric disorders: a critical update. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2013 Sep 30;15(3):329–37.

47. Plitman E, de la Fuente-Sandoval C, Reyes-Madrigal F, Chavez S, Gómez-Cruz G, León-Ortiz P, et al. Elevated myo-inositol, choline, and glutamate levels in the associative striatum of antipsychotic-naive patients with first-episode psychosis: A proton magnetic resonance spectroscopy study with implications for glial dysfunction. *Schizophrenia Bulletin*. 2016 Mar 1;42(2):415–24.
48. Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology Today*. 2000 Mar;21(3):141–7.
49. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2006 Apr 1;6(4):295–307.
50. Grover P, Goel PN, Greene MI. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Frontiers in Immunology*. 2021 Oct 5;12.
51. Li J, Tan J, Martino MM, Lui KO. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Frontiers in Immunology*. 2018 Mar 23;9.
52. Steiner J, Jacobs R, Panteli B, Brauner M, Schiltz K, Bahn S, et al. Acute schizophrenia is accompanied by reduced T cell and increased B cell immunity. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2010 Oct 27;260(7):509–18.
53. Byram SC. CD4-Positive T Cell-Mediated Neuroprotection Requires Dual Compartment Antigen Presentation. *Journal of Neuroscience*. 2004 May 5;24(18):4333–9.
54. Pollmacher T, Hinze-Selch D, Mullington J. Effects of Clozapine on Plasma Cytokine and Soluble Cytokine Receptor Levels. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1996 Oct;16(5):403–9.
55. Feiner B, Chase KA, Melbourne JK, Rosen C, Sharma RP. Risperidone effects on heterochromatin: the role of kinase signaling. *Clinical and Experimental Immunology*. 2019 Mar 18;196(1):67–75.