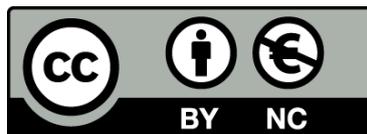




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Modelos experimentales aplicados al estudio de la eficacia y la seguridad de los antipsicóticos

Albert Martínez Pinteño



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**

TESIS DOCTORAL

MODELOS EXPERIMENTALES APLICADOS AL ESTUDIO DE LA EFICACIA Y LA SEGURIDAD DE LOS ANTIPSICÓTICOS

Albert Martínez-Pinteño

Directoras de tesis:

Dra. Patricia Gassó Astorga y Dra. Natalia Rodríguez Ferret

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2022



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Modelos experimentales aplicados al estudio de la eficacia y la seguridad de los antipsicóticos

Memoria de tesis doctoral presentada por

Albert Martínez Pinteño

para optar al grado de doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por:

Dra. Patricia Gassó Astorga ^{1,2,3}

Dra. Natalia Rodríguez Ferret ^{1,2}

¹Departamento de Fundamentos Clínicos, Unidad de Farmacología, Universitat de Barcelona, Barcelona, España. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Departamento de Fundamentos Clínicos

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universitat de Barcelona

Mayo, 2022



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Modelos experimentales aplicados al estudio de la eficacia y la seguridad de los antipsicóticos

Memoria de tesis doctoral presentada por

Albert Martínez Pinteño

para optar al grado de doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por:

Dra. Patricia Gassó Astorga ^{1,2,3}

Dra. Natalia Rodríguez Ferret ^{1,2}

¹Departamento de Fundamentos Clínicos, Unidad de Farmacología, Universitat de Barcelona, Barcelona, España. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Departamento de Fundamentos Clínicos

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universitat de Barcelona

Mayo, 2022

Directora

Dra. Patricia Gassó

Astorga

Directora

Dra. Natalia Rodríguez

Ferret

Autor

Albert Martínez

Pinteño

A mi familia,
los que estuvieron y los que están.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a la Dra. Amàlia Lafuente, por la confianza que me diste desde el primer día y a lo largo de todos estos años. Por permitirme formar parte de este equipo, por la ayuda ofrecida, y las oportunidades dadas. Sin ellas esto no habría sido posible.

En segundo lugar, a mis directoras de tesis: la Dra. Natalia Rodríguez y la Dra. Patricia Gassó, ellas sin duda son un referente de entrega en el trabajo, gracias por los conocimientos, por la ayuda y por los consejos que siempre me habéis dado.

También agradecer al director en la sombra, el Dr. Sergi Mas. Por su dedicación y cercanía, haciendo que el trabajo sin duda sea más sencillo.

Agradecer a Juan Sánchez y al Dr. Frederic Mármol por la ayuda incondicional en mis primeros pasos en el laboratorio de la unidad. Por confiar en un psicólogo al que le gustaba la investigación de poyata.

Al Dr. Eduard Parellada por ser tan accesible y poder compartir proyectos con vosotros. Gracias por la oportunidad de trabajar con la Unidad de Psiquiatría del Hospital Clínic.

Al Dr. Carles Sindreu por responderme aquel correo a las 12 de la noche, que hizo que pudiera comenzar mis prácticas en la Universidad de Barcelona.

Por los compañeros que han formado parte del equipo y que hemos compartido estos años, Daniel, Tere, Miguel, Christielly y Ester, por su locura que se echa de menos.

Y a mis compañeros de laboratorio actuales Àlex, Lluçia y la Dra. Constanza Morén, por el apoyo y por estar. Gracias por esperarme siempre para comer.

A las adoptadas oficiales, Dra. Gisela Mezquida y Ana Meseguer, ha sido un placer encontraros en el camino.

También al equipo del estabulario, Ignacio, David, Loli, Garikoitz, Pep, Lara, Sergi y Raquel por las horas dedicadas y por facilitarme el trabajo.

A todos mis amigos, especialmente a Aleix, Sergio, Joan, Xus, Adri, Lara, Roger, Jose Luis y Xavi por estar siempre ahí, por los momentos divertidos y por poder contar con vosotros.

A mi familia, en especial a mi padre, Pedro, porque sé que estés donde estés te haría orgulloso. Me lo diste todo y me lo sigues dando.

A mi madre, Emilia, por quererme tanto y preguntarme cada día por la tesis. Por tus refranes inagotables, preocuparte e interesarte.

A mi hermano, Javi, por estar y poder contar siempre contigo. También, por hacerme tío y padrino de Adelia.

A mi compañera de vida, Raquel, por aguantarme durante todos estos años y ser mi apoyo diario, te quiero.

A Gala, mi hija, por venir y cambiar mi mundo.

Esta tesis es por y para todos vosotros.

*Tal vez la felicidad sea esto:
no sentir que debes estar en otro lado,
haciendo otra cosa, siendo alguien más.*

Isaac Asimov (1920 - 1992)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

GLOSARIO.....	5
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.....	7
PREFACIO	9
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Esquizofrenia	17
1.1.1. Definición de la esquizofrenia	17
1.1.2. Epidemiología, características clínicas y diagnóstico de la esquizofrenia	17
1.1.3. Etiopatogenia de la esquizofrenia	22
1.1.4. Factores de riesgo	29
1.2. Farmacología de la esquizofrenia.....	34
1.2.1. Antipsicóticos de primera y segunda generación	34
1.2.2. Mecanismos de acción.....	34
1.2.3. Eficacia de los antipsicóticos.....	40
1.2.4. Efectos secundarios de los antipsicóticos	41
1.3. Modelos experimentales en la esquizofrenia.....	44
1.3.1. Investigación clínica	45
1.3.2. Modelos experimentales <i>in vitro</i>	47
1.3.3. Modelos experimentales <i>in vivo</i>	50
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
2.1. Hipótesis	59
2.2. Objetivos.....	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
3.1. Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (<i>Estudio 1</i>) ...	65

3.1.1.	Animales de experimentación y fármacos utilizados	65
3.1.2.	Evaluación metabólica en ratones	65
3.1.3.	Análisis de expresión génica en ratones	66
3.1.4.	Cohorte de pacientes con un PEP.....	67
3.1.5.	Evaluación metabólica en los pacientes con un PEP	68
3.1.6.	Análisis de expresión génica predicha en los pacientes con un PEP.....	68
3.1.7.	Análisis estadístico	69
3.2.	Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (<i>Estudios 2, 3 y 4</i>)..	69
3.2.1.	Estudio <i>in vitro</i> : modelo celular (<i>Estudio 2</i>)	69
3.2.2.	Estudio <i>in vivo</i> : modelo animal (<i>Estudios 3 y 4</i>).....	73
3.2.3.	Análisis estadístico (<i>Estudios 2, 3 y 4</i>)	78
4.	RESULTADOS.....	81
4.1.	Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (<i>Estudio 1</i>) ...	81
4.1.1.	EP300 y desregulación metabólica inducida por antipsicóticos (<i>Estudio 1</i>)	81
4.2.	Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (<i>Estudios 2, 3 y 4</i>)	107
4.2.1.	Estudio <i>in vitro</i> : modelo celular (<i>Estudio 2</i>)	107
4.2.2.	Estudio <i>in vivo</i> : modelo animal tratado en la adultez (<i>Estudio 3</i>).....	123
4.2.3.	Estudio <i>in vivo</i> : modelo animal tratado en una etapa precoz (<i>Estudio 4</i>)	147
5.	DISCUSIÓN	177
5.1.	Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (<i>Estudio 1</i>) .	177
5.2.	Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (<i>Estudios 2, 3 y 4</i>)	182
5.3.	Limitaciones y puntos fuertes	193
6.	CONCLUSIONES	199
7.	BIBLIOGRAFÍA	203

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS

Figura 1. Inicio y progresión de la esquizofrenia.	20
Figura 2. Vías dopaminérgicas y su relación con la esquizofrenia.	24
Figura 3. Integración de las teorías etiopatogénicas de la esquizofrenia.	28
Figura 4. Riesgo genético de sufrir esquizofrenia de un individuo en función del parentesco que tenga con un paciente afectado.	30
Figura 5. Modelo de microcircuito subyacente a la hipótesis de la hipofunción del receptor NMDA de la esquizofrenia.	39
Figura 6. Protocolo experimental del modelo animal del <i>Estudio 1</i>	65
Figura 7. Protocolo experimental del modelo celular del <i>Estudio 2</i>	70
Figura 8. Protocolo experimental del modelo animal del <i>Estudio 3</i>	73
Figura 9. Protocolo experimental del modelo animal del <i>Estudio 4</i>	74
Cuadro 1. Criterios diagnósticos de la esquizofrenia según el DSM-5 TM	21
Tabla 1. Perfil de unión al receptor y riesgo metabólico de los fármacos antipsicóticos.	38

GLOSARIO

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP	Antipsicótico
ARN	Ácido Ribonucleico
CPF	Corteza Prefrontal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition</i>
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition</i>
EP300	E1A proteína de unión a p300
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Giro Dentado
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
HP β CD	Hidroxipropil- β -Ciclodextrina
JNJ	JNJ-46356479
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LSD	Ácido D-lisérgico
MAP	Modulador Alostérico Positivo
MGLU	Metabotrópico de Glutamato
MK-801	Dizocilpina
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEP	Primer episodio psicótico
PRS	<i>Polygenic Risk Score</i>
PV	Parvalbúmina
SNP	Polimorfismo de una sola base (<i>Single Nucleotid Polimorfism</i>)
WGCNA	<i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i>

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

La esquizofrenia es un trastorno mental grave en la que intervienen diversos factores y se caracteriza por una amplia variabilidad de causas y síntomas. Provoca alteraciones del pensamiento, de la percepción, de las emociones y de la conducta, además tiene una tendencia progresiva. Es una enfermedad que afecta a gente joven ya que suele aparecer al final de la adolescencia o entre los 20 y 30 años de edad.

Las personas que padecen esquizofrenia sufren un deterioro de su calidad de vida, a nivel personal, familiar, educativo, social y laboral. El tratamiento de la esquizofrenia es combinado, individualizado y continuado, donde la piedra angular es el tratamiento farmacológico con antipsicóticos. Los que disponemos en la actualidad son eficaces y seguros, especialmente en revertir los síntomas positivos y prevenir recaídas. No obstante, no afectan por igual a todas las personas y conllevan efectos adversos que implican la pérdida de adherencia al tratamiento, con el riesgo de provocar una posible recaída. Además, tienen una eficacia limitada para la sintomatología negativa y cognitiva. Por tanto, resulta primordial llevar a cabo estudios que permitan predecir los efectos adversos de los antipsicóticos y estudiar la eficacia de nuevas moléculas que podrían mejorar el tratamiento de esta enfermedad.

Por ello, en la presente tesis doctoral se pretende, por un lado, descubrir los mecanismos moleculares subyacentes e identificar los genes clave involucrados en los efectos metabólicos inducidos por antipsicóticos, en concreto risperidona y olanzapina, dos de los fármacos más utilizados en la práctica clínica. Por otro lado, se pretende evaluar *in vitro* la actividad neuroprotectora y antiapoptótica del JNJ-46356479, un modulador alostérico positivo de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 2, así como su capacidad de revertir las alteraciones neuropatológicas y conductuales en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante administración postnatal de ketamina.

Los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados o se encuentran en vías de publicación en revistas científicas de alto impacto en el campo de la farmacología y la psiquiatría.

PREFACIO

La presente tesis doctoral es el resultado del trabajo realizado por el doctorando en la unidad de Farmacología del Departamento de Fundamentos Clínicos, en la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Barcelona, dentro del Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional. Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda de personal investigador predoctoral en formación (APIF) de la Universidad de Barcelona, así como a la financiación obtenida del Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (PI16/01222), del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (PI18/1005), con fondos FEDER-Unión Europea y la financiación de la Beca Pons Balmes (FCRB_PB_2018). Los grupos participantes fueron reconocidos por parte de la “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca” (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya (2017 SGR 1562 Grupo de Farmacología y Farmacogenética, 2017 SGR 1355 Grupo de Esquizofrenia Clínico y 2017 SGR 881 Grupo de Investigación en Psiquiatría y Psicología Infantil Clínico).

La presente tesis se presenta en formato de compendio de artículos. Consta de 2 objetivos principales y 4 artículos publicados o en proceso de publicación en revistas de alto impacto en el campo de la farmacología y la psiquiatría. A continuación, se expone el listado de artículos que componen la tesis actual.

Estudio 1 (EP300 y desregulación metabólica inducida por antipsicóticos)

Martínez-Pinteño A*, Gassó P*, Prohens L, Segura AG, Parellada M, Saiz-Ruiz J, Cuesta MJ, Bernardo M, Lafuente A, Mas S, Rodríguez N. **Identification of EP300 as a key gene involved in antipsychotic-induced metabolic dysregulation based on integrative bioinformatics analysis of multi-tissue gene expression data.** *Frontiers in Pharmacology*. 2021; 12: 729474

DOI: 10.3389/fphar.2021.729474

Factor de impacto: 5,811

Cuartil y área: 1^{er} Cuartil del área científica Pharmacology & Pharmacy 40/276

Estudio 2 (*Estudio in vitro: modelo celular*)

Gassó P*, **Martínez-Pinteño A***, Rodríguez N, Madero S, Gómez M, Segura AG, García-Rizo C, Morén C, Mas S, Parellada E. **Neuroprotective effect of the positive allosteric modulator of the mGluR2 JNJ-46356479 in human neuroblastoma cell cultures.** *International Journal of molecular Science*. 2022 (En revisión)

Factor de impacto: 5,924

Cuartil y área: 1^{er} Cuartil del área científica Biochemistry & Molecular Biology 67/295

Estudio 3 (*Estudio in vivo: modelo animal tratado en la adultez*)

Martínez-Pinteño A*, García-Cerro S*, Mas S, Torres T, Boloc D, Rodríguez N, Lafuente A, Gassó P, Arnaiz JA, Parellada E. **The positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor JNJ-46356479 partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviors in a postnatal ketamine mice model.** *Journal of Psychiatric Research*. 2020; 126: 8-18.

DOI: 10.1016/j.jpsychires.2020.04.005

Factor de impacto: 4,791

Cuartil y área: 1^{er} Cuartil del área científica Psychiatry 26/144

Estudio 4 (*Estudio in vivo: modelo animal tratado en una etapa precoz*)

Martínez-Pinteño A*, Rodríguez N*, Madero S, Gómez M, Prohens L, García-Rizo C, Mas S, Consanza M, Parellada E, Gassó P. **Early treatment with JNJ-46356479, a mGluR2 modulator, improves social and cognitive deficits in a postnatal ketamine mice model of schizophrenia.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* (En revisión).

Factor de impacto: 6,529

Cuartil y área: 1^{er} Cuartil del área científica Pharmacology & Pharmacy.

RESUMEN

La esquizofrenia es un trastorno psicótico grave con una prevalencia aproximada del 0,75% que se caracteriza por la presencia de síntomas positivos, negativos y déficits cognitivos. La enfermedad se inicia con una fase prodrómica donde los individuos presentan síntomas subclínicos que evidencian el deterioro funcional. El primer episodio psicótico (PEP) generalmente ocurre entre el final de la adolescencia y el principio de la edad adulta. Una vez diagnosticada sigue un curso fluctuante dando lugar a crisis psicóticas. En cuanto al tratamiento, los antipsicóticos son la única clase de fármacos con eficacia comprobada. No obstante, estos fármacos resultan ineficaces en el tratamiento de algunos de los síntomas de la enfermedad, como los síntomas negativos y los déficits cognitivos. Además, el uso de antipsicóticos conduce a la aparición de efectos adversos en algunos pacientes, entre los que destaca el síndrome metabólico. En la actualidad, no conocemos los mecanismos por los cuales algunos antipsicóticos inducen estas alteraciones metabólicas.

Dado que el tratamiento actual con antipsicóticos presenta efectos secundarios y su efectividad se reduce al control de síntomas positivos, se están desarrollando nuevos fármacos. En base a la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia, el JNJ-46356479 (JNJ), un modulador alostérico positivo de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 2, podría resultar eficaz en el tratamiento de este trastorno.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en la aparición del síndrome metabólico inducido por antipsicóticos con el fin último de identificar marcadores predictivos de este efecto adverso, así como evaluar la eficacia del JNJ en distintos modelos experimentales. En concreto, se pretende identificar los cambios de expresión génica en ratón inducidos por el tratamiento antipsicótico que nos permitan hallar procesos biológicos y potenciales genes candidatos relacionados con el desarrollo de alteraciones metabólicas. En cuanto a la eficacia, se busca valorar el efecto neuroprotector y la actividad antiapoptótica del JNJ, en comparación con clozapina, en una línea celular de neuroblastoma humano, así como, evaluar su capacidad para revertir las

alteraciones neuropatológicas y cognitivo-conductuales en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la administración postnatal de ketamina.

Los resultados obtenidos indican que los antipsicóticos modifican la expresión de diversos genes involucrados en la regulación de los procesos metabólicos y señalan a *EP300* como un gen candidato de las anomalías metabólicas inducidas por estos fármacos. Por otra parte, el tratamiento con JNJ ha demostrado no ser neurotóxico y atenuar la apoptosis, particularmente la activación de caspasa-3 inducida por dopamina y glutamato, en la línea celular de neuroblastoma. Además, el tratamiento con JNJ, administrado en ratones durante la adultez o de forma precoz en etapas correspondientes a la fase prodrómica de la enfermedad, ha mejorado parcialmente los déficits neuropatológicos y los síntomas negativos y cognitivos, mostrando una mayor eficacia que el tratamiento con clozapina.

En conclusión, *EP300* y los genes implicados en su red de interacción podrían considerarse genes candidatos para futuros estudios farmacogenéticos del síndrome metabólico inducido por antipsicóticos. Por otro lado, el JNJ podría ser un tratamiento eficaz para la esquizofrenia, aunque serían necesarios más estudios.

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe psychotic disorder with an approximate prevalence of 0.75% that is characterized by the presence of positive and negative symptoms and cognitive deficits. The disease begins with a prodromal phase where individuals present subclinical symptoms that show functional deterioration. The first psychotic episode (FPE) usually occurs between the end of adolescence and the beginning of adulthood. Once diagnosed, it follows a fluctuating course giving rise to psychotic crises. Regarding treatment, antipsychotics are the only class of drugs with proven efficacy. However, these drugs are ineffective in treating some of the symptoms of the disease, such as negative symptoms and cognitive deficits. In addition, the use of antipsychotics leads to the appearance of adverse effects in some patients, among which metabolic syndrome stands out. At present, we do not know the mechanisms by which some antipsychotics induce these metabolic alterations.

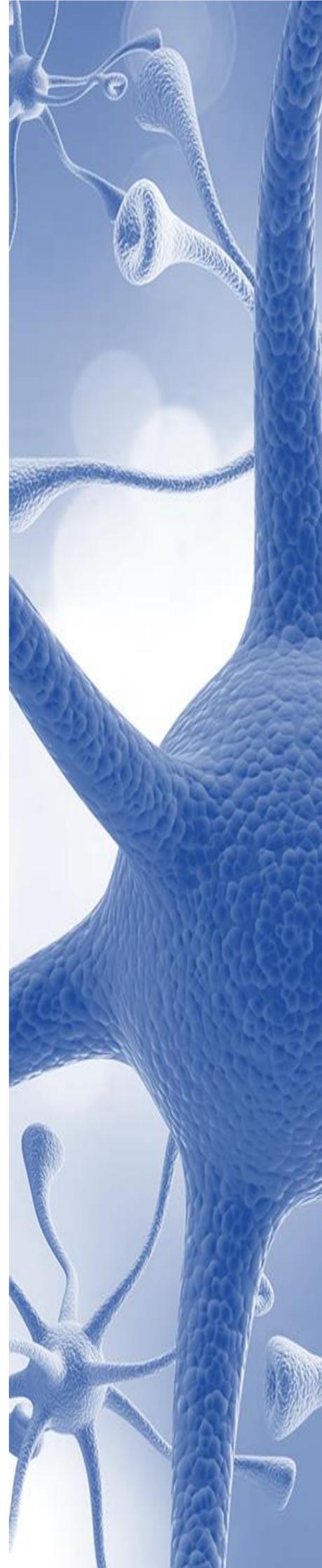
Since current treatment with antipsychotics has side effects and its effectiveness is reduced to the control of positive symptoms, new drugs are being developed. Based on the glutamatergic hypothesis of schizophrenia, JNJ-46356479 (JNJ), a positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptors type 2, could be effective in the treatment of this disorder.

This doctoral thesis aims to delve into the molecular mechanisms involved in the appearance of metabolic syndrome induced by antipsychotics with the ultimate goal of identifying predictive markers of this adverse effect, as well as evaluating the efficacy of JNJ in different experimental models. Specifically, the aim is to identify changes in gene expression in mice induced by antipsychotic treatment that allow us to find biological processes and potential candidate genes related to the development of metabolic disorders. Regarding efficacy, the aim is to assess the neuroprotective effect and antiapoptotic activity of JNJ, compared to clozapine, in a human neuroblastoma cell line, as well as to evaluate its ability to reverse neuropathological and cognitive-behavioural alterations in an animal model of schizophrenia generated by postnatal administration of ketamine.

The results obtained indicate that antipsychotics modify the expression of various genes involved in the regulation of metabolic processes and point to *EP300* as a candidate gene for the metabolic abnormalities induced by these drugs. On the other hand, JNJ treatment has been shown to be non-neurotoxic and to attenuate apoptosis, particularly caspase-3 activation induced by dopamine and glutamate, in the neuroblastoma cell line. In addition, treatment with JNJ, administered to mice during adulthood or in early stages corresponding to the prodromal phase of the disease, has partially improved neuropathological deficits and negative and cognitive symptoms, showing greater efficacy than treatment with clozapine.

In conclusion, *EP300* and the genes involved in its interaction network could be considered candidate genes for future pharmacogenetic studies of metabolic syndrome induced by antipsychotics. On the other hand, JNJ could be an effective treatment for schizophrenia, although more studies are needed.

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Esquizofrenia

1.1.1. *Definición de la esquizofrenia*

El concepto actual que tenemos de esquizofrenia es relativamente reciente. Es un neologismo acuñado en 1908 por Eugen Bleuer en un artículo titulado *Die Prognose der Dementia praecox (Schizophreniegruppe)*, aunque previamente el concepto lo introdujo Emil Kraepelin a finales del siglo XIX, diferenciando la “demencia precoz” de otros trastornos mentales (1). La palabra esquizofrenia proviene del griego clásico *schízein* (escindir, dividir) y *phrenós* (mente).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la esquizofrenia como un trastorno mental grave que se caracteriza por anomalías del pensamiento, la percepción, las emociones, el lenguaje, la percepción del yo y la conducta (2).

En efecto, la esquizofrenia es un trastorno psicótico grave en el que intervienen varios factores y se caracteriza por una amplia variabilidad, tanto en sus causas como en su presentación clínica. Los pacientes pueden presentar una combinación de alucinaciones, delirios y trastornos graves del pensamiento y el comportamiento, que afectan al funcionamiento diario, llegando a ser incapacitante.

1.1.2. *Epidemiología, características clínicas y diagnóstico de la esquizofrenia*

En la esquizofrenia se estima una prevalencia aproximada del 0,75% de la población mundial (3) y una incidencia media anual de 15,2 casos por cada 100.000 personas. Se empieza a manifestar al final de la adolescencia o inicio de la edad adulta, alrededor de los 22 años (4), aunque puede aparecer a cualquier edad. La evidencia sugiere que existen diferencias en función del sexo, con una proporción mayor de casos en hombres que en mujeres (1,4 hombres por cada mujer). No obstante, en la edad adulta predomina el inicio del trastorno en el sexo femenino (5). En relación a la tasa de mortalidad estandarizada, en la mayoría de los países es de aproximadamente 2,5 por cada 100.000 defunciones. La esperanza de vida se reduce aproximadamente entre 15 y 20 años, debido a factores relacionados con el estilo

de vida como la mala alimentación, la falta de actividad física, el tabaquismo y el abuso de sustancias (6). Además, una de las causas de muerte más comunes entre los pacientes con esquizofrenia es el suicidio, siendo la prevalencia puntual de ideación suicida en este trastorno del 30% (7).

Los síntomas varían ampliamente entre individuos y en el propio paciente a lo largo de la vida. Ningún síntoma es patognomónico de la esquizofrenia, sino que la combinación de ellos conlleva su diagnóstico. Estos síntomas se clasifican en tres categorías principales: positivos, negativos y cognitivos:

- 1- Síntomas positivos: incluyen percepciones alteradas, pensamientos anormales y comportamientos extraños. Las personas con estos síntomas psicóticos pueden perder el sentido de la realidad y percibirse a sí mismas y al mundo que las envuelve de manera distorsionada, llegando a experimentar:
 - a) Alucinaciones: percepciones de estímulos que no existen, que pueden ser visuales, auditivas, gustativas, olfativas o táctiles.
 - b) Delirios: creencias firmemente arraigadas que no están respaldadas por hechos objetivos.
 - c) Trastornos del pensamiento: incluyen pensamiento inusual o ilógico, así como dificultad para organizar las ideas y el habla.

- 2- Síntomas negativos: incluyen la pérdida de interés, de motivación o del disfrute en las actividades de la vida diaria, retraimiento social, dificultad para mostrar las emociones y dificultad para funcionar con normalidad. Entre ellos distinguimos:
 - a) Abulia: falta de voluntad para actuar o tomar decisiones de forma independiente.
 - b) Afecto plano: ausencia de respuesta emocional a una situación que por lo general suscita emociones.
 - c) Alogia: ausencia o disminución del lenguaje espontáneo y de su contenido.
 - d) Anhedonia: incapacidad para prever y experimentar placer.

- e) Apatía: estado de desinterés y falta de motivación que provoca dificultad para planificar, iniciar y mantener actividades.

3- Síntomas cognitivos: incluyen problemas de atención, concentración y memoria. Estos síntomas pueden ser sutiles en algunas personas, pero en otras, son más prominentes e interfieren en actividades rutinarias como seguir conversaciones, aprender cosas nuevas o recordar citas. El paciente suele experimentar:

- a) Dificultad para procesar la información necesaria para tomar decisiones.
- b) Problemas para concentrarse o prestar atención.
- c) Problemas para usar la información inmediatamente después de aprenderla.

En la actualidad, debido a la ausencia de marcadores biológicos u otras pruebas específicas, el diagnóstico del trastorno que llevan a cabo los profesionales de la salud se basa en la evaluación exhaustiva de los signos y síntomas, así como de los antecedentes. Los criterios diagnósticos han ido evolucionando junto a la definición de esquizofrenia a lo largo de los años. Estos criterios que se aplican en la clínica se encuentran recogidos en manuales, siendo el DSM-V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition*) uno de los más empleados. En este manual se utilizan dimensiones psicopatológicas con el objetivo de mejorar la capacidad para describir la heterogeneidad de la esquizofrenia de una manera que sea válida y clínicamente útil (8), y facilitar el tratamiento. Los criterios diagnósticos actuales pueden verse en el **cuadro 1**.

Es necesario señalar la importancia de realizar un diagnóstico diferencial y un seguimiento detallado del paciente para descartar otros trastornos mentales o trastornos por abuso de sustancias. Los primeros síntomas se dan en la fase prodrómica de la esquizofrenia. En ella, los individuos pueden presentar síntomas subclínicos que evidencian el deterioro funcional de la persona. En un primer momento de esta fase las personas experimentan síntomas negativos o síntomas clínicos inespecíficos y más adelante pueden empezar a aparecer los primeros síntomas positivos de forma atenuada por debajo de los niveles clínicos de diagnóstico (9).

El primer episodio psicótico (PEP) puede darse en la infancia, la adolescencia o en periodos más avanzados de la edad adulta, aunque generalmente ocurre en adultos jóvenes. El término esquizofrenia de inicio temprano se utiliza para referirse a pacientes a los que se les diagnostica el trastorno antes de los 18 años, considerándose esta aparición de la enfermedad en etapas tempranas del desarrollo cerebral un determinante de mal pronóstico del paciente (10). Una vez diagnosticada, sigue un curso fluctuante dando lugar a crisis psicóticas donde se pueden observar síntomas positivos, negativos y cognitivos mal controlados. Además, los síntomas negativos y déficits cognitivos pueden experimentar un empeoramiento progresivo con el curso del trastorno (**Figura 1**). En la mayoría de casos la recaída es común y la remisión es incompleta y se calcula que un 80% de los pacientes con esquizofrenia vuelven a tener una recaída durante los 5 años siguientes al PEP (11,12). No obstante, en el 10 – 15% de casos, la recuperación después de un PEP es completa.

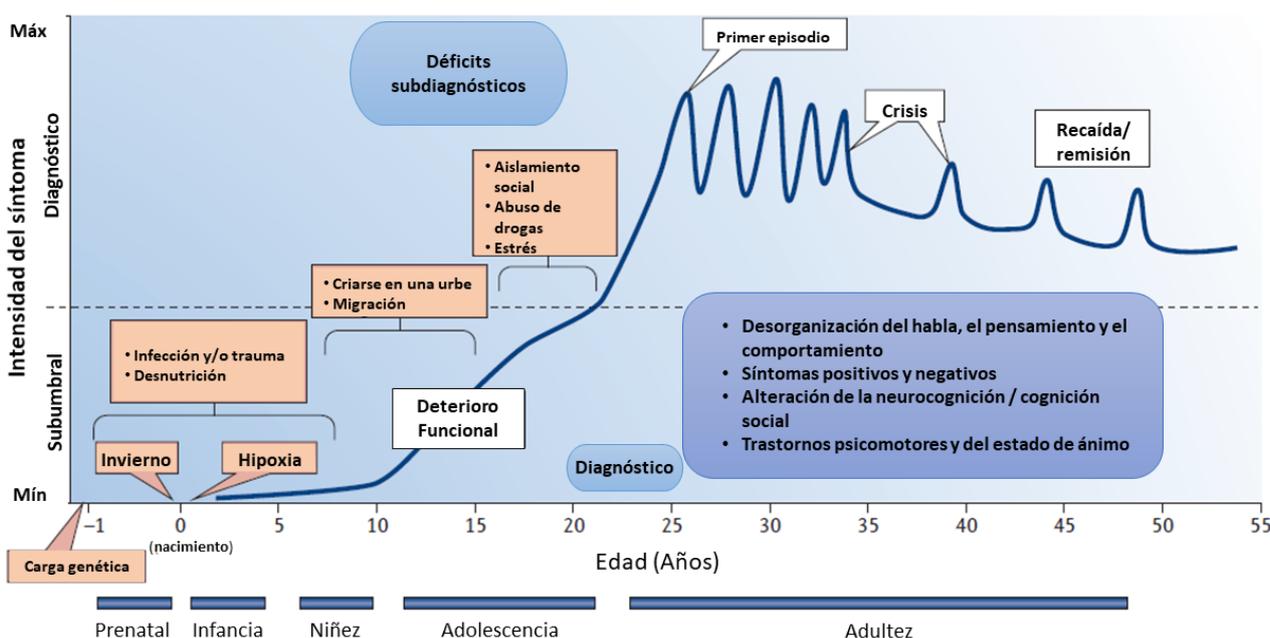


Figura 1. Inicio y progresión de la esquizofrenia. (Adaptado de Millan y cols. 2016 (13)).

Entre los factores asociados a un mal pronóstico de la enfermedad destacan la presencia de síntomas negativos graves y déficits cognitivos, así como una mayor duración de la psicosis no tratada (14,15). A menudo, el diagnóstico de pacientes con síntomas predominantemente negativos se retrasa, lo que da lugar a una psicosis no

tratada de mayor duración que está relacionada con una peor funcionalidad de los pacientes (16).

Cuadro 1. Criterios diagnósticos de la esquizofrenia según el DSM-5™.

- A. Dos (o más) de los síntomas siguientes, cada uno de ellos presente durante una parte significativa de tiempo durante un período de un mes (o menos si se trató con éxito). Al menos uno de ellos ha de ser (1), (2) o (3):
- 1) Delirios
 - 2) Alucinaciones
 - 3) Discurso desorganizado (p. ej., disgregación o incoherencia frecuente).
 - 4) Comportamiento muy desorganizado o catatónico.
 - 5) Síntomas negativos (es decir, expresión emotiva disminuida o abulia).
- B. Durante una parte significativa del tiempo desde el inicio del trastorno, el nivel de funcionamiento en uno o más ámbitos principales, como el trabajo, las relaciones interpersonales o el cuidado personal, está muy por debajo del nivel alcanzado antes del inicio (o cuando comienza en la infancia o la adolescencia, fracasa la consecución del nivel esperado de funcionamiento interpersonal, académico o laboral).
- C. Los signos continuos del trastorno persisten durante un mínimo de seis meses. Este período de seis meses ha de incluir al menos un mes de síntomas prodrómicos o residuales. Durante estos períodos prodrómicos o residuales, los signos del trastorno se pueden manifestar únicamente por síntomas negativos o por dos o más síntomas enumerados en el Criterio A presentes de forma atenuada (p. ej., creencias extrañas, experiencias perceptivas inhabituales).
- D. Se han descartado el trastorno esquizoafectivo y el trastorno depresivo o bipolar con características psicóticas porque 1) no se han producido episodios maníacos o depresivos mayores de forma concurrente con los síntomas de la fase activa, o 2) si se han producido episodios del estado de ánimo durante los síntomas de fase activa, han estado presentes sólo durante una mínima parte de la duración total de los períodos activo y residual de la enfermedad.
- E. El trastorno no se puede atribuir a los efectos fisiológicos de una sustancia (p. ej., una droga o medicamento) o a otra afección médica.
- F. Si existen antecedentes de un trastorno del espectro del autismo o de un trastorno de la comunicación de inicio en la infancia, el diagnóstico adicional de esquizofrenia sólo se hace si los delirios o alucinaciones notables, además de los otros síntomas requeridos para la esquizofrenia, también están presentes durante un mínimo de un mes (o menos si se trató con éxito).

Especificar si:

Los siguientes especificadores del curso de la enfermedad sólo se utilizarán después de un año de duración del trastorno y si no están en contradicción con los criterios de evolución diagnósticos.

Primer episodio, actualmente en episodio agudo: La primera manifestación del trastorno cumple los criterios definidos de síntoma diagnóstico y tiempo. Un episodio agudo es el período en que se cumplen los criterios sintomáticos.

Primer episodio, actualmente en remisión parcial: Remisión parcial es el período durante el cual se mantiene una mejoría después de un episodio anterior y en el que los criterios que definen el trastorno sólo se cumplen parcialmente.

Primer episodio, actualmente en remisión total: Remisión total es el período después de un episodio anterior durante el cual los síntomas específicos del trastorno no están presentes.

Episodios múltiples, actualmente en episodio agudo: Los episodios múltiples se pueden determinar después de un mínimo de dos episodios (es decir, después de un primer episodio, una remisión y un mínimo de una recidiva).

Episodios múltiples, actualmente en remisión parcial

Episodios múltiples, actualmente en remisión total

Continuo: Los síntomas que cumplen los criterios de diagnóstico del trastorno están presentes durante la mayor parte del curso de la enfermedad, y los períodos sintomáticos por debajo del umbral son muy breves en comparación con el curso global.

No especificado

Especificar si:

Con catatonía

Fuente: (*American Psychiatric Association*, 2013) (17).

1.1.3. Etiopatogenia de la esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno complejo y heterogéneo de origen multifactorial en el que están implicados múltiples factores genéticos y ambientales que interaccionan entre sí y determinan su aparición (18). Aunque los mecanismos etiopatogénicos concretos continúan siendo desconocidos se han descrito diferentes alteraciones a nivel estructural y de neurotransmisión cerebral en estos pacientes.

Existen evidencias de anomalías estructurales en el cerebro de pacientes con esquizofrenia, detectándose un volumen intracraneal e hipocampal disminuido, así como una reducción del tamaño de la amígdala, el tálamo y el núcleo accumbens (19). Por otro lado, se han reportado volúmenes mayores del ventrículo

lateral y del globo pálido (20). Además, se ha encontrado una reducción generalizada del grosor cortical y una superficie cortical más pequeña, sobre todo en las regiones de los lóbulos temporal y frontal (21). Específicamente, en la corteza prefrontal (CPF) se han observado alteraciones funcionales como la hipofrontalidad en estado de reposo y en ejecución de tareas en pacientes con esquizofrenia (22). Diversos estudios de neuroimagen en cerebros humanos *in vivo* y *post mortem* han mostrado evidencias de alteraciones neuroquímicas como variaciones en las concentraciones de neurotransmisores y en la densidad de receptores, que implican una neurotransmisión dopaminérgica, serotoninérgica, glutamatérgica y GABAérgica anormal (23,24). Estas alteraciones ponen en evidencia la etiología compleja de la enfermedad, para la que se han propuesto diferentes teorías que apuntan a un papel central para varios neurotransmisores.

La teoría de la desregulación dopaminérgica se remonta a principios de los años 50, tras el descubrimiento de Jean Delay y Pierre Deniker de los efectos antipsicóticos (APs) de la clorpromazina (25), fármaco que originalmente se desarrolló como un antihistamínico para tratar diferentes condiciones como náuseas y alergias. Años más tarde, Carlsson y Lindqvist observaron que la clorpromazina aumentaba la concentración de metabolitos de dopamina en el cerebro de ratones, sin alterar los niveles de este neurotransmisor, lo que los llevó a proponer que los APs ejercían sus efectos terapéuticos mediante el bloqueo de los receptores de dopamina (26). La hipótesis que se formuló entonces proponía que la transmisión excesiva de dopamina representaba la característica central de la esquizofrenia (27). Esta hipótesis se vio apoyada por la evidencia clínica de que la administración de drogas estimulantes como las anfetaminas, que actúan como un potente liberador de catecolaminas en el cerebro, provoca un aumento de los niveles sinápticos de dopamina y produce efectos psicótico-miméticos agudos en individuos sanos y una exacerbación de los síntomas en los pacientes esquizofrénicos (28) los cuáles mejoran con el tratamiento con APs (29).

A mediados de los años 70 se demostró que la eficacia de los APs contra los síntomas positivos está relacionada con la propiedad farmacodinámica general de antagonismo del receptor de dopamina D₂ (30). Una reconceptualización más actual

de la hipótesis dopaminérgica plantea que los síntomas positivos de la esquizofrenia son resultado de la hiperestimulación del receptor D_2 debido a la hiperactividad de proyecciones dopaminérgicas mesolímbicas, mientras que los síntomas negativos y las deficiencias cognitivas se deben a la hipoestimulación del receptor D_1 de la CPF provocada por la reducción de proyecciones dopaminérgicas mesocorticales (31) (**Figura 2**). No obstante, aunque la hiperdopaminergia subcortical está bien documentada, el déficit en la CPF en la transmisión dopaminérgica está menos establecido (32). La hipótesis de la dopamina puede explicar la aparición de ciertos aspectos de la psicopatología de la esquizofrenia, especialmente de los síntomas positivos (33).

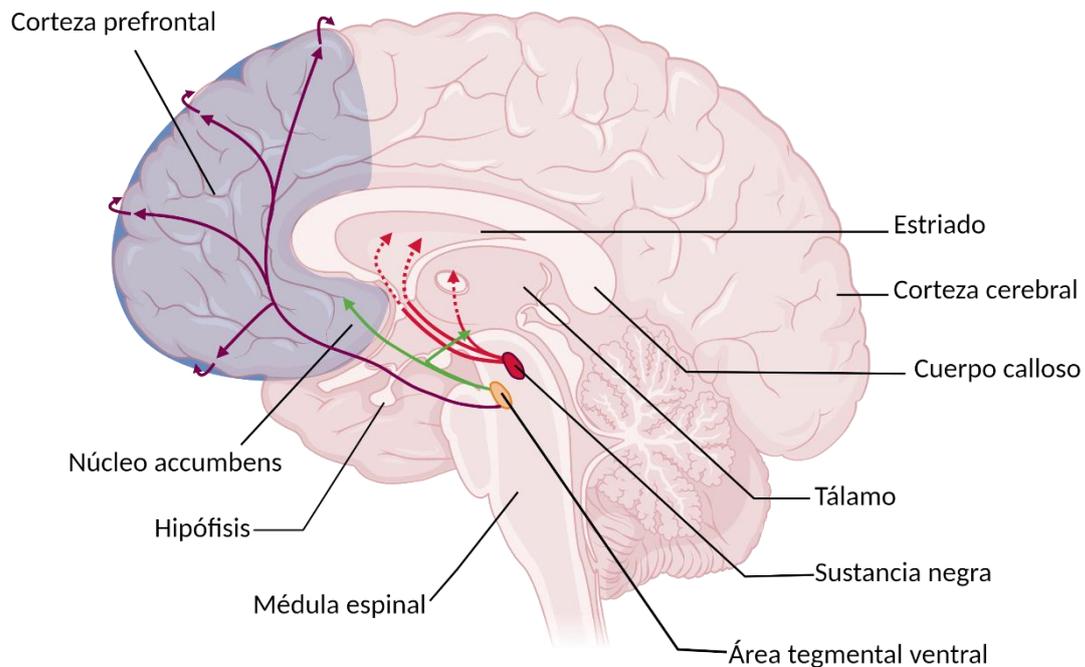


Figura 2. Vías dopaminérgicas y su relación con la esquizofrenia.

Vía mesolímbica (color verde), transmite dopamina desde el área tegmental ventral del mesencéfalo a la región límbica que incluye núcleo accumbens, hipocampo, amígdala y corteza entorrinal. Se asocia con la sintomatología positiva de la esquizofrenia. Vía mesocortical (color violeta), transmite dopamina desde el área tegmental ventral a la corteza frontal. Se asocia con la sintomatología negativa de la esquizofrenia. Vía nigroestriatal (color rojo), transmite dopamina desde la región pars compacta de la sustancia negra hasta el cuerpo estriado. Está involucrada en el control motor. La CPF se encuentra destacada en color grisáceo. (Creado con BioRender.com)

Sin embargo, por sí sola no puede aclarar la aparición de los síntomas negativos y cognitivos, alteraciones que no mejoran con el tratamiento con los APs, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos implicados (34). Así, en las últimas dos décadas, ha pasado de ser la hipótesis preponderante a asumir que resulta una simplificación excesiva que es insuficiente para explicar la etiología del trastorno.

Con el advenimiento de los APs de segunda generación, resurgió el interés por la teoría serotoninérgica. Esta sugiere que la esquizofrenia podría resultar de una sobreestimulación en la neurotransmisión de la serotonina en la corteza cerebral, especialmente en la corteza cingulada anterior y el lóbulo frontal dorsolateral (35,36). La principal evidencia se basa en los estudios sobre el efecto de la dietilamida de ácido D-lisérgico (LSD), una sustancia psicodélica semisintética, y la serotonina (5-Hidroxitriptamina; 5-HT) en el sistema nervioso central (37,38). El LSD es un agonista del receptor de la serotonina y tiene una acción alucinógena y psicotomimética. Esta hipótesis se ha visto reforzada por el hecho de que muchos de los APs antagonizan los receptores de la serotonina 5HT_{2A} (39). Además, diversos estudios *post mortem* en muestras de pacientes con esquizofrenia encontraron alteraciones en receptores serotoninérgicos, evidenciando que la neurotransmisión de esta sustancia está afectada. En concreto, se observó un aumento del número de receptores 5-HT_{1A} en la CPF y temporal (40), y una disminución significativa de 5-HT_{2A} en la CPF, así como una disminución en la densidad de receptores serotoninérgicos en la corteza frontal (41,42). Esta sobrecarga serotoninérgica conduciría a la interrupción de la señalización de glutamato y, en última instancia, a la atrofia sináptica y la pérdida de materia gris. La entrada de dopamina en una corteza cingulada anterior deteriorada causaría los síntomas positivos y la actividad reducida del lóbulo frontal provocaría los síntomas negativos y el deterioro cognitivo (35).

Otras teorías han relacionado la esquizofrenia con alteraciones en el glutamato, el neurotransmisor excitatorio más abundante en el sistema nervioso central. La hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia se formuló en los años 80 (43). Esta propone una hipofunción de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) como factor patogénico de la esquizofrenia (44,45), en particular en lo que respecta a los síntomas negativos y al deterioro cognitivo (46,47).

La evidencia más notable fue la observación de los efectos provocados por antagonistas no competitivos de los receptores NMDA, como la ketamina y la fenciclidina (48). Estas drogas inducen síntomas similares a la esquizofrenia, no solamente sintomatología positiva como la psicosis inducida por anfetaminas, sino también síntomas negativos y cognitivos en individuos sanos (44,49,50). Estudios *in vivo* mediante tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) evidenciaron una reducción significativa en el hipocampo de los valores relativos de unión al receptor NMDA en pacientes con esquizofrenia no tratada en comparación con voluntarios sanos (51). Además, estudios *post mortem* en tejido cerebral humano hallaron niveles reducidos de expresión de las subunidades del receptor NMDA, concretamente de GluN1, en pacientes con esquizofrenia (52).

Otra teoría propuesta para explicar el origen de la esquizofrenia es la del neurodesarrollo formulada a mediados de los años 80 (53,54). Esta teoría postula que la esquizofrenia es producto de una alteración cerebral primaria debido a un defecto estructural que tiene lugar en el desarrollo del sistema nervioso central. Según la misma, la persona nace con unos factores genéticos determinados que en interacción con factores ambientales hacen que el desarrollo del cerebro se vea alterado (55,56). Las lesiones tempranas como el deterioro de la neurogénesis, la migración neuronal, la arborización dendrítica o el crecimiento axonal, conducirían a anomalías en los circuitos neuronales que explicarían los signos y síntomas premórbidos. Durante la adolescencia y la edad adulta temprana, las anomalías en la maduración cerebral, como los déficits en la mielinización y la poda sináptica excesiva, podrían explicar la aparición de los síntomas (55,57,58), mientras que el deterioro progresivo se explicaría por la disminución de la neuroplasticidad, el deterioro de las espinas dendríticas y una excesiva poda sináptica a lo largo de la enfermedad (57). Numerosos estudios de expresión génica *post mortem* y estudios prospectivos de imágenes cerebrales multimodales han proporcionado evidencias que apoyan la teoría del neurodesarrollo (56).

El exceso de poda sináptica podría estar inducido por la desregulación de procesos apoptóticos mediados por un exceso de glutamato (59). Una alteración en los receptores glutamatérgicos NMDA podría producir una disfunción de las

interneuronas inhibitoras GABAérgicas que expresan parvalbúmina (PV+), una proteína de unión al calcio, que provocaría la desinhibición de las neuronas piramidales glutamatérgicas excitadoras. Como resultado podría producirse una liberación significativa de glutamato (tormenta glutamatérgica) de forma localizada. Esto llevaría a un estado hiperdopaminérgico subcortical (tormenta dopaminérgica) que implicaría la aparición de síntomas positivos. Por tanto, el aumento de glutamato extracelular desencadenaría fenómenos de neurotoxicidad y apoptosis, especialmente durante etapas claves del desarrollo fisiológico cerebral, en la adolescencia (60), que llevarían a la poda de espinas dendríticas de neuronas de la CPF y del hipocampo (61). Esto estaría relacionado con la pérdida acelerada de sustancia gris, y con los síntomas negativos y el déficit cognitivo de la enfermedad (20,62). La pérdida de espinas dendríticas y de plasticidad sináptica alteraría gravemente la conectividad de la circuitería cerebral en la esquizofrenia (63) afectando procesos clave del aprendizaje y la memoria (64) (**Figura 3**).

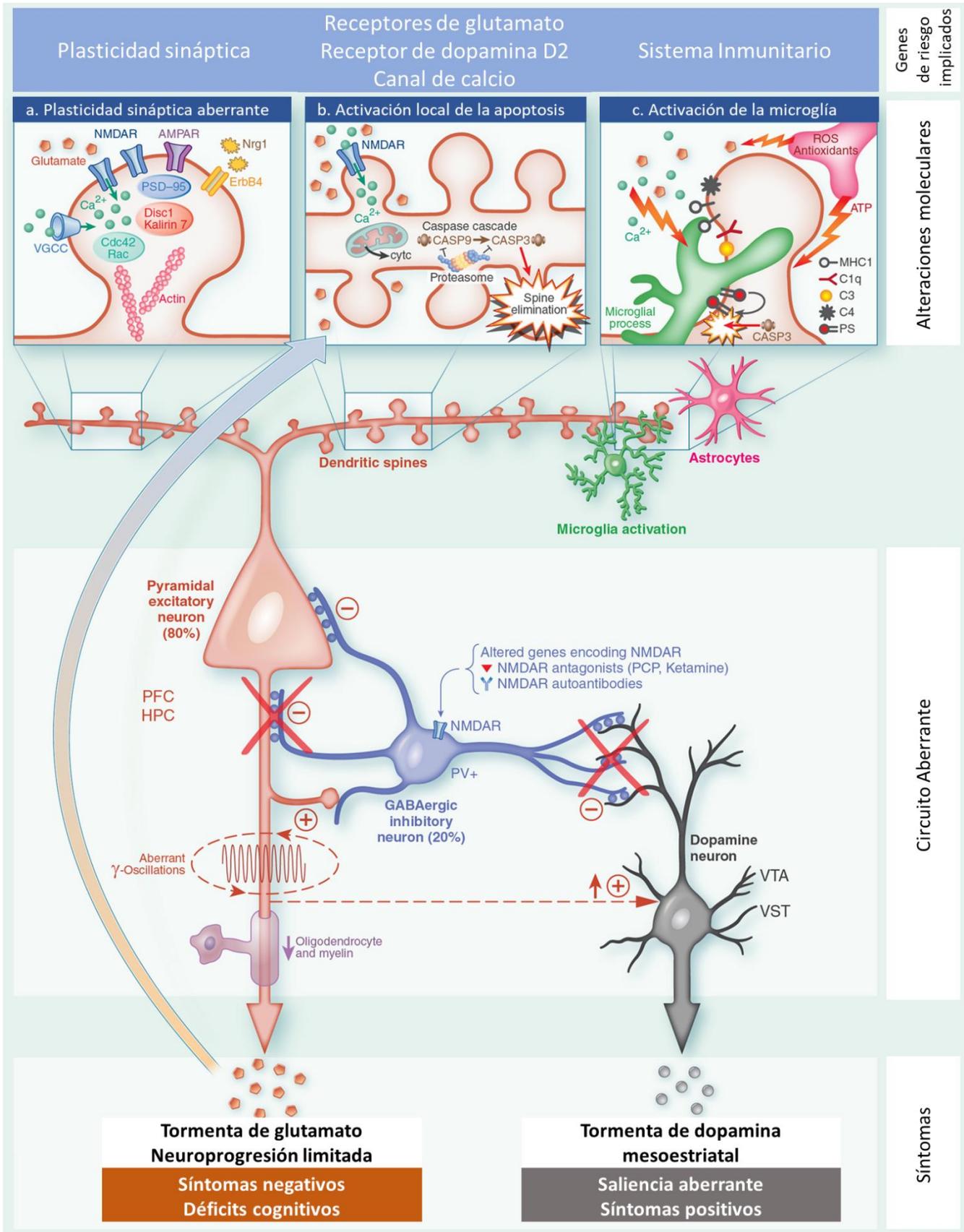


Figura 3. Integración de las teorías etiopatogénicas de la esquizofrenia.

Ver pie de figura en la página siguiente.

(Ver figura en la página anterior)

Figura 3.

Diagrama simplificado que resume las vías que se han hipotetizado para la apoptosis dendrítica subyacente a la poda excesiva de las espinas dendríticas que ocurre en la adolescencia tardía y en la adultez temprana en individuos con esquizofrenia. En la parte central del diagrama se representan las alteraciones reportadas en circuitos corticales cerebrales en pacientes con esquizofrenia y en modelos animales de este trastorno. **a) Plasticidad sináptica aberrante.** Alteración en genes que codifican el ajuste fino de la sinapsis de glutamato y que son cruciales para la plasticidad de espinas dendríticas. Su disfunción puede contribuir a la pérdida exagerada de espinas, lo que lleva a conexiones erróneas en el cerebro e ineficiencia sináptica. **b) Activación local de la apoptosis dendrítica.** En períodos críticos, la tormenta glutamatérgica y la sobrecarga de calcio a través de los receptores de NMDA podrían desencadenar la activación local de la vía de apoptosis mitocondrial dendrítica y la cascada de caspasa-3, lo que conduciría a la poda excesiva de espinas y dendritas. Como se muestra en la figura, los proteosomas actúan como frenos que impiden la propagación del mecanismo de apoptosis al cuerpo celular, evitando así la muerte celular. **c) Activación de la microglía.** Las dendritas apoptóticas y otras moléculas generan señales de "encuéntrame" y señales de "cómeme" para atraer a la microglía que contribuye a la fagocitosis de las sinapsis. Por lo tanto, la microglía podría contribuir a la poda excesiva de las espinas dendríticas en períodos críticos del neurodesarrollo. (Adaptado de Parellada y Gassó, 2021 (59)).

1.1.4. Factores de riesgo

Aunque se desconocen las causas de la esquizofrenia, numerosos estudios han reportado ciertas condiciones que parecen aumentar el riesgo a desarrollar el trastorno. En la esquizofrenia no existe una causa única que explique su aparición, sino que, a diferencia de enfermedades monogénicas, es la combinación de múltiples factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, lo que determina el inicio y la evolución de este trastorno.

1.1.4.1. Factores genéticos

En estudios de gemelos se ha estimado que los factores hereditarios explican alrededor del 80% del riesgo de padecer esquizofrenia (65,66). Esto es indicativo del fuerte componente genético de la enfermedad. Mediante estudios con familias y gemelos en adopción se ha determinado que el riesgo de padecer esquizofrenia se correlaciona con el grado de parentesco con el familiar afectado y con el número de genes compartidos. El riesgo de padecer el trastorno para los familiares de tercer grado fue del 2%, para los familiares de segundo grado, entre el 2% y el 5% y para los de primer grado entre el 9% y el 13%. Cabe destacar que en gemelos dicigóticos el riesgo fue del 17% y en monocigóticos el riesgo ascendió al 48% (67,68) (**Figura 4**).

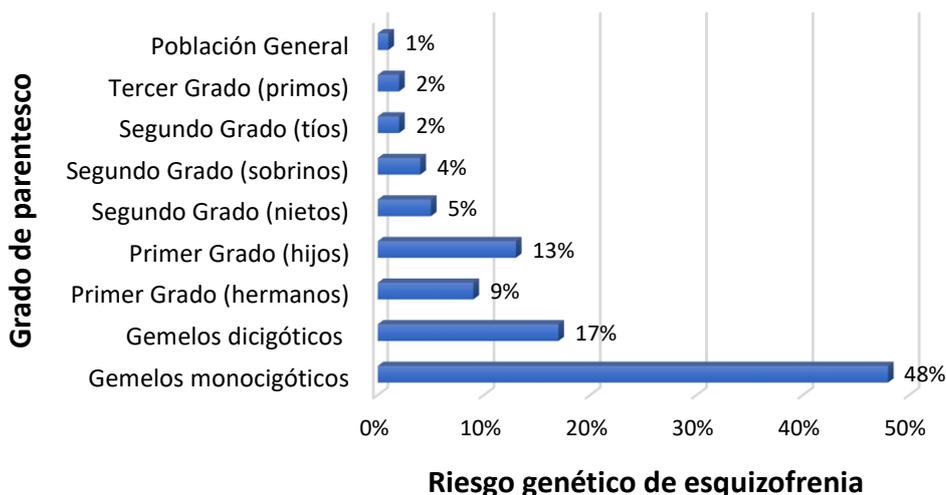


Figura 4. Riesgo genético de sufrir esquizofrenia de un individuo en función del parentesco que tenga con un paciente afectado. (Adaptado de McDonald y Murphy 2003 (67)).

El hecho de que los gemelos monocigóticos no presenten una concordancia del 100% indica que, si bien los factores de riesgo genético son importantes en la etiología de la esquizofrenia no son la causa directa y, por tanto, los genes más bien tienen un papel de susceptibilidad. También es evidente que la causa de este trastorno no es una única mutación en un solo gen sino un conjunto de genes alterados, donde estarían implicados múltiples polimorfismos, con efectos individuales pequeños para cada uno de ellos.

Estudios realizados mediante técnicas de citogenética en familias han permitido identificar regiones cromosómicas que presentaron alteraciones, detectándose la translocación entre los cromosomas 1 y 11, viéndose alterados los genes *DISC1* y *DISC2* (*Disrupted in Schizophrenia 1 y 2*), los cuales son importantes genes candidatos para el trastorno (69). La citogenética molecular también hizo posible la identificación de las primeras mutaciones asociadas a la esquizofrenia que consistían en variaciones en el número de copias, de manera que las deleciones en el cromosoma 22q11.2 aumentaban el riesgo de esquizofrenia (70).

Métodos indirectos como los estudios de ligamiento se han utilizado para identificar posiciones cromosómicas asociadas a la esquizofrenia. Un ejemplo es el hallazgo de la asociación del gen *DTNBP1* (*Dystrobrevin binding protein 1*), localizado en la región

cromosómica 6p22.3, con la esquizofrenia. Su ubicación dentro del segmento del cromosoma 6 donde se había mostrado evidencia de ligamiento con el trastorno, facilitó la identificación de este gen (71). Esta estrategia ha permitido encontrar ligamiento con diversas regiones cromosómicas (72).

Los estudios de asociación de genes candidatos han permitido estudiar numerosos genes de efectos moderados que confieren cierta susceptibilidad a desarrollar esquizofrenia. Estos estudios comparan las frecuencias de uno o varios polimorfismos genéticos en genes seleccionados en base a las diferentes hipótesis fisiopatológicas del trastorno entre pacientes con esquizofrenia e individuos sanos. Esto ha servido para identificar genes candidatos relacionados con la neurotransmisión dopaminérgica (*DRD1* (73), *DRD2* (74,75), *DRD3* (76), *TH* (77), *SLC6A3* (75)), serotoninérgica (*5-HTR1B* (78), *5-HTR2A* (79), *TPH1* (80), *SLC6A4* (81)) y glutamatérgica (*SLC1A6* (82), *GRM3* (83)).

En la última década se han realizado múltiples estudios de asociación del genoma completo (GWAS), que analizan una gran cantidad de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) localizados a lo largo de todo el genoma. Esto ha permitido identificar nuevos genes asociados que tendrían un importante papel en la patogenia del trastorno como *GRIN2A*, *SP4*, *STAG1*, *FAM120A*, *FOXP1* y *BCL11B*, entre otros (84–86). Además, los estudios de GWAS nos permiten calcular las puntuaciones de riesgo poligénico (PRS, *polygenic risk score*), que se calculan como el sumatorio de los diferentes alelos de riesgo identificados, de manera que se tiene en cuenta el efecto de múltiples polimorfismos implicados en el fenotipo de estudio. Estos análisis han permitido determinar puntuaciones de riesgo poligénico basadas en 108 loci genéticos asociados con la enfermedad reportados en un amplio estudio de asociación de todo el genoma, si bien para esquizofrenia solamente explicó el 7% de la variabilidad (84). En otro GWAS con población europea, se determinó que la varianza explicada por las PRS que identifican alelos causales osciló entre el 32% y el 36% (87). Muchos de los genes que se identifican en los estudios de asociación de genoma completo y estudios de expresión génica implican vías asociadas al sistema inmunitario, desarrollo del citoesqueleto y a la plasticidad y función sináptica (88).

Es evidente que la genética solo explica una pequeña parte de la varianza en la predisposición de esquizofrenia en población general. Por lo tanto, una importante proporción de esta predisposición podría deberse a la interacción gen-ambiente (18) o a mecanismos epigenéticos que reflejan el efecto del ambiente (89).

1.1.4.2. Factores ambientales

La exposición a determinados factores ambientales en momentos determinados del desarrollo se ha relacionado con el riesgo a desencadenar la aparición del trastorno. El paradigma dominante para entender la contribución del ambiente en la etiología de la esquizofrenia ha sido durante las últimas décadas la teoría del neurodesarrollo (55). Esta plantea que el proceso patológico ocurre durante el desarrollo cerebral, mucho antes que las manifestaciones clínicas (33). Se han identificado múltiples factores de riesgo ambientales que afectan al neurodesarrollo temprano durante el embarazo. Incluyendo el estrés maternal (90); infecciones maternas causadas por rubéola, gripe, toxoplasmosis o incluso el virus del herpes simple tipo 2 (91); deficiencias nutricionales como haber pasado por períodos de hambruna (92) o deficiencias de vitamina D (93) así como el retraso del crecimiento intrauterino (94).

Además, se han reportado hallazgos significativos en lo que respecta a las complicaciones obstétricas (95), que pueden darse: en el embarazo (sangrado, preeclampsia, diabetes e incompatibilidad Rh), durante el desarrollo y crecimiento anormal del feto (poco peso al nacer, malformaciones congénitas, perímetro cefálico pequeño) y en el parto (asfixia, atonía uterina y cesárea de emergencia). El uso de fórceps y el bajo peso al nacer son las variables que mejor predicen una edad temprana de inicio a la psicosis en un PEP (96).

Asimismo, también se ha asociado un mayor riesgo de esquizofrenia en personas que se han criado en zonas urbanas, en comparación con las que viven en zonas rurales (97); en personas que tienen un nivel socioeconómico bajo (98), en primeras o segundas generaciones de migrantes (99), y en individuos que han nacido en invierno o a principios de primavera. En concreto se ha observado que nacer en estos períodos estacionales implica mayor probabilidad, entre un 5 y un 15%, de

desarrollar esquizofrenia (100). Otro factor ampliamente estudiado es el mayor riesgo de esquizofrenia relacionado con la edad paterna avanzada, mayores de 35 años, en el momento de nacimiento de la descendencia (101). Esta asociación se ha atribuido al incremento de mutaciones de *novo* en la descendencia debido a la mayor edad del progenitor (102). Por otra parte, estudios recientes asocian el uso del cannabis en adolescentes con un riesgo de dos a tres veces mayor de desarrollar esquizofrenia, incluso en usuarios de baja frecuencia (103).

1.2. Farmacología de la esquizofrenia

1.2.1. Antipsicóticos de primera y segunda generación

Los antipsicóticos son la principal, y hasta ahora la única, clase de fármacos con eficacia comprobada en el tratamiento de la esquizofrenia. Su origen se remonta a los inicios de la década de los 50, con la síntesis de la clorpromazina por la compañía farmacéutica francesa Rhône-Poulenc y su introducción en la práctica clínica en Francia en el año 1952 (104). En la actualidad, existen más de 80 moléculas aprobadas para uso clínico por los organismos internacionales de salud (105).

Se establece una distinción entre los primeros fármacos desarrollados, llamados APs de primera generación o típicos, y los más recientes, que se denominan APs de segunda generación o atípicos. Estos últimos se introdujeron en los años 90, con la comercialización de la clozapina, y presentan una menor incidencia de efectos adversos extrapiramidales y una mayor prevalencia de efectos metabólicos que los fármacos típicos.

Identificar a los pacientes que no responden al tratamiento y comprender la variabilidad en la eficacia y en los efectos adversos sigue siendo un importante tema de estudio (106). De momento, no existen biomarcadores específicos que faciliten la elección del tratamiento más adecuado para el paciente (107). El proceso de prescripción se basa en la experiencia clínica y en la estrategia del ensayo y error del profesional médico, apoyado con guías de buena práctica clínica que ayudan al experto a tomar mejor sus decisiones.

1.2.2. Mecanismos de acción

La mayoría de los APs actúan bloqueando los receptores dopaminérgicos postsinápticos de la familia D₂ causando la inhibición de la neurotransmisión dopaminérgica dependiente de estos receptores. Concretamente, el bloqueo a nivel de la vía mesolímbica se ha asociado con la capacidad de los APs de reducir la sintomatología positiva (108). Sin embargo, esta acción a nivel de la vía nigroestriatal y tuberoinfundibular se relacionan con la aparición de efectos adversos como los efectos extrapiramidales y el incremento de la secreción de prolactina, respectivamente. Para que haya un efecto AP, el nivel de ocupación óptimo de los

receptores D₂ debe ser de aproximadamente el 60 - 80% (109,110). Por otro lado, estos mismos estudios también establecen un umbral de entre el 74% y el 82% de ocupación de receptores D₂ para la sintomatología extrapiramidal (109,111). Esto implica que la dosis se debe ajustar a la ventana terapéutica del AP para conseguir que el tratamiento sea eficaz a la vez que no suponga experimentar efectos adversos. Debemos tener en cuenta que existe una amplia variación en la ocupación del receptor D₂ entre pacientes que toman la misma dosis de AP e incluso en diferentes etapas del mismo individuo (primer episodio frente a crónico) y fases de la enfermedad (recaída frente a remisión). Por lo tanto, los umbrales, aunque generalmente son precisos, no son una medida útil para pronosticar la eficacia del tratamiento ni para predecir el desarrollo clínico (112), lo que sugiere que este antagonismo de los APs por los receptores D₂ por sí solo no puede explicar la eficacia terapéutica (109,113). En los últimos años han aparecido fármacos con mecanismos de acción en receptores dopaminérgicos diferentes al característico antagonismo en los receptores D₂. Estos mecanismos alternativos incluyen el antagonismo de D₁, el antagonismo de D₄, la mayor afinidad por el bloqueo de D₃ que D₂, la disociación rápida de los receptores D₂ y, por último, el agonismo parcial de D₂ (114). El aripiprazol es un fármaco representativo de este último mecanismo de acción, que modula la neurotransmisión dependiendo de los niveles sinápticos de dopamina (115), actuando como agonista si los niveles del neurotransmisor son bajos y como antagonista si son elevados (116). Se ha comprobado que algunos de estos mecanismos por sí solos, como el antagonismo puro de los receptores D₁, no muestran ningún efecto AP, pero podrían contribuir al efecto terapéutico al modular de forma simultánea y conjunta otros receptores (117).

El interés en el papel de la serotonina en la acción de los fármacos APs se basa principalmente en que algunos de estos fármacos atípicos son potentes antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} y tienen menor actividad como antagonistas D₂ (118,119). La serotonina inhibe la liberación de dopamina en la sustancia negra, con lo que bloquea la liberación dopaminérgica en el estriado y la corteza (120). Según Meltzer, este antagonismo de 5-HT_{2A} aumentaría la transmisión dopaminérgica, lo que explicaría la reducción de la sintomatología extrapiramidal y podría mejorar los

síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (118). Esta hipótesis tiene sus limitaciones, pues si bien parece aplicarse para la mayoría de APs de segunda generación, algunos como la amisulprida no tienen afinidad por el receptor 5-HT_{2A} (121), o bien el aripiprazol que tiene una mayor afinidad D₂ que 5-HT_{2A} (115,122) y ambos clínicamente tienen un perfil de AP atípico. Esto sugiere que únicamente el antagonismo de 5-HT_{2A} no explica la eficacia de los APs de segunda generación, lo cual se confirma dada también la falta de eficacia del M-100907, un antagonista selectivo de 5-HT_{2A}, en monoterapia (123). De los otros receptores serotoninérgicos con posibles implicaciones en la acción AP, el bloqueo del receptor 5-HT_{2C} y el agonismo parcial de los receptores 5-HT_{1A} son los que más se han estudiado (124), aunque también pueden tener cierta importancia el antagonismo de 5-HT₆ y 5-HT_{7A} (125). Destacar el agonismo en 5-HT_{1A}, ya que la disfunción de este receptor, apunta a un papel importante en la esquizofrenia (126). Los receptores 5-HT_{1A} se distribuyen a nivel cerebral en dos grupos funcionales: a nivel presináptico en el núcleo del rafe donde actúan como autorreceptores en el cuerpo celular provocando una disminución en la velocidad de disparo de las neuronas serotoninérgicas, y a nivel postsináptico en regiones límbicas y corticales donde también atenúan la tasa de disparo (127). La actividad agonista parcial en 5-HT_{1A} podría mejorar los síntomas negativos y el deterioro cognitivo al aumentar la liberación de dopamina en la CPF.

Por otro lado, el antagonismo de receptores histaminérgicos (H₁, H₂ y H₃), se asocia con efectos sedantes y efectos adversos como la somnolencia y aumento de peso debido al incremento del apetito. También es conocida la capacidad de algunos APs de bloquear los receptores α 1-adrenérgicos, lo que produce efectos cardiovasculares y sedación, y de bloquear los receptores colinérgicos muscarínicos (M₁ y M₃) lo cual tiene un papel importante en la reducción de los efectos extrapiramidales (128).

La mayoría de los APs interactúan con una amplia gama de receptores para los que muestran una mayor o menor afinidad, como se puede observar en la **tabla 1**. Este perfil de unión a diversos receptores de algunos APs ha permitido estudiar alternativas farmacológicas para mejorar la eficacia del tratamiento. Paralelamente,

el planteamiento de teorías alternativas a la hipótesis dopaminérgica para explicar el trastorno de la esquizofrenia ha generado interés en nuevas dianas terapéuticas. El glutamato se planteó como una diana terapéutica con un importante potencial clínico. Los primeros intentos de descubrir un fármaco AP basado en la modulación del glutamato se centraron en mejorar la transmisión mediada por el receptor NMDA. Para ello, se investigaron agonistas de este receptor. Sin embargo, dado que el receptor NMDA media la neurotransmisión excitatoria rápida, su activación se asocia a una actividad excitotóxica y conlleva el riesgo de graves efectos adversos lo que les excluye del uso terapéutico (129). El descubrimiento de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) supuso una nueva opción farmacológica dirigida a modificar la neurotransmisión glutamatérgica (130). A diferencia de los receptores ionotrópicos de glutamato, los receptores mGlu están vinculados a proteínas G y median una transmisión sináptica más lenta que desempeña un papel modulador en el sistema nervioso central. Estos receptores se clasifican en tres grupos de acuerdo a la secuencia homóloga del ADN, la farmacología y el sistema de segundos mensajeros que activa. Investigaciones recientes sugieren el potencial clínico de utilizar receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 2 como dianas para desarrollar nuevos fármacos APs no dopaminérgicos, dados los pocos efectos adversos que presentan (131–134). Este grupo de receptores consta de los subtipos mGluR2 y mGluR3, que están ampliamente distribuidos en el cerebro y se encuentran preferentemente expresados a nivel presináptico en las terminaciones nerviosas, donde modulan negativamente la liberación de glutamato (**Figura 5**) (135–137). Actualmente, se plantea que el tratamiento de la esquizofrenia con un modulador alostérico positivo (MAP) de los receptores mGlu podría facilitar la activación del receptor por su agonista endógeno, lo que causaría una disminución de la liberación presináptica de glutamato, reduciendo así la excitotoxicidad y mejorando los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (134).

	Perfil de unión al receptor																	Riesgo metabólico						
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	H ₁	H ₂	H ₃	5-HT _{1a}	5-HT _{1b}	5-HT _{2a}	5-HT _{2b}	5-HT _{2c}	5-HT ₆	5-HT ₇	M ₁	M ₃	α ₁	α _{2A}	α _{2B}	α _{2C}	Aumento de peso	Glucosa	Lípidos	
Clorpromazina	++	+++	+++	+++	+++	+				+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+	+	++	++	+++	+++	+++
Haloperidol	+	+++	+++	+++		+			+	+				+			++	+	+	++	++	+	+	+
Aripiprazol		+++	+++	+	++		+++	+	+	++++	++	++	+	++	++		++	++	++	++	++	++	++	+
Cariprazina		++++	++++		++		+++	+	+	++++	+	++	++	+	+++	++	+++	++	++	++	++	+++	+++	++
Clozapina	+	+	+	+	+++		+			+++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++
Lurasidona	+	+++					+++			+++	+	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+
Olanzapina	++	++	++	++	+++	++		+		+++	++	++	+++	++	++	++	++	+	++	++	++	+++	+++	++
Paliperidona	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	++	+++	++	++	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Risperidona	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	++	++++	++	++		+++	++		+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++

Tabla 1. Perfil de unión al receptor y riesgo metabólico de los fármacos antipsicóticos.

Perfil de unión al receptor. El antagonismo y el agonismo inverso se indica de color azul mientras que el agonismo parcial con el amarillo. El número de signos + y la intensidad de color correlacionan con la afinidad de la unión. 100 < Ki < 1000: + asociación débil; 10 < Ki < 100: ++ asociación moderada; 1 < Ki < 10: +++ asociación fuerte y 1 > Ki: ++++ asociación muy fuerte. **Riesgo metabólico.** El número de signos + correlaciona con el riesgo de aumento de peso (máximo ++++), alteraciones de glucosa y lípidos (máximo ++). (Adaptado de Sjaafis y cols. 2018) (39).

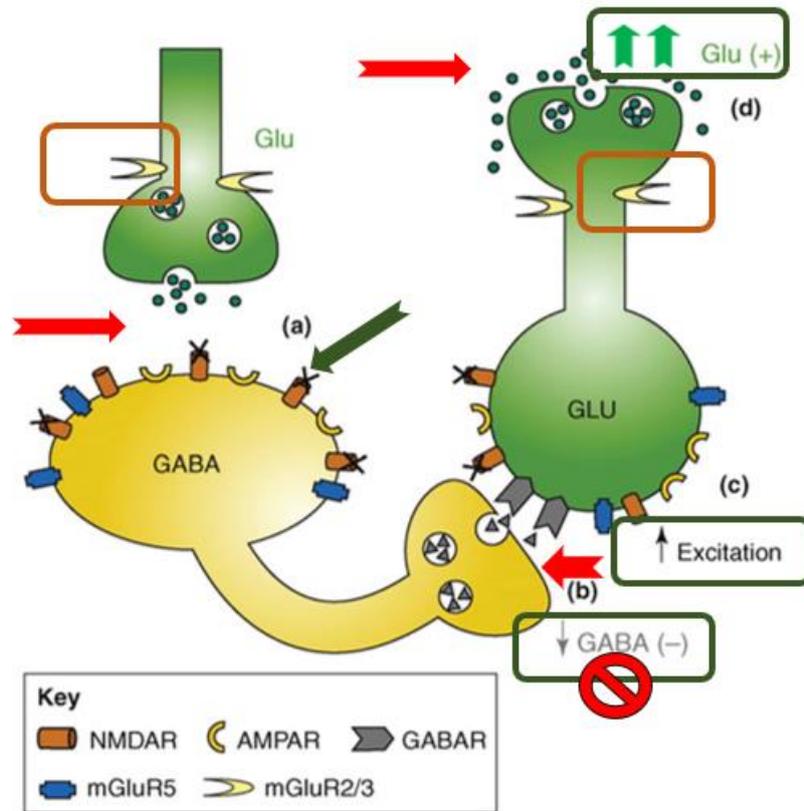


Figura 5. Modelo de microcircuito subyacente a la hipótesis de la hipofunción del receptor NMDA de la esquizofrenia.

Reducción de la transmisión excitatoria glutamatérgica mediante moduladores alostéricos positivos (MAPs) de receptores mGlu2. **a)** En condiciones normales, la activación de los receptores NMDA localizados en las neuronas de proyección GABAérgicas en regiones subcorticales, como el núcleo accumbens, proporciona un control inhibitorio sobre las neuronas talamocorticales glutamatérgicas excitatorias que se proyectan hacia las neuronas piramidales de la corteza prefrontal (CPF). **b)** La hipofunción o el bloqueo de los receptores NMDA en las neuronas inhibitoras GABAérgicas del mesencéfalo provocado por antagonistas NMDA como la ketamina da como resultado una disminución de la excitación de las neuronas inhibitoras GABAérgicas. **c)** Esta disminución de la excitación de las neuronas inhibitoras GABAérgicas conduce a la desinhibición de las neuronas glutamatérgicas talamocorticales que normalmente proporcionan información excitatoria a las neuronas piramidales de la CPF. **d)** Esta desinhibición de las neuronas glutamatérgicas en el tálamo da como resultado una mayor liberación de glutamato, una activación excesiva de los receptores de glutamato no NMDA y una mayor excitabilidad en las estructuras postsinápticas de la CPF, incluidas las neuronas piramidales. **e)** Los moduladores alostéricos positivos como el JNJ-46356479 se unen al receptor mGlu tipo 2/3, ubicado en las neuronas glutamatérgicas a nivel presináptico y regula e incrementa la actividad de este receptor que funciona como autorreceptor del glutamato. Al activarse inhibe el vaciado vesicular en el terminal presináptico, con lo que estas moléculas reducirían el estado hiperglutamatérgico y mejorarían los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia. NMDAR: Receptor de N-metil D-aspartato; AMPAR: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico, GABAR: Receptor del ácido γ -aminobutírico, mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato. (Adaptado de Conn y cols. 2008. (138))

1.2.3. Eficacia de los antipsicóticos

La eficacia clínica de los APs en la mejora de la funcionalidad de los pacientes con esquizofrenia ha demostrado en muchos ensayos controlados que les permite alcanzar una mayor calidad de vida (139). Su introducción en la clínica tuvo un impacto enorme y significativo en la cantidad de pacientes hospitalizados en psiquiátricos, principalmente pacientes crónicos. A causa de ello, hubo altas masivas de pacientes entre 1950 y 1970 (140). La introducción de los fármacos APs, permitió mejorar la actitud pública y profesional hacia la hospitalización de los enfermos mentales. A día de hoy, no existe una cura del trastorno, por lo que el tratamiento administrado debe mantenerse de por vida y tiene como objetivo reducir o atenuar la sintomatología para mejorar la calidad de vida del paciente, así como el riesgo a recaer. Existe aproximadamente un 20% de pacientes que no tendrán más episodios, pero es imposible de predecir las recaídas si el tratamiento es interrumpido (141). En cuanto a la adherencia al tratamiento, esta es deficiente, dado que solo el 60% de los pacientes muestra un adecuado cumplimiento del tratamiento (142).

El tratamiento con estos fármacos resulta esencial para la estabilización de pacientes con esta patología. Desafortunadamente no todos los pacientes responden al tratamiento. Si el paciente no responde al AP de primera elección dentro de las primeras 4 - 6 semanas de tratamiento, entonces se debe cambiar a otro AP con un perfil diferente de unión al receptor (143). No obstante, se estima que entre un 20 y un 30% de los pacientes son resistentes al tratamiento después del uso de varios APs (144). En este grupo de pacientes, el único fármaco que se ha mostrado eficaz en el control de los síntomas ha sido la clozapina, obteniendo una respuesta efectiva en un 30 - 60% de los pacientes resistentes (145,146).

Es importante destacar que la eficacia del tratamiento AP se muestra en el control de síntomas positivos tanto con el uso de APs de primera como de segunda generación. A pesar de que con la aparición de los APs de segunda generación se esperaba una mejora en el control de los síntomas negativos y déficits cognitivos, los datos empíricos actuales no apoyan esta hipótesis, sino que la mayoría resultan ineficaces en el tratamiento de estos síntomas (147).

Nuevos fármacos deben ser desarrollados para mitigar la sintomatología negativa y cognitiva de la esquizofrenia. En esta dirección y de importancia para esta tesis doctoral, los moduladores alostéricos positivos del receptor mGlu tipo 2, en los últimos años, han tenido un especial interés con el objetivo de proporcionar un fármaco que sea efectivo para esta sintomatología. Fármacos agonistas de los receptores mGlu2/3 han demostrado ser efectivos en estudios preclínicos en modelos animales de esquizofrenia (148,149). A pesar de que se han realizado ensayos clínicos prometedores con alguno de estos fármacos, ninguno de ellos ha alcanzado la fase 3 (150). Los esfuerzos actuales dado el interés en la activación del receptor mGlu2 se centran en el desarrollo de MAPs selectivos para este receptor. Estos MAPs se unen a un sitio alternativo, es decir, a un sitio topográficamente distinto al de unión del ligando natural.

1.2.4. Efectos secundarios de los antipsicóticos

Uno de los efectos secundarios más importantes de los APs, principalmente en los de primera generación, son los síntomas extrapiramidales. Tal como se ha comentado, su mecanismo de acción propuesto es el grado de ocupación por los APs de los receptores dopaminérgicos D₂ de la vía negroestriada. Las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales inhibirían las neuronas colinérgicas de esta región. Al bloquear los receptores D₂ se provoca un exceso de la actividad colinérgica y esto se ha asociado a efectos adversos como el parkinsonismo (151).

La introducción de los APs de segunda generación, con una menor afinidad por los receptores de dopamina, ha demostrado tasas más bajas de incidencia y gravedad del síndrome extrapiramidal que los APs de primera generación (152). El síndrome extrapiramidal se caracteriza principalmente por alteraciones en el movimiento y problemas en el control muscular. Podemos diferenciar los siguientes síntomas:

- Parkinsonismo: síntomas parecidos a los que se dan en la enfermedad del párkinson. El cuadro aparece a las pocas semanas de haber iniciado el tratamiento, y se caracteriza por disminución de la expresión facial, temblor, rigidez, hipertonía, bradicinesia, sialorrea, bloqueo postural y oscilación.

- Disonía: presencia de espasmos musculares e hipertonía de los músculos de la cara y el cuello.
- Acatisia: hiperactividad motora del paciente, implica inquietud, ansiedad y agitación.
- Discinesia tardía: movimientos involuntarios, anormales y repetitivos localizados principalmente en la región orofacial.

En la actualidad, existe un uso generalizado de APs de segunda generación, que están asociados con la aparición de alteraciones metabólicas como la obesidad, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión (153) que pueden conducir al síndrome metabólico (154), la diabetes tipo 2 y a enfermedades cardiovasculares graves (155–159). Aproximadamente un tercio de las personas con esquizofrenia tienen síndrome metabólico con una prevalencia de hasta el 69% en pacientes crónicos (160). Los trastornos metabólicos en la esquizofrenia aumentan con la duración de la enfermedad (161) y la edad (162). Este cuadro puede verse agravado por las alteraciones inducidas por el uso de APs, especialmente clozapina y olanzapina que presentan un mayor riesgo de desencadenar estas alteraciones. El desarrollo de sintomatología adversa reduce en gran medida el cumplimiento terapéutico que en este tipo de paciente resulta imprescindible para tener un buen pronóstico. Un cese abrupto de la medicación puede conducir a un episodio psicótico de inicio rápido distinto de la enfermedad subyacente, asociándose un riesgo cinco veces mayor de recaída durante un periodo de seguimiento de 5 años en comparación con pacientes que mantienen la adherencia a la terapia (163). Las recaídas sucesivas en la esquizofrenia se asocian con una disminución de la respuesta al tratamiento y posiblemente a un empeoramiento del proceso del trastorno (164). Por ello es importante mantener la misma medicación que fue eficaz en la fase aguda mientras sea bien tolerada. Por otro lado, la resistencia a la insulina que aparece en algunos pacientes tratados con APs podría explicarse por el incremento en la producción de ciertos mediadores como la leptina, la adiponeptina y los ácidos grasos libres, que modulan la secreción y sensibilidad a la insulina. (165). Esto conduciría a un estado de hiperinsulinemia, que daría lugar a una menor sensibilidad de sus receptores en los órganos diana, con la consiguiente disminución del uso de glucosa en estas

células. Esto último provoca una mayor demanda de insulina, que en fases tempranas podría ser corregido por la acción compensatoria de las células beta, que aumentarían la producción de insulina, pero en estados más avanzados estas células serían incapaces de mantener la secreción necesaria de esta hormona, dando lugar a la diabetes mellitus tipo 2 (166).

Los factores genéticos han demostrado tener un papel importante en el aumento de peso y el riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas en pacientes tratados con APs atípicos. Algunos de los genes asociados de manera consistente con el riesgo a padecer alteraciones metabólicas son: el receptor de serotonina (*HTR2C*), el receptor de melanocortina (*MC4R*), el gen de la leptina (*LEP*) o el neuropéptido Y (*NPY*) (167).

Existen discrepancias entre los diferentes estudios farmacogenéticos en relación a la predicción genética del aumento de peso y las alteraciones metabólicas inducidas por APs (167). Es importante investigar en este campo para confirmar el riesgo genético de las variantes asociadas. Hasta el momento no se ha desarrollado ninguna herramienta predictiva que nos permita identificar aquellos pacientes de alto riesgo a padecer un aumento de peso o alteraciones metabólicas inducidas por APs. Fenotipos como los efectos adversos de los APs son complejos y se deben a la interacción de múltiples genes. Dado que los factores genéticos de riesgo identificados hasta el momento no explican toda la variabilidad interindividual, es necesario incrementar el conocimiento de las causas moleculares del aumento de peso y de las alteraciones metabólicas para poder identificar nuevos genes candidatos que puedan estar implicados.

1.3. Modelos experimentales en la esquizofrenia

Actualmente, las personas con esquizofrenia reciben tratamiento farmacológico que se complementa con terapia psicosocial adaptada a las necesidades del paciente y al momento evolutivo de la enfermedad. A causa de la variabilidad en la respuesta a los APs durante el tratamiento, en ocasiones, es necesario cambiar de fármaco, ya sea por falta de respuesta al tratamiento o por los efectos adversos. Este proceso de cambio puede comportar dificultades y potenciales complicaciones (168,169), que junto a la falta de adherencia al tratamiento reducen la calidad de vida de los pacientes. Es por ello, que la investigación actual se centra en dilucidar la etiopatogenia, en desarrollar nuevos fármacos más seguros y eficaces a la vez que a esclarecer las diferencias interindividuales y las diferencias en la respuesta farmacológica tanto en eficacia como en efectos adversos, con el objetivo final de implantar un modelo de medicina personalizada para proporcionar a los pacientes el tratamiento más adecuado adaptado a sus características individuales.

La investigación en humanos es la fuente más fiable de conocimiento, se puede trabajar con muestras a nivel central con tejido *post mortem* y líquido cefalorraquídeo (LCR) y con muestras periféricas como muestras biológicas de tejido (biopsias), sangre periférica (células sanguíneas, plasma y suero), y muestras de orina y saliva. La investigación con seres humanos debe ajustarse a ciertas leyes, normativas, comités de ética y requerimientos, con el fin de no vulnerar los derechos de las personas. A causa de estas limitaciones, los tratamientos experimentales se deben testar antes en un modelo celular y animal, para reportar los datos de seguridad y eficacia.

Los modelos celulares y los modelos animales son de suma importancia para el estudio de las enfermedades psiquiátricas, ya que con ellos podemos examinar los mecanismos cerebrales subyacentes. Los modelos celulares permiten realizar estudios moleculares de desarrollo y fisiopatológicos con alta credibilidad, así como, los modelos de roedores presentan la ventaja de que son genéticamente muy homogéneos y nos permiten (considerando todas las normas de ética animal) hacer estudios invasivos que no se podrían realizar en humanos, con el fin de explorar cambios bioquímicos, moleculares o genéticos, entre otros. De ahí que validar

modelos celulares y animales sea una necesidad para la mejora de los tratamientos actuales.

Sin duda, los avances en estas líneas de investigación en el campo de la esquizofrenia van a permitir aplicar una medicina personalizada y de precisión (170). La idea subyacente es ofrecer a los médicos una guía que les permita personalizar el tratamiento de manera que la selección del tratamiento mejore en objetividad y los pacientes se beneficien de ello.

1.3.1. Investigación clínica

Durante los últimos años, gran parte de la investigación en pacientes se ha centrado en encontrar marcadores confiables en esquizofrenia que permitan la detección temprana, así como predecir la evolución de la enfermedad, la gravedad de los síntomas, la probabilidad de remisión, la eficacia y la aparición de efectos adversos inducidos por los APs. Estos marcadores incluyen tanto predictores clínicos como marcadores biológicos. Como variables clínicas importantes se han estudiado los siguientes parámetros: una duración más corta de la psicosis no tratada (171), una edad de inicio temprana (172), antecedentes de familiares con esquizofrenia (173), cociente de inteligencia (174), el consumo de estupefacientes y las puntuaciones en las diferentes escalas clínicas.

Sin embargo, en la actualidad seguimos sin disponer todavía de biomarcadores para la esquizofrenia por lo que es imprescindible seguir investigando en este campo para desarrollar indicadores de detección temprana y curso del trastorno. Con este objetivo se han examinado regiones específicas del cerebro, de las cuales se ha analizado su estructura cerebral mediante neuroimagen y se han realizado estudios de histopatología *post mortem*, imágenes cerebrales funcionales, transcripción de genes y polimorfismos genéticos (175,176). En estudios *post mortem* de cerebros humanos se han observado anomalías citoarquitectónicas, alteraciones neuroquímicas (177–180), y cambios estructurales (181), así como una disminución del tamaño neuronal (182,183) y de la densidad de las espinas dendríticas (184,185). Por otra parte, estudios de neuroimagen han reportado que pacientes con esquizofrenia muestran una activación reducida en diferentes áreas cerebrales

durante la realización de tareas de memoria de trabajo (186,187). Además, se han observado anomalías en los niveles de distintos marcadores como citoquinas y factores neurotróficos en sangre y LCR (188–190). Por otro lado, durante estos últimos años, la genética molecular se ha aplicado ampliamente en la búsqueda de genes implicados en la esquizofrenia. Mediante el estudio de genes candidatos o más recientemente estudios GWAS, el uso del ADN y el ARN de los pacientes en la investigación de posibles alteraciones genéticas mediante estudios de expresión y metilación que, junto al número creciente de perfiles de expresión de microRNA y de estudios de proteómica, ha permitido el incremento de la lista de genes de susceptibilidad candidatos para la esquizofrenia.

Otra área de investigación clínica es la farmacogenética, que es el estudio del modo en que los genes de una persona afectan la manera en que responde a los fármacos, que incluye la respuesta terapéutica y el riesgo de experimentar efectos adversos derivados de estos fármacos. Debido al posible papel de los factores genéticos en la eficacia y los efectos secundarios del tratamiento AP, como lo indican estudios de familiares y gemelos, la farmacogenética en la actualidad se ha convertido en un área importante de investigación en psiquiatría (191–193). En los últimos años, estos estudios han evolucionado considerablemente, pasando de estudios de genes candidatos, que examinan SNPs en genes concretos, seleccionados en base al conocimiento existente sobre la etiopatogenia de la esquizofrenia y la farmacocinética y farmacodinámica de los APs, a estudios de asociación de todo el genoma y el uso de puntuaciones de riesgo poligénico. Además, cabe destacar que el conocimiento más profundo de las bases genéticas y otros marcadores determinantes de la variabilidad interindividual entre pacientes con esquizofrenia nos permitirá personalizar el tratamiento basándonos en la mejor evidencia disponible de efectividad y tolerabilidad para cada paciente (194,195).

A pesar de los avances realizados, la heterogeneidad de la sintomatología y del curso de la enfermedad entre los pacientes con esquizofrenia limitan la identificación de marcadores diagnósticos y de respuesta. Por otro lado, existe una gran variabilidad en las definiciones de los fenotipos de respuesta entre los diferentes estudios, lo cual puede dificultar la obtención de resultados significativos en los análisis y que los

resultados sean difíciles de replicar. Por ello, resulta útil el estudio en pacientes con un PEP que, al no tener una evolución crónica, tienen una menor variabilidad en su exposición a los APs y, por lo tanto, facilitan el estudio de predictores de resultados terapéuticos. Así pues, identificar fenotipos que nos permitan salir de la medida dicotómica de algunas variables nos permitirá definir grupos más homogéneos para el estudio de la etiopatogenia de la esquizofrenia y la respuesta terapéutica. Por lo que, caracterizar subgrupos de pacientes que antes agrupábamos juntos nos permitirá avanzar hacia un tratamiento más preciso del trastorno (196).

1.3.2. Modelos experimentales *in vitro*

A causa de que el cerebro humano es inaccesible, excepto para estudios *post mortem*, son necesarios otros modelos biológicos para un estudio más profundo, que nos permita establecer la etiopatogenia de la esquizofrenia a través de la manipulación molecular y genética. Así como, ampliar el conocimiento de los mecanismos farmacológicos de los APs actuales y evaluar la acción de nuevos fármacos en desarrollo. La utilización de técnicas *in vitro* que implican el uso de un modelo celular nos permite realizar estudios moleculares, de desarrollo, fisiopatológicos y de susceptibilidad genética. En este tipo de investigación, es muy importante la selección del modelo *in vitro* más apropiado, aunque esta es una tarea difícil debido a la gran cantidad de opciones disponibles (197).

Un primer grupo de modelos son los que utilizan células no neuronales, como por ejemplo fibroblastos, linfocitos, eritrocitos o plaquetas, obtenidas directamente de pacientes. Entre ellos, destacar la utilización de cultivos primarios de fibroblastos, que son un tipo específico de célula del tejido conectivo que se encuentra en la piel, los tendones y otros tejidos duros del cuerpo, circunstancia que los hace accesibles y facilita su obtención. Otra ventaja de estas células diploides es el genotipo celular, ya que, al extraerse de pacientes, permite obtener un modelo que conserva la susceptibilidad genética interindividual. A causa de esto, los fibroblastos han sido ampliamente utilizados para el estudio de la esquizofrenia (198,199). Sin embargo, cabe señalar como principal desventaja de este modelo el hecho de estudiar células no neuronales, ya que es a nivel neuronal donde se espera mucha más traslación con

la esquizofrenia. Además, este tipo de cultivo primario tiene una duración finita, al final estos fibroblastos dérmicos humanos entran en fase de senescencia y pierden sus funciones especializadas, lo que produce la muerte del cultivo.

Otro modelo implica la obtención de modelos neuronales a partir de la diferenciación celular de células no neuronales procedentes de pacientes con esquizofrenia. Este proceso puede realizarse mediante la transdiferenciación directa de estas células, como en el caso de los fibroblastos por ejemplo o bien mediante la reprogramación previa de estas células a células madre pluripotentes inducidas y su posterior diferenciación en neuronas. Estas células madre pluripotentes inducidas se generaron por primera vez en el año 2006 mediante la administración retroviral de factores de transcripción de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) en células somáticas (200). Posteriormente, se desarrollaron técnicas para la conversión de fibroblastos y adipocitos (201). Inicialmente se utilizaron para modelar enfermedades con variantes genéticas de efecto fenotípico significativo. Sin embargo, actualmente se utiliza para modelar trastornos psiquiátricos y generar organoides específicos para pacientes. Hablamos de células adultas genéticamente reprogramadas. Éstas se pueden transformar en cualquier célula del cuerpo humano, incluidas las del sistema nervioso central (202). Algunas de las limitaciones a tener en cuenta en estos modelos es que su investigación implica el uso seleccionado de pocos casos y que los protocolos para optimizar las condiciones de aislamiento y diferenciación celular son complejos, costosos y no se encuentran caracterizados completamente. En neuronas inducidas a partir de fibroblastos de pacientes con esquizofrenia han mostrado una conectividad neuronal disminuida junto con un número reducido de neuritas, niveles de proteína PSD95, una expresión alterada de genes implicados en la neurotransmisión de glutamato, el monofosfato de adenosina cíclico y la familia de proteínas WNT (203). Las células madre pluripotentes inducidas también podrían usarse para estudiar las características del desarrollo neurológico *in vitro* de la esquizofrenia.

Otra opción son las neuroesferas. Reynolds y Weiss descubrieron que las células madre neuronales aisladas podrían formar cultivos esféricos flotantes que denominaron neuroesferas (204), aunque también es posible obtenerlas a partir de

células madre pluripotentes inducidas (205). Estos agregados celulares primarios que comprenden células madres neurales y células progenitoras son un modelo de cultivo tridimensional que nos permite determinar el potencial de diferenciación y proliferación de las células madre neurales, así como generar líneas celulares. Las neuroesferas son un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares de las anomalías del neurodesarrollo. Se ha reportado que las neuroesferas de las células madre pluripotentes inducidas de pacientes con esquizofrenia se diferenciaron un 10% menos en neuronas y alrededor del 12% más de lo normal en astrocitos (206). Sin embargo, tienen la desventaja de ser un modelo costoso y con unas condiciones de cultivo complejas, además de que puede producir mutaciones *de novo* que introducen heterogeneidad en el cultivo.

Otro grupo serían las líneas celulares neuronales, establecidas a partir de células tumorales humanas procedentes de una persona con neuroblastoma. Las líneas celulares continuas establecidas a partir de tumores humanos se utilizan ampliamente como modelos *in vitro*. Actualmente, las líneas celulares SK-N-SH y SH-SY5Y son de las más empleadas como modelo celular de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas (207). Estas células muestran características bioquímicas y funcionales de las neuronas, y expresan proteínas e isoformas proteicas que de forma natural no están presentes en los cultivos primarios de los roedores (208). Además, se pueden diferenciar en fenotipos neuronales dopaminérgicos, adrenérgicos y colinérgicos y su cultivo es sencillo, tiene un bajo coste y es altamente reproducible. No obstante, algunas de sus desventajas son: su origen tumoral, las mutaciones resultado de múltiples pasajes, la poca sensibilidad a las neurotoxinas y el hecho de no proceder de pacientes con esquizofrenia ya que no comparten el trasfondo genético y la susceptibilidad de estos pacientes.

Además de estos modelos de origen humano también pueden utilizarse modelos celulares obtenidos de animales (209,210). Su aplicación es extensa dentro de la biotecnología farmacéutica para la obtención de vacunas y anticuerpos, y en investigación permiten el estudio en células modificadas genéticamente.

En los últimos años se están desarrollando nuevos modelos celulares que incluyen, entre otros, la impresión celular en tres dimensiones (211), los organoides (212) y

los órganos en un chip (213). Estos últimos, se basan en sistemas celulares complejos que imitan en un dispositivo las características claves de composición y funcionalidad de los órganos. En el caso de los cerebros en un chip, será una herramienta muy valiosa para el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas, pero en la actualidad aún quedan por realizar avances sustanciales como la integración de diferentes tipos celulares, regiones y subunidades cerebrales.

1.3.3. Modelos experimentales *in vivo*

El uso de modelos experimentales animales, especialmente de roedores, resulta clave en la investigación neurobiológica y terapéutica de la esquizofrenia (214). Los modelos animales son muy valiosos como herramienta preclínica que puede utilizarse para investigar en profundidad las bases neurobiológicas de la esquizofrenia, monitorear el progreso de la misma y examinar el efecto de los fármacos. La aplicación de estos modelos tiene la ventaja de superar las limitaciones de utilizar humanos como objeto de investigación. A pesar de poderse utilizar modelos animales de diferentes especies, los ratones son el modelo *in vivo* más utilizado debido a que es el animal de laboratorio mejor caracterizado genéticamente. Su pequeño tamaño, fácil manejo, las amplias camadas, junto con períodos gestacionales cortos y la rápida madurez sexual, lo convierten en una especie óptima para la creación de modelos experimentales. Podemos clasificar los modelos existentes en cuatro categorías: los modelos genéticos, los de neurodesarrollo, los farmacológicos y los de interacción genético ambiental (215).

Los modelos genéticos se centran en estudiar en modelos animales los genes humanos hallados en estudios de ligamiento o asociación que se han relacionado con la esquizofrenia, con el fin de generar endofenotipos (216). Cabe destacar, que algunos de los modelos genéticos no se derivan de genes seleccionados de estudios epidemiológicos genéticos realizados en humanos, sino que en estos modelos las mutaciones se producen en genes que juegan un papel importante en la fisiopatología de la esquizofrenia, como los receptores de dopamina y glutamato. Estos modelos son muy útiles para la comprensión de los mecanismos moleculares del trastorno (217). Los genes candidatos identificados mediante estudios de

asociación genética tienen la ventaja de estar directamente involucrados en la esquizofrenia, por lo que son menos explorativos y tienen una mayor validación. Los modelos animales basados en mutaciones en genes candidatos más estudiados han implicado los genes: *DISC1*, *DTNBP1*, *ERBB4* y *NRG1*.

El gen *DISC1*, que codifica para la proteína disc1, juega un papel importante en la sinaptogénesis, neurogénesis y la migración neuronal (218–221). Con este gen existen modelos transgénicos, mutados y de haplotipo insuficiente. En ratones mutados para este gen se ha mostrado una reducción en el volumen cerebral y alteraciones en la corteza cerebral como una reducción del número de neuronas mostrando anomalías conductuales (222,223).

El gen *DTNBP1*, que codifica para la proteína disbindina, interviene en la función glutamatérgica y en el tránsito de neurotransmisores (224). Esta proteína es muy importante para estudiar las alteraciones en la liberación de neurotransmisores de la esquizofrenia (225), y se ha relacionado con los síntomas cognitivos (226). En ratones mutantes para esta proteína se han encontrado déficits en aprendizaje espacial y memoria (227).

También se han generado diversos modelos utilizando ratones con el gen inactivado (ratones *knock-out*) y transgénicos para *NRG1* (neurorregulina 1) y *ERBB4*, uno de sus receptores, la proteína tirosina quinasa receptora erbB-4. Estos ratones han mostrado un comportamiento y un rendimiento cognitivo similares a los de los pacientes con esquizofrenia (228). La inhibición de esta vía de señalización durante la adolescencia puede conducir a un estado dopaminérgico alto. Ambos son modelos útiles para la investigación de la patogenia de la esquizofrenia y el mecanismo de acción de los APs.

El modelo experimental animal del neurodesarrollo plantea que las lesiones tempranas, que pueden ocurrir durante la gestación, en el periodo perinatal o durante el segundo trimestre, dañan el cerebro en desarrollo y activan circuitos neuronales patológicos (229), lo que conduce a la aparición y curso de la esquizofrenia. Basándose en la hipótesis del neurodesarrollo, se utilizan procedimientos que reproducen los factores de riesgo de la esquizofrenia, entre

ellos, lesiones cerebrales (230–232), aislamiento social (233), agentes antimitóticos (234,235), respuesta inmunológica (236), déficit nutricional (237), hipoxia (238) y estrés prenatal (239,240).

Los modelos de lesión cerebral proponen principalmente traumatismos en tres regiones diferentes, la amígdala, el hipocampo ventral y la CPF. Es un modelo con alta validez aparente y predictiva ya que reproduce los tres dominios sintomáticos de la enfermedad, sin embargo, su principal inconveniente es la dificultad técnica, principalmente en la cirugía necesaria para la lesión (240), y la falta de validez de constructo, la esquizofrenia es una enfermedad compleja que no se debe a una lesión directa en una región específica.

El modelo de aislamiento social consiste en mantener en soledad un conjunto de animales (grupo de aislamiento) del resto de la camada (grupo control) por un periodo de tiempo variable según el protocolo utilizado. Es un modelo que debido a la necesidad de un periodo de aislamiento requiere tiempo. Sin embargo, se trata de un modelo que no es invasivo, con lo que es sencillo de realizar. En estudios con ratas este modelo ha permitido encontrar cambios estructurales, concretamente una reducción en el volumen de la CPF y en la plasticidad sináptica de la corteza y del hipocampo (233). Es un modelo que reproduce todos los síntomas de la esquizofrenia (241).

Otro modelo del neurodesarrollo implica la administración de agentes antimitóticos, como el metilazoximetanol y el arabinósido de citosina, siendo el primero el más utilizado. Se fundamenta en la relación entre la esquizofrenia y daños sutiles en el segundo trimestre del desarrollo fetal que afectan el desarrollo del sistema nervioso. Esta mitotóxina se administra en ratones gestantes para producir lesiones en el ADN de los fetos que afectan a la proliferación del sistema nervioso central. Por las alteraciones inducidas, el día 17 de gestación se ha establecido como el momento estándar para este modelo (242). Se ha relacionado con síntomas positivos, negativos y cognitivos. Aunque existen discrepancias en los resultados encontrados en relación con las deficiencias cognitivas (241).

Por otro lado, los modelos del desarrollo que utilizan ácido poliinosinico-policitidílico (poli (I-C)) y lipopolisacáridos se fundamentan en la activación de una respuesta inmunológica viral o bacteriana en la madre, sin utilizar patógenos (243). Pretenden probar la hipótesis de que las infecciones durante el embarazo constituyen un factor de riesgo para presentar desórdenes en el neurodesarrollo (244). Por un lado, el Poli (I-C) es un análogo sintético de ARN de doble cadena, estructuralmente similar al presente en algunos virus, y por otro, los lipopolisacáridos son endotoxinas liberadas por bacterias. En ambos casos, la inyección uterina prenatal de estas sustancias desencadena una reacción inmunológica en la madre, provocando que la descendencia de estas hembras tratadas presente deterioro social y alteraciones neuroquímicas similares a las observadas en la esquizofrenia (215). Estos modelos tienen la ventaja de no utilizar patógenos por lo que no necesitan medidas rigurosas de bioseguridad (243).

Los modelos farmacológicos se centran en estudiar los mecanismos moleculares de la esquizofrenia. Existen dos modelos que incluyen el dopaminérgico y el glutamatérgico. El primero de ellos se basa en la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, que plantea que la psicosis presente en la enfermedad es debida a un aumento en la neurotransmisión dopaminérgica, ya que sustancias que provocan hiperdopaminergia como las anfetaminas y la apomorfina también causan psicosis en individuos sanos, mientras que las drogas que disminuyen la neurotransmisión de dopamina provocan lo opuesto (245). Por ello, este modelo se genera mediante la administración de estas sustancias, que como agonistas del receptor de dopamina incrementan los niveles del neurotransmisor en la hendidura sináptica mediante el bloqueo de su recaptación, lo que provoca un estado hiperdopaminérgico. Es un modelo útil para mimetizar la sintomatología positiva, pero no para evaluar los síntomas negativos y déficits cognitivos para los que actualmente carecemos de tratamientos eficaces y existe una necesidad clínica no satisfecha (57).

El segundo modelo farmacológico se basa en la hipótesis glutamatérgica y propone que el bloqueo de los receptores NMDA causan psicosis además de otros síntomas (225). Los antagonistas no competitivos de los receptores NMDA, como la ketamina, la fenciclidina y el MK-801, provocan una disfunción en el sistema

glutamatérgico y pueden replicar eficazmente ciertos aspectos de las alteraciones negativas y cognitivas asociadas con la esquizofrenia en roedores (246) y en primates no humanos (247). Además, producen cambios neuropatológicos como la reducción de las interneuronas PV+ en la CPF y en el hipocampo (248–251), hallazgos que también se han encontrado en estudios con cerebros *post mortem* de pacientes con esquizofrenia en comparación con controles sanos (252,253).

Hasta la fecha, existen diferentes modelos que mimetizan para la sintomatología negativa y déficits cognitivos en esquizofrenia basados en la administración subcrónica de antagonistas de los receptores NMDA (254). Entre las diferentes condiciones experimentales para generar estos modelos, por lo que respecta a las dosis, tiempo de tratamiento, cepas y edades utilizadas, la edad de exposición al antagonista de NMDA (255) es uno de los factores más importantes, puesto que se han reportado datos contradictorios sobre los cambios de PV+ (256) dependientes de la edad de los animales. La mayoría de los estudios que han utilizado antagonistas de los receptores NMDA se han realizado en la edad adulta. No obstante, hay un grupo de estudios que se han centrado en evaluar los efectos del bloqueo de los receptores NMDA en el período neonatal (249,257–260). Esta estrategia es especialmente interesante ya que combina el modelo farmacológico con la teoría del neurodesarrollo, teniendo en cuenta la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia que plantea que los daños producidos durante el desarrollo del cerebro pueden contribuir a la aparición de la enfermedad en la edad adulta temprana. La exposición en ratones a antagonistas de los receptores NMDA en periodos neonatales puede inducir diferencias en los niveles de deterioro cognitivo durante la edad adulta, dependiendo de la ventana temporal específica de exposición al fármaco. Parece que la alteración en el desarrollo cerebral durante el período postnatal temprano (días postnatales 7 a 11), en comparación con los días postnatales posteriores, impacta tanto en la CPF como en el hipocampo durante la edad adulta, lo que afecta al desempeño cognitivo y social en una amplia gama de tareas conductuales (261). Las dos primeras semanas postnatales en roedores corresponden al segundo trimestre del embarazo en humanos, período en el que

factores epigenéticos transitorios o la exposición a agresiones ambientales aumentan la probabilidad de desarrollar esquizofrenia en la edad adulta (258).

En ocasiones, se utiliza un modelo de interacción genético ambiental que integra los modelos genéticos y del neurodesarrollo, generando un modelo de doble impacto. Estos modelos pretenden reproducir distintos mecanismos implicados en la etiopatogenia de la esquizofrenia. A pesar de que es un modelo más complejo son un modelo muy prometedor (262).

Por otro lado, los modelos animales también son útiles para valorar la seguridad de los APs. Aunque el uso de cepas consanguíneas, que presentan uniformidad genética, no es representativo de la heterogeneidad existente en la población, la comparativa de cepas consanguíneas que presentan distinta susceptibilidad a padecer los diferentes efectos adversos inducidos por los APs puede ser útil para llevar a cabo estos estudios.

En cuanto a la sintomatología extrapiramidal se ha evaluado la sensibilidad de diferentes cepas de ratón para desarrollar esta sintomatología en relación con su capacidad para metabolizar los APs (263). De entre las diferentes cepas más comunes, se identificó los ratones A/J como cepa susceptible y los DBA/2J como resistentes presentando en ambos casos una actividad metabólica similar. Estas dos cepas se han utilizado en estudios previos que mostraron diferencias entre las cepas en respuesta a la misma dosis de AP, evidenciando la importancia de la genética en la vulnerabilidad para padecer, en este caso, sintomatología extrapiramidal inducida por APs (264,265). Otro modelo utilizado en el estudio de la sintomatología extrapiramidal es el modelo de catalepsia inducida por haloperidol en roedores, en el que se valora el efecto protector o facilitador del tratamiento estudiado en la aparición y mantenimiento de alteraciones motoras (266,267).

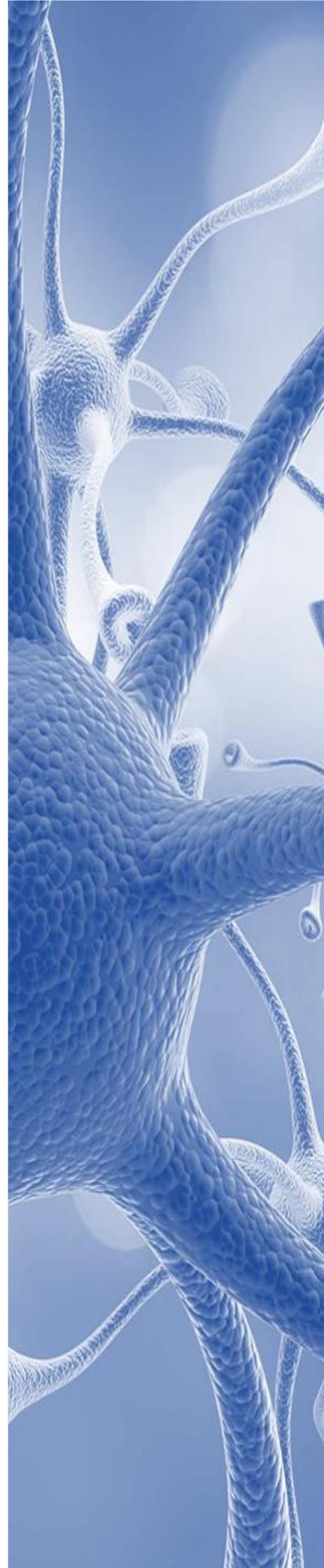
Los principales modelos de roedores utilizados para el estudio de la obesidad y el síndrome metabólico son los modelos modificados genéticamente, siendo los más comunes los animales monogénicos (mutación ligada a un solo gen) y los modelos de obesidad inducida por la dieta. En el primer grupo destacar los ratones mutados ob/ob (268), que no producen leptina, la hormona responsable de la saciedad, por

lo que debido a un incremento en la ingesta dietética presentan un fenotipo obeso temprano, caracterizado por hiperfagia, hiperinsulinemia, hiperglucemia moderada y resistencia a la insulina, así como hipotiroidismo (269). Un modelo más sencillo se basa en la modificación de la dieta que se le administra al animal. En humanos, la dieta moderna suele estar compuesta por un alto nivel de grasas y carbohidratos. Por ello, los estudios en roedores que se basan en estas dietas, modifican la cantidad de componentes utilizados, así como su origen, lo que puede alterar el fenotipo del animal (270) y terminar desarrollando un modelo de obesidad. En general, las dietas con altos niveles de fructosa imitan la dieta humana y, cuando se asocian con un alto contenido de grasas, promueven el aumento de peso, la grasa abdominal, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia en ratones (271). La fructosa parece ser importante en el desarrollo del síndrome metabólico, así como en la propia obesidad, ya que este azúcar conduce no solo a la resistencia a la insulina, sino también a la resistencia a la leptina, lo que resulta en un aumento de peso (272,273). Con este planteamiento podríamos analizar el efecto de un AP en dos grupos claramente diferenciados y similares dentro de ellos. Comparando un grupo de riesgo o susceptible con un grupo control.

A pesar de que los modelos expuestos permiten el estudio de los efectos adversos de los APs en modelos en los que previamente se ha inducido estas alteraciones motoras o metabólicas para el estudio posterior de la seguridad de los APs. También se suelen utilizar animales saludables de líneas genéticamente estandarizadas que permiten profundizar en los mecanismos de estos efectos sin la susceptibilidad genética o efectos ambientales (274,275).

2.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La presente tesis se ha realizado en base a dos hipótesis diferenciadas relacionadas con la seguridad y la eficacia de los fármacos utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia:

Hipótesis 1: Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (Estudio 1).

No conocemos con claridad los mecanismos por los cuales algunos de los APs de segunda generación llegan a inducir síndrome metabólico. Es necesario realizar más estudios para intentar identificar los mecanismos subyacentes y determinar predictores robustos de las alteraciones metabólicas inducidas por estos fármacos. Esto contribuirá a la identificación de aquellos sujetos con mayor riesgo de desarrollar este efecto adverso, con el fin de llevar a cabo una selección más adecuada del AP y, por ende, disminuir la aparición de estas alteraciones mejorando así el cumplimiento terapéutico y el pronóstico del paciente.

En concreto, en relación con el síndrome metabólico inducido por APs la presente tesis plantea las siguientes hipótesis:

- a. El tratamiento con APs que inducen síndrome metabólico provocará cambios en la expresión de determinados genes en diferentes tejidos potencialmente relacionados con este efecto adverso.
- b. Los diferentes APs que inducen síndrome metabólico presentarán mecanismos moleculares comunes, afectando a procesos biológicos que podrían dar lugar a alteraciones metabólicas.
- c. La susceptibilidad a padecer estos cambios de expresión génica inducidos por los APs estará en parte determinada por la presencia de determinados polimorfismos en dichos genes. Los niveles de expresión predichos a partir de esta información genética se asociarán con las alteraciones metabólicas inducidas por APs.

Hipótesis 2: Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (*Estudios 2, 3 y 4*).

Dado que el tratamiento con los APs actuales presenta efectos secundarios y solo resulta efectivo en el control de los síntomas positivos de la esquizofrenia, con poco efecto sobre los síntomas negativos y cognitivos, a excepción posiblemente de la clozapina, es necesario desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de este trastorno. En base a la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia, el tratamiento con fármacos moduladores de la acción del glutamato, como el JNJ-46356479, que inhibe la liberación presináptica de glutamato, puede desempeñar un papel neuroprotector, mejorando la sintomatología negativa y cognitiva de la esquizofrenia.

En relación a los efectos de este fármaco, la presente tesis presenta las siguientes hipótesis:

- a. El JNJ mostrará un efecto neuroprotector, similar o superior a la clozapina, contra la apoptosis y la muerte celular basales y las inducidas por el exceso de glutamato y dopamina a nivel neuronal.
- b. El tratamiento con JNJ en ratones adultos resultará eficaz a la hora de revertir las alteraciones neuropatológicas y cognitivo-conductuales en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la administración postnatal de ketamina.
- c. El tratamiento precoz con JNJ, en etapas correspondientes a la fase prodrómica de la enfermedad, será efectivo, de forma similar o superior a la clozapina, para revertir las alteraciones cognitivo-conductuales inducidas en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la administración postnatal de ketamina.

2.2. Objetivos

Los siguientes objetivos han sido propuestos para dar respuesta a las hipótesis descritas en el apartado anterior.

Objetivo 1: Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (*Estudio 1*).

- a. Identificar cambios de expresión génica en ratón inducidos por el tratamiento AP con risperidona u olanzapina en cuatro tejidos potencialmente relacionados con procesos metabólicos (hígado, páncreas, tejido adiposo y estriado).
- b. Identificar procesos biológicos comunes y potenciales genes candidatos relacionados con el desarrollo de alteraciones metabólicas inducidas por el tratamiento AP, en base a los cambios de expresión génica identificados en los animales.
- c. Estudiar la asociación de los niveles de expresión en los genes identificados, predicha a partir de la información genética, con las alteraciones metabólicas en una cohorte longitudinal de pacientes con un PEP tratados con APs.

Objetivo 2: Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (*Estudios 2, 3 y 4*).

- a. Valorar el efecto neuroprotector del JNJ, en comparación con clozapina, a nivel de la apoptosis y la muerte celular basales y las inducidas por la exposición a altas concentraciones de dopamina o glutamato en una línea celular de neuroblastoma (*Estudio 2*).
- b. Evaluar el efecto del tratamiento con JNJ en ratones adultos a nivel cognitivo-conductual e histológico-molecular en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la administración postnatal de ketamina (*Estudio 3*).
- c. Evaluar el efecto del tratamiento precoz con JNJ, en comparación con clozapina, sobre las alteraciones cognitivo-conductuales en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la administración postnatal de ketamina (*Estudio 4*).

3.

MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se resumen los principales aspectos metodológicos referentes a los modelos de experimentación, los fármacos utilizados y los procedimientos realizados. Esta sección se describe de manera detallada en cada uno de los estudios que componen el trabajo de la presente tesis doctoral.

3.1. Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (*Estudio 1*)

3.1.1. Animales de experimentación y fármacos utilizados

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona y autorizados por el Departamento de Territorio y Sostenibilidad de la Generalitat de Catalunya (Proyecto de experimentación autorizado con número de orden 9654).

Se utilizaron un total de 24 ratones C57BL/6J0laHsd, machos y hembras de 8 semanas de edad. Los ratones fueron tratados crónicamente durante 28 días con una inyección subcutánea diaria. Aleatoriamente se dividieron en tres grupos experimentales: vehículo (solución salina con un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y un 5% de Tween 20), risperidona (1 mg/kg) y olanzapina (3,5 mg/kg) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Cada grupo incluyó 8 animales (4 machos y 4 hembras) (*Figura 6*).

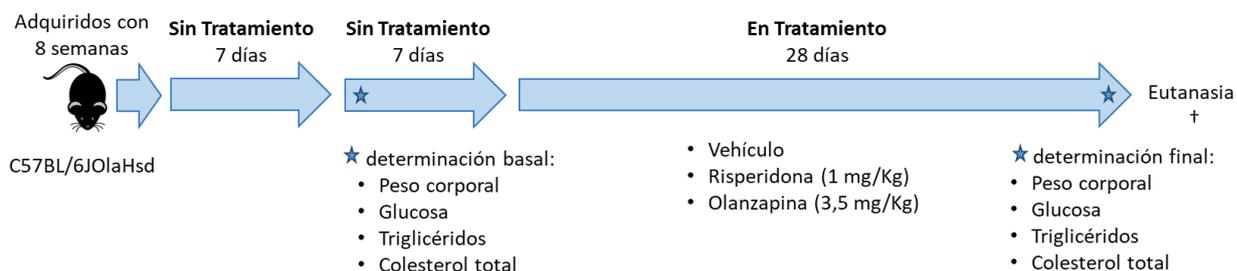


Figura 6. Protocolo experimental del modelo animal del *Estudio 1*.

3.1.2. Evaluación metabólica en ratones

Se evaluaron parámetros metabólicos en todos los ratones a nivel basal (una semana antes del inicio del tratamiento) y a los 28 días de tratamiento, incluyendo: peso

corporal, niveles de glucosa en sangre, niveles de colesterol total y niveles de triglicéridos. Los niveles de glucosa se midieron por la mañana, después de 6 horas de ayuno, utilizando un glucómetro AlphaTRAK®2 (Zoetis, Parsippany, NJ, USA). Para el análisis de los niveles de colesterol total y los triglicéridos, se obtuvieron entre 80 y 100 µl de sangre, a través de una punción en la vena caudal lateral de la cola, que se analizaron con el kit de colesterol líquido y el kit de triglicéridos líquidos (Química Clínica Aplicada S.A., Tarragona, España), respectivamente. Los valores de absorbancia se leyeron a 505 nm en un lector de microplacas Tecan Spark® 20 M (Tecan, Männedorf, Suiza). Se calculó el porcentaje de cambio de cada parámetro entre ambas medidas.

3.1.3. Análisis de expresión génica en ratones

Después de 28 días de tratamiento, los ratones fueron eutanasiados por decapitación al cabo de una hora de recibir la última inyección farmacológica. Se obtuvieron muestras de cuatro tejidos (hígado, páncreas, tejido adiposo visceral y estriado), por su potencial relevancia en el desarrollo de efectos metabólicos inducidos por APs. De estos tejidos se extrajo ARN total utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies, Foster City, CA, USA) y se purificó con el sistema miniprep de extracción de ARN miTotal™ (Viogene Biotek Corp., New Taipei City, Taiwan). La concentración y la calidad del ARN se midieron utilizando un espectofotómetro NanoDrop™ 2.000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) y para evaluar la integridad del ARN se utilizó un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Para el análisis de expresión mediante microarray, se enviaron un total de 1.200 ng de ARN purificado de cada muestra al Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik Microarray Technology (KFB, BioPark Regensburg GmbH, Alemania) para su marcaje e hibridación sobre una matriz Clariom™ S para ratón de Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), que comprende más de 221.000 sondas dirigidas a más de 22.000 genes.

El análisis de los datos consistió en la identificación de módulos y sus correspondientes genes altamente coexpresados, significativamente asociados ($p < 0,05$) con el tratamiento AP administrado (risperidona u olanzapina). Para ello se utilizó el paquete WGCNA (*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*) para

el software R (276). A continuación, utilizamos el programa FatiGO (277) del paquete Babelomics y los términos de ontología génica (278), para identificar los procesos biológicos en los que participan los genes incluidos en los módulos identificados. A partir de estos procesos seleccionamos aquellos relacionados con procesos y alteraciones metabólicas para su posterior análisis. Los genes incluidos en los procesos seleccionados se utilizaron para crear una red de interacción proteína-proteína para cada AP, mediante el programa SNOW (279) del Babelomics. Estas dos redes de interacción obtenidas de forma independiente para risperidona y olanzapina se fusionaron en una única red, utilizando la opción de intersección del programa Cytoscape 3.7.2 (280). Para cada proteína se calculó el grado de conectividad, con el fin de identificar las proteínas centrales más relevantes que puedan constituir potenciales genes candidatos.

3.1.4. Cohorte de pacientes con un PEP

La muestra comprendió 226 pacientes del proyecto PEPs (281) que fueron reclutados desde abril de 2009 a abril de 2011. En el proyecto participaron 16 centros nacionales de investigación y se coordinó desde la Unidad de Esquizofrenia del Hospital Clínic de Barcelona. Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían entre 7 y 35 años en el momento de la primera evaluación y una presencia de síntomas psicóticos de duración inferior a los 12 meses. El diagnóstico se realizó por psiquiatras de acuerdo con los criterios establecidos en el DSM-IV (282). A los participantes se les prescribió al menos un AP de segunda generación durante el período de seguimiento de seis meses y proporcionaron muestras biológicas para el genotipado. Al tratarse de un estudio naturalístico, no hubo directrices sobre el tratamiento administrado. Durante el período de seguimiento, el 40% de los pacientes fueron tratados con olanzapina o clozapina, fármacos que tienen un riesgo elevado de inducir aumento de peso o producir un empeoramiento de los parámetros metabólicos, mientras que a más de un 50% se les administraron APs con un riesgo intermedio o bajo de causar tales efectos secundarios, siendo la risperidona y el aripiprazol los más prescritos en este grupo. Los criterios de exclusión fueron: retraso mental según los criterios del DSM-IV, antecedentes de traumatismo craneoencefálico con pérdida de conciencia y enfermedad orgánica con repercusiones mentales.

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de Investigación Clínica de todos los centros clínicos participantes. Todos los sujetos incluidos en el estudio firmaron el consentimiento informado. En el caso de menores de 16 años, los padres o tutores cumplimentaron el consentimiento informado.

3.1.5. Evaluación metabólica en los pacientes con un PEP

Se registraron características antropométricas y metabólicas de los pacientes a nivel basal y a los 6 meses, incluyendo: peso corporal, índice de masa corporal, niveles de glucosa en sangre, niveles de colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y niveles de triglicéridos. Se calculó el porcentaje de cambio de cada parámetro entre ambas medidas.

3.1.6. Análisis de expresión génica predicha en los pacientes con un PEP

La sangre de los pacientes fue recogida mediante tubos EDTA y el ADN genómico fue aislado utilizando kits MagNA Pure LC ADN mediante el sistema automático MagNA Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La concentración y la calidad del ADN se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2.000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Las muestras fueron genotipadas en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen, Santiago de Compostela, España), utilizando matrices Axiom Biobank de Affymetrix que incluyen sondas para 758.740 SNPs. Mediante el software Axiom Analysis Suite (283) se extrajeron los resultados para la determinación de los genotipos. Estos se utilizaron para la imputación del resto de SNPs del genoma mediante el software Minimac4 utilizando el servidor de imputación Michigan (284). Todos los datos de genotipado se utilizaron para predecir los niveles de expresión génica para cada individuo a través del método de imputación PrediXcan (285). Concretamente, se predijo en cinco tejidos potencialmente relevantes para el desarrollo de alteraciones metabólicas inducidas por APs, incluyendo hígado, páncreas, tejido adiposo visceral y subcutáneo e intestino delgado, la expresión de los genes centrales previamente identificados en el análisis de microarray en muestras de ratones.

3.1.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software IBM SPSS Statistics (IBM Corp., Chicago, USA). Se evaluó la normalidad de las variables continuas mediante las pruebas de Kolmogórov-Smirnov y de Shapiro-Wilk. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para las variables continuas.

Las diferencias entre grupos en los parámetros metabólicos evaluados en ratones se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA). Al encontrar diferencias entre machos y hembras en algunos de los parámetros evaluados, el análisis se ajustó por género.

Para el análisis de los genes centrales en la cohorte de pacientes con un PEP, los niveles de expresión génica predichos del gen *EP300* se categorizaron como bajo, medio o alto según los tres valores de expresión génica obtenidos en cada tejido (-0,13, -0,07 y 0,00). Las diferencias en las variables metabólicas se analizaron mediante análisis de la varianza. Los análisis se ajustaron por las variables sociodemográficas y clínicas que pudieran afectar a los parámetros evaluados, incluyendo sexo, edad y potencia del AP (alta, baja o sin riesgo) de incrementar el peso o empeorar los parámetros metabólicos. Para la comparación por pares se utilizó la prueba *post-hoc* de Bonferroni.

3.2. Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (Estudios 2, 3 y 4)

3.2.1. Estudio *in vitro*: modelo celular (Estudio 2)

3.2.1.1. Cultivo celular y fármacos utilizados

La línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH se obtuvo de la organización American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 500 μ M de piruvato sódico, 50 unidades/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina. Los cultivos se mantuvieron en un

incubador humidificado a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días.

Las células se trataron con diferentes concentraciones de clozapina (Tocris Bioscience, Bristol, UK) y JNJ (Janssen, Beerse, Bélgica) solos o en combinación con altas concentraciones de dopamina y glutamato para inducir la apoptosis y la muerte celular. El grupo control se trató con vehículo (0,25% de DMSO) (**Figura 7**).

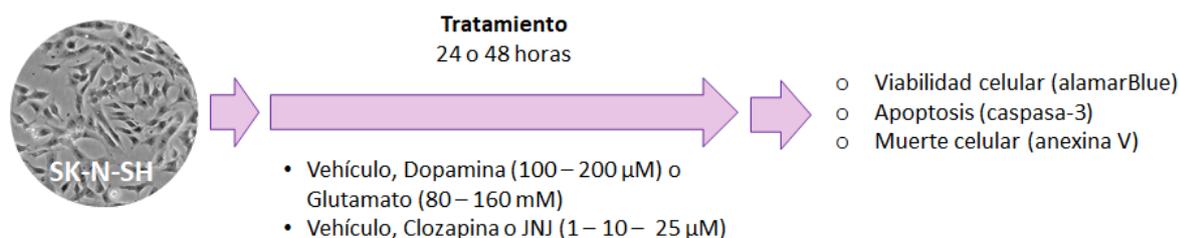


Figura 7. Protocolo experimental del modelo celular del *Estudio 2*.

3.2.1.2. Análisis de viabilidad celular mediante alamarBlue™

Las células SK-N-SH se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 150.000 células por pocillo y se trataron con diferentes concentraciones de clozapina o JNJ (1, 10 y 25 µM), administrados solos o en combinación con dopamina (100 µM) o glutamato (80 mM). Cada condición se evaluó por triplicado. La viabilidad celular se determinó con el uso de alamarBlue™ (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), que nos permite detectar la viabilidad de las células por conversión de la resazurina, un compuesto de color azul y no fluorescente, a resorufina, un compuesto de color rojo y altamente fluorescente, en respuesta a una reducción del reactivo que se produce en el interior de las células vivas. Después de 24 y 48 horas de incubación, se agregaron 50 µl de alamarBlue™ a cada pocillo y se incubó durante 2 horas. Los niveles de fluorescencia se midieron en un lector de microplacas Tecan Spark® 20 M (Tecan, Männedorf, Suiza). La fluorescencia se midió a 540 nm de excitación y a 590 nm de emisión. Cada medición se realizó al menos por duplicado. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de los controles (células tratadas con vehículo, dopamina o glutamato).

3.2.1.3. Análisis de apoptosis mediante caspasa-3

Las células SK-N-SH se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 120.000 células por pocillo hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. A continuación, se sustituyó el medio normal de cultivo por medio de cultivo con las diferentes concentraciones de clozapina o JNJ (1, 10 y 25 μ M), solos o en combinación con dopamina (200 μ M) o glutamato (160 mM). Cada condición se evaluó por triplicado. Después de 24 horas de tratamiento, se utilizó un kit fluorimétrico para cuantificar la actividad de la proteína caspasa-3 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). El ensayo se basa en la hidrólisis del péptido sustrato Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) por la caspasa-3, que provoca la liberación de la sustancia fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC). El sedimento celular se incubó en frío con 20 μ l de tampón de lisis durante 20 minutos. Los lisados se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 14.000 g. Se transfirieron 6 μ l de sobrenadante a una placa de 96 pocillos y después a cada pocillo se le añadieron 200 μ l de tampón de reacción que contenía el sustrato caspasa-3 (DEVC-AMC). Los niveles de fluorescencia se midieron en un lector de microplacas Tecan Spark® 20 M (Tecan, Männedorf, Suiza). La fluorescencia se midió a 360 nm de excitación y a 465 nm de emisión. Cada medición se realizó al menos por duplicado. La fluorescencia de los blancos se sustrajo de los valores obtenidos, y estos valores resultantes se convirtieron en actividad caspasa-3 utilizando la curva estándar para AMC. La actividad de caspasa-3 se normalizó en base al contenido de proteína total de los extractos celulares, que se cuantificaron mediante colorimetría con un kit para la cuantificación de proteínas (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Los resultados se expresaron como porcentaje de los controles (células tratadas con vehículo, dopamina o glutamato).

3.2.1.4. Análisis de la muerte celular utilizando anexina V mediante citometría de flujo

Se utilizó el ensayo de marcaje de membrana celular de anexina V para detectar la translocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular a la superficie externa como marcador de apoptosis. Además, se utilizó el yoduro de propidio para marcar el ADN en las células donde la membrana plasmática se había

visto comprometida como marcador de muerte celular. El ensayo se realizó con el kit de tinción Annexin-V-Fluos (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania).

Las células SK-N-SH se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 120.000 células por pocillo hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Después se sustituyó el medio normal de cultivo por medio de cultivo con las diferentes concentraciones de clozapina o JNJ (1, 10 y 25 μM), solos o en combinación con dopamina (200 μM) o glutamato (160 mM). Cada condición se evaluó por triplicado. Después de 24 horas de tratamiento se recogieron las células en suspensión, así como las células adheridas mediante tripsinización y conjuntamente se sedimentaron mediante centrifugación a 300 g durante 5 minutos. Tras dos lavados de las células con tampón fosfato salino, se resuspendieron un total de 200.000 células y se centrifugaron nuevamente a 300 g durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 100 μl de solución Annexin-V-Fluos y se incubó con 0,6 μl de anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y 1,2 μl de yoduro de propidio durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las muestras se mantuvieron en hielo y fueron analizadas mediante citometría de flujo con el sistema BD FACSCanto™ II (BD Bioscience, San José, CA, USA).

La fluorescencia se midió a 525/50 nm de emisión para FITC y a 610/20 para yoduro de propidio. FITC y yoduro de propidio fueron excitados con dos láseres diferentes a 488 y 561 nm, respectivamente. Se analizaron un mínimo de 10.000 eventos para cada muestra. Los datos se analizaron con la versión 10.1.5 del software FlowJo™ (BD Life Sciences, Ashland, OR, USA). Las células vivas presentaban poca o ninguna fluorescencia, las células en apoptosis temprana detectadas mediante la anexina conjugada con FITC mostraban una fluorescencia verde, las células apoptóticas en fase tardía presentaban una fluorescencia roja y verde y las células necróticas marcadas con yoduro de propidio una fluorescencia roja. Para cada situación experimental, se acotaron las subpoblaciones de interés en función de los respectivos controles (vehículo, dopamina o glutamato) y se delimitaron las regiones mediante cuadrantes.

3.2.2. Estudio *in vivo*: modelo animal (Estudios 3 y 4)

3.2.2.1. Animales de experimentación y fármacos utilizados

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona y autorizados por el Departamento de Territorio y Sostenibilidad de la Generalitat de Catalunya (Proyecto de experimentación autorizado con número de orden 9208). En todos los grupos experimentales se incluyeron números similares de machos y hembras.

Se utilizaron machos y hembras de la cepa de ratones C57BL/6J. En los días postnatales 7, 9 y 11 los ratones fueron expuestos por vía subcutánea a vehículo (salino) o ketamina (30 mg/kg) (286).

Para el estudio del tratamiento farmacológico en la adultez (*estudio 3*), se administró a los ratones por vía subcutánea vehículo (10% de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD)) o JNJ (10 mg/kg) diariamente a partir del día postnatal 80 durante 8 semanas. Se utilizaron un total de 52 ratones distribuidos en cuatro grupos experimentales: control (vehículo + vehículo, n = 13); JNJ (vehículo + JNJ, n = 11); KET (ketamina + vehículo, n = 15) y KET+JNJ (ketamina + JNJ, n = 13) (**Figura 8**).



Figura 8. Protocolo experimental del modelo animal del *Estudio 3*.

Para el tratamiento farmacológico precoz (*estudio 4*), durante el período adolescente del ratón, los animales se trataron entre los días postnatales 35 y 60 inclusive con vehículo (10% HP β CD y 5% DMSO), JNJ (10mg/kg) o clozapina (10mg/kg) administrados por vía subcutánea. Se utilizaron 73 ratones que se separaron en seis grupos de tratamiento: control (vehículo + vehículo, n = 12); JNJ (vehículo + JNJ, n = 12); CLZ (vehículo + clozapina, n = 13); KET (ketamina + vehículo,

n = 12); KET+JNJ (ketamina + JNJ, n = 12) y KET+CLZ (ketamina + clozapina, n = 12) (Figura 9).

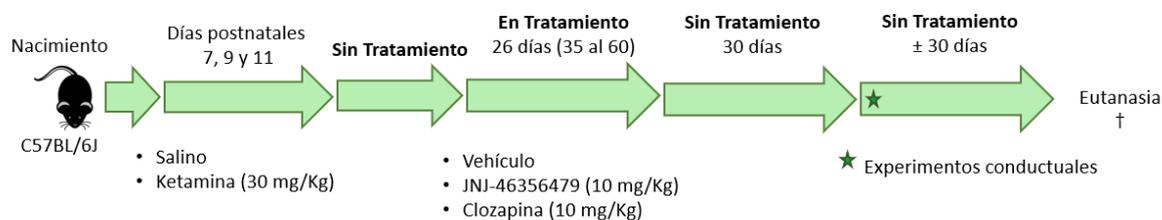


Figura 9. Protocolo experimental del modelo animal del Estudio 4.

3.2.2.2. Experimentos conductuales en ratón

Para valorar el efecto de los diferentes tratamientos farmacológicos en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la administración postnatal de ketamina, se llevaron a cabo diferentes evaluaciones conductuales en el ratón adulto, a partir del día postnatal 90. Todos los ratones realizaron las pruebas conductuales en el siguiente orden: una batería de pruebas motoras, el test del rotarod, el test de campo abierto, el laberinto en Y, la tarea de reconocimiento de objeto nuevo, la prueba de las tres cámaras, la prueba de memoria social de las cinco exposiciones y la prueba de condicionamiento del miedo. Para minimizar la posibilidad de respuestas alteradas por pruebas conductuales anteriores, los procedimientos más invasivos se realizaron los últimos.

La batería de pruebas motoras incluyó las siguientes subpruebas: a) reflejo visual de acercamiento, que valora la función cerebral y vestibular, evaluando la extensión de las patas delanteras en respuesta al acercamiento progresivo a una superficie plana mientras se sujeta a los ratones por la base de la cola; b) sensibilidad auditiva, donde se midió la respuesta de sobresalto a un estímulo auditivo repentino; c) prueba de enderezamiento, en la que se valora como aterrizaban los ratones en una superficie blanda después de dejarlos caer de una altura de 10 cm; d) fuerza de agarre, que cuantifica la resistencia a separarse de unas barras de aluminio al ser estirados de la cola; e) equilibrio, que mide la latencia de caída, en los dos primeros ensayos en una barra plana de madera y en los dos siguientes en una cilíndrica de aluminio ambas ubicadas a 40 cm de altura; f) reflejo prensil y capacidad de tracción, en la que se

midió la capacidad de los ratones para mantenerse agarrados a una varilla horizontal elevada durante 5 segundos y evaluando simultáneamente el número de patas traseras que el ratón fue capaz de levantar para cogerse mejor a la varilla; y g) coordinación motora mediante la prueba de la percha, donde se valoró la latencia a la caída, la latencia para alcanzar el extremo de la percha y la actividad realizada (desplazamientos) (287).

El test del rotarod se utilizó para valorar la coordinación motora y el equilibrio. Los animales se colocaron en los diferentes carriles giratorios del aparato a velocidades constantes (10, 25 y 40 rpm sucesivamente) durante un tiempo máximo de 1 minuto. El último ensayo de la prueba consistió en una aceleración progresiva continua. En cada uno de los ensayos se registró el tiempo de latencia para caer del rotarod (265).

El test de campo abierto se realizó para explorar la actividad locomotora, la conducta exploratoria y la ansiedad. Se evaluó durante 5 minutos la exploración libre de los ratones en un campo abierto de 55 cm x 55 cm. Se midió la distancia total recorrida, el tiempo en la periferia y en el centro del aparato, la velocidad media de la marcha que mantuvieron y las veces que se levantaron sobre sus patas traseras. Se utilizó el software Smart 3.0 (Panlab, Barcelona, España) de vídeo seguimiento para la evaluación automatizada de cada uno de los parámetros, excepto para el recuento de las veces que se levantaban sobre sus patas traseras, que se recogió manualmente.

El laberinto en Y se utilizó para medir la memoria de trabajo espacial. En la primera tarea se bloqueó aleatoriamente uno de los dos brazos del laberinto y se dejó a los ratones, durante 10 minutos, explorar libremente el resto del aparato. Después de un intervalo de 15 segundos, los animales se volvieron a introducir en el laberinto con todas las zonas accesibles, y se les dejó explorar durante 3 minutos, registrando el tiempo del animal dentro del brazo sin explorar y dentro del brazo familiar. Para la segunda tarea se encerró a los ratones durante 25 segundos en el brazo del laberinto en el que entraron primero para explorar. A continuación, se colocó nuevamente a los ratones en el punto de inicio permitiéndoles de nuevo hacer la elección del brazo donde entrar. Este proceso se repitió 3 veces y se determinó el porcentaje de alternancia (288).

La tarea de reconocimiento de objeto nuevo se utilizó para evaluar la memoria de trabajo. Inicialmente los ratones fueron habituados a un campo abierto durante dos días (5 minutos al día). Al tercer día, durante la fase de entrenamiento, se colocaron dos objetos idénticos en el interior del campo abierto y el ratón exploró en dos sesiones de 5 minutos esta situación experimental, con una demora entre sesiones de 5 minutos. Se registró el tiempo explorando cada objeto. Al cabo de 5 minutos se realizó la tercera sesión, donde uno de los objetos se había sustituido por uno nuevo con distinta forma y color. Se anotó el tiempo de exploración para cada objeto durante un período de 5 minutos (289).

El aparato de las tres cámaras se utilizó para valorar el paradigma de reconocimiento y memoria social. Los ratones se habituaron al aparato durante dos días (10 minutos al día), previos al día del experimento. En la primera fase se les presentó en uno de los compartimentos laterales un ratón ubicado dentro de una jaula (lado social) y en el otro un objeto con forma de ratón también presentado dentro de una jaula (lado no social) y se valoró el tiempo que los ratones estuvieron olfateando cada jaula durante un periodo total de 10 minutos. La segunda fase de la prueba se inició al cabo de 10 minutos durante los cuales los ratones se dispusieron en sus jaulas fuera del aparato. Esta consistió en probar la preferencia por la novedad social, ubicando en un lado al ratón familiar y en el otro al ratón nuevo de diferente camada. Se registró el tiempo que los ratones estuvieron olfateando cada jaula durante un periodo total de 10 minutos (290).

En la prueba de memoria social de las cinco exposiciones, los animales se individualizaron en jaulas durante al menos 24 horas previas al experimento. El día de la prueba, se presentó un ratón de estímulo en la caja del ratón en experimento durante 4 veces en exposiciones de 1 minuto de duración, con un intervalo de 10 minutos entre sesiones. Tras 10 minutos de la cuarta exposición se introdujo un nuevo ratón de estímulo durante 1 minuto en la jaula del animal experimental. Se registró el tiempo de interacción (definido como olfatear e investigar en las proximidades) con cada animal presentado.

En la prueba de condicionamiento del miedo, los ratones fueron individualizados en jaulas durante 72 horas previas a la prueba. El día del condicionamiento, con el

objetivo de aclimatar los ratones al aparato, se les dejó explorar libremente durante 3 minutos la cámara. Previamente se colocaron señales visuales para ubicar y orientar a los animales. En cada uno de los tres ensayos de 80 segundos, los ratones recibieron una descarga de 2 segundos con una intensidad de 0,6 mA en el segundo 38. El periodo entre ensayos fue de 25 a 40 minutos. Se calculó el porcentaje del comportamiento de congelación, observando cada 5 segundos si el ratón permanecía inmóvil, a excepción de la respiración, en los 40 segundos restantes después de recibir la descarga. Al día siguiente se evaluó el aprendizaje contextual, introduciendo de nuevo los ratones en la cámara durante 10 minutos en ausencia de descarga y valorando el comportamiento de congelación cada 30 segundos. Este último procedimiento se repitió durante 4 días consecutivos para valorar la extinción del condicionamiento.

3.2.2.3. Preparación del tejido e inmunohistoquímica

Al día siguiente de completar los experimentos conductuales, la mitad de los ratones de cada grupo fueron perfundidos 1 hora después de la última inyección del fármaco. Para la anestesia profunda, previa a la perfusión, se administró pentobarbital (50 mg/kg) por vía intraperitoneal. Para perfundir se utilizó solución salina tamponada con fosfato 1X seguida de paraformaldehído al 4%. A continuación, los cerebros se postfijaron en paraformaldehído al 4% durante toda la noche a 4°C y posteriormente se transfirieron a una solución con sacarosa al 30% y se almacenaron a 4°C durante 72 horas. Finalmente, se congelaron los cerebros en hielo seco y posteriormente se utilizó un criostato para realizar cortes coronales de 30 µm de espesor de todo el cerebro, que se conservaron a -20°C en solución crioprotectora.

El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo en diferentes secciones de cortes de la CPF y del hipocampo. Se utilizaron anticuerpos primarios policlonales anti-PV producidos en conejo (dilución 1:1.000) (Abcam, Cambridge, UK) y anti-c-Fos producidos en cobaya (dilución 1:500) (Synaptic Systems, Göttingen, Alemania). Los anticuerpos primarios fueron detectados utilizando anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con Alexa Fluor® 594 (dilución 1:1.000) (Life Technologies, Eugene, OR, USA) y anti-cobaya conjugados con Alexa Fluor® 488 (dilución 1:1.000) (Life Technologies, Eugene, OR, USA). Además, se realizó una tinción nuclear de 12 minutos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Calbiochem, Billerica, MA, USA)

en tampón fosfato 0,1 N para definir las estructuras anatómicas que fueron identificadas según el Atlas de Franklin y Paxinos (291). Los cortes se colocaron en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos utilizando medio de montaje. De cada animal se montó una serie de cortes de la CPF, que comprendió toda el área prelímbica e infralímbica, y una serie de hipocampo, que abarcó las áreas de giro dentado (GD) y los subcampos del *Cornu Ammonis*, CA1, CA2 y CA3.

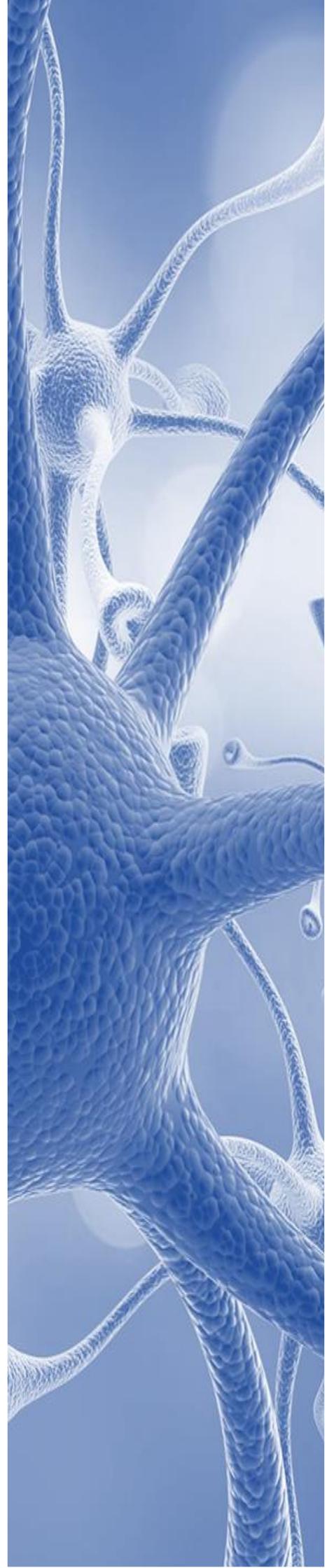
Se tomaron 6 imágenes aleatorias, de tamaño 387,5 x 387,5 μm , en el área prelímbica e infralímbica de la CPF medial utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con un objetivo de 20x. Para el análisis del hipocampo se recogieron 3 mosaicos de imágenes que abarcaban toda el área del hipocampo utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop 2 Plus (Zeiss, Oberkochen, Alemania) con el objetivo de 40x. Para el análisis de c-FOS en GD se utilizó el microscopio de fluorescencia Leica AF6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con un objetivo de 63x. Las imágenes fueron analizadas con el programa Image J. Se calculó la media de grises de PV y c-FOS en relación a DAPI en la CPF medial y se realizó la cuantificación de células positivas para PV en el hipocampo y c-FOS en GD.

3.2.3. Análisis estadístico (Estudios 2, 3 y 4)

Los datos se analizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics (IBM Corp., Chicago, USA). Se evaluó la normalidad de las variables continuas mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre grupos se analizaron utilizando la prueba ANOVA y las comparaciones por pares utilizando las pruebas *post-hoc* de Bonferroni. En el caso de datos que presentaron una distribución no normal, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y, para las comparaciones por pares, se utilizaron los niveles de significancia ajustados obtenidos de la prueba U de Mann-Whitney. En la prueba de las tres cámaras, la prueba de las cinco exposiciones y la tarea de reconocimiento de objeto nuevo las comparaciones intragrupo se realizaron mediante la prueba t de Student. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$. No se detectaron diferencias significativas entre machos y hembras en ninguna de las evaluaciones realizadas y tampoco se encontró efecto del sexo cuando se incluyó como covariable en el análisis.

4.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se describen de forma detallada en cada uno de los artículos que la componen. A continuación, se resumen los principales hallazgos encontrados.

4.1. Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (*Estudio 1*)

4.1.1. *EP300* y desregulación metabólica inducida por antipsicóticos (*Estudio 1*)

Martínez-Pinteño A*, Gassó P*, Prohens L, Segura AG, Parellada M, Saiz-Ruiz J, Cuesta MJ, Bernardo M, Lafuente A, Mas S, Rodríguez N. **Identification of *EP300* as a key gene involved in antipsychotic-induced metabolic dysregulation based on integrative bioinformatics analysis of multi-tissue gene expression data.** *Frontiers in Pharmacology*. 2021; 12: 729474

Mediante el análisis de expresión génica en los 4 tejidos de ratones tratados con risperidona, se identificaron un total de 423 módulos de coexpresión cada uno de los cuáles agrupa genes con patrones de expresión similar. De estos, se hallaron 230 en el hígado, 73 en el páncreas, 6 en el tejido adiposo y 114 en el estriado. Un total de 20 de estos módulos se asociaron significativamente con el tratamiento con risperidona: 13 en el hígado, 4 en el páncreas y 3 en el estriado. En los ratones tratados con olanzapina, se identificaron 483 módulos de coexpresión: 223 en el hígado, 140 en el páncreas, 55 en el tejido adiposo y 65 en el estriado. De estos, 46 módulos se asociaron significativamente con el tratamiento con olanzapina: 21 en el hígado, 15 en el páncreas y 5 en el estriado.

Se utilizaron los genes identificados en cada uno de los módulos de coexpresión asociados significativamente con el tratamiento farmacológico para explorar los procesos funcionales en los que participan dichos genes. Este análisis permitió identificar procesos biológicos significativos en 14 de los 20 módulos de coexpresión asociados al tratamiento con risperidona (11 en el hígado, 1 en el tejido adiposo y

2 en el estriado) y en 26 de los 46 módulos asociados con el tratamiento con olanzapina (13 en el hígado, 5 en el páncreas, 4 en el tejido adiposo y 4 en el estriado). A continuación, se seleccionaron aquellos relacionados con procesos y alteraciones metabólicas como la homeostasis de la glucosa y los lípidos, la regulación hormonal o el control de la presión arterial, entre otros (21,7% de los procesos identificados para risperidona y 25,5% para olanzapina).

A partir de los genes incluidos en los procesos seleccionados (60 genes para risperidona y 263 para olanzapina) se construyó una red de interacción proteína-proteína para cada AP. La red construida para risperidona comprendió 46 genes y la de olanzapina 295. Para encontrar las proteínas comunes involucradas en los procesos regulados por ambos APs, se construyó una única red de interacción fusionando las redes obtenidas de forma independiente para risperidona y olanzapina. La red resultante mostró 12 proteínas comunes, 10 de las cuales estaban interconectadas. Entre estas proteínas, p300 codificada por *EP300* se identificó como la proteína con mayor conectividad en esta red, por lo que se consideró la proteína central más importante.

A continuación, exploramos los niveles de expresión de *EP300* predichos genéticamente en una cohorte de 226 pacientes con un PEP tratados con APs para evaluar a nivel clínico la posible asociación de este gen con las alteraciones metabólicas inducidas por estos fármacos. Los niveles de expresión de *EP300* se asociaron significativamente con aumentos en: el peso corporal ($p = 0,016$), el índice de masa corporal ($p = 0,012$), los niveles de colesterol total ($p = 0,002$), los niveles de colesterol LDL ($p < 0,001$) y las concentraciones de triglicéridos ($p = 0,02$) después de 6 meses de tratamiento con APs. El análisis *post-hoc* reveló que aquellos pacientes con bajos niveles predichos de expresión de *EP300* mostraron mayores aumentos en los rasgos antropométricos y metabólicos. El aumento en el peso corporal (14,56%) y en el índice de masa corporal (15,05%) en los pacientes con niveles bajos de expresión de *EP300* fue 2 veces superior al observado en pacientes con niveles de expresión medios (incremento del peso: 7,07%, $p = 0,006$; y del índice de masa corporal: 7,09%, $p = 0,004$) y altos (incremento del peso: 8,76%, $p = 0,054$; y del índice de masa corporal 8,64%, $p = 0,029$). En cuanto a los parámetros de metabolismo

lipídico, en pacientes con niveles bajos de expresión de *EP300*, el incremento en las concentraciones de colesterol total (22,81%) y LDL (36,81%) fue 4 veces y casi 12 veces superior, respectivamente, en comparación con pacientes con niveles medios (incremento de colesterol total: 5,08%, $p = 0,002$; y LDL: 3,16%, $p < 0,001$) o altos (incremento de colesterol total: 5,43%, $p = 0,002$; y LDL: 3,06%, $p < 0,001$) de expresión de *EP300*. En los triglicéridos, el aumento fue 2,5 veces mayor en los pacientes con niveles bajos de expresión de *EP300* (69,98%) en comparación con los otros grupos (incremento en pacientes con niveles medios: 25,75%, $p = 0,019$; y con niveles altos: 28,27%, $p = 0,032$).



Identification of *EP300* as a Key Gene Involved in Antipsychotic-Induced Metabolic Dysregulation Based on Integrative Bioinformatics Analysis of Multi-Tissue Gene Expression Data

Albert Martínez-Pinteño^{1†}, Patricia Gassó^{1,2,3†}, Lucía Prohens¹, Alex G. Segura¹, Mara Parellada^{3,4}, Jerónimo Saiz-Ruiz^{3,5}, Manuel J. Cuesta^{3,6}, Miguel Bernardo^{2,3,7,8}, Amalia Lafuente^{1,2,3}, Sergi Mas^{1,2,3*} and Natalia Rodríguez^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Claudia Pisanu,
University of Cagliari, Italy

Reviewed by:

Gabriel R. Fries,
University of Texas Health Science
Center at Houston, United States
Jlamei Lian,
University of Wollongong, Australia

*Correspondence:

Natalia Rodríguez
nrodriguezfe@ub.edu
Sergi Mas
sergimash@ub.edu

[†]These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacogenetics and
Pharmacogenomics,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 23 June 2021

Accepted: 04 August 2021

Published: 13 August 2021

Citation:

Martínez-Pinteño A, Gassó P,
Prohens L, Segura AG, Parellada M,
Saiz-Ruiz J, Cuesta MJ, Bernardo M,
Lafuente A, Mas S and Rodríguez N
(2021) Identification of *EP300* as a Key
Gene Involved in Antipsychotic-
Induced Metabolic Dysregulation
Based on Integrative Bioinformatics
Analysis of Multi-Tissue Gene
Expression Data.
Front. Pharmacol. 12:729474.
doi: 10.3389/fphar.2021.729474

¹Department of Basic Clinical Practice, Pharmacology Unit, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ⁴Department of Child and Adolescent Psychiatry, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, School of Medicine, Universidad Complutense, IISGM, Madrid, Spain, ⁵Department of Psychiatry, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain, ⁶Department of Psychiatry, Complejo Hospitalario de Navarra, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain, ⁷Barcelona Clinic Schizophrenia Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁸Department of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Antipsychotics (APs) are associated with weight gain and other metabolic abnormalities such as hyperglycemia, dyslipidemia and metabolic syndrome. This translational study aimed to uncover the underlying molecular mechanisms and identify the key genes involved in AP-induced metabolic effects. An integrative gene expression analysis was performed in four different mouse tissues (striatum, liver, pancreas and adipose) after risperidone or olanzapine treatment. The analytical approach combined the identification of the gene co-expression modules related to AP treatment, gene set enrichment analysis and protein-protein interaction network construction. We found several co-expression modules of genes involved in glucose and lipid homeostasis, hormone regulation and other processes related to metabolic impairment. Among these genes, *EP300*, which encodes an acetyltransferase involved in transcriptional regulation, was identified as the most important hub gene overlapping the networks of both APs. Then, we explored the genetically predicted *EP300* expression levels in a cohort of 226 patients with first-episode psychosis who were being treated with APs to further assess the association of this gene with metabolic alterations. The *EP300* expression levels were significantly associated with increases in body weight, body mass index, total cholesterol levels, low-density lipoprotein cholesterol levels and triglyceride concentrations after 6 months of AP treatment. Taken together, our analysis identified *EP300* as a key gene in AP-induced metabolic abnormalities, indicating that the dysregulation of *EP300* function could be important in the development of these side effects. However, more studies are needed to disentangle the role of this gene in the mechanism of action of APs.

Keywords: antipsychotics, weight gain, metabolic syndrome, pharmacogenetics, *EP300*, gene, microarray, gene expression

INTRODUCTION

Antipsychotics (APs) are the primary medication used for the treatment of schizophrenia and other psychiatric disorders. These medications, especially second-generation APs, are associated with a wide range of side effects including weight gain and other metabolic alterations that can lead to the development of metabolic syndrome, type 2 diabetes (T2D) and serious cardiovascular diseases (Fernandez-Egea et al., 2011; Foley and Morley, 2011; De Hert et al., 2012; Ward et al., 2013; Tek et al., 2016). The risk of metabolic adverse events varies among the APs, with olanzapine and clozapine having the highest risk of causing such effects and others having an intermediate (e.g., risperidone) or low risk (e.g., aripiprazole) (Lett et al., 2012; Pillinger et al., 2020). Even in the absence of AP treatment, individuals with psychiatric diseases are more likely to suffer obesity and metabolic disorders than the general population, with drug therapy contributing to the increase in these rates and aggravating the metabolic profile in these patients (Holt and Peveler, 2009; Mitchell et al., 2013; Correll et al., 2014). The associated co-morbidities reduce quality of life and increase patient mortality (Kritharides et al., 2017). Furthermore, these side effects are a major cause of treatment discontinuation, thus, worsening prognosis and increasing the risk of relapse (Doane et al., 2020). Therefore, the identification of robust predictors of AP-induced side effects could contribute to the identification of those subjects at a higher risk of developing metabolic disturbances, facilitating better treatment selection and improving clinical outcomes.

Although the underlying factors involved in AP-induced metabolic dysregulation are not well understood, genetic factors are assumed to be important based on the findings from twin and sibling studies (Gebhardt et al., 2010). Thus, several pharmacogenetic studies have been conducted, most of them using a candidate gene approach, which is limited by our current understanding of the mechanism of action of APs (Mas et al., 2012, 2015). Evidence suggests that the antagonistic effects of APs on neurotransmitter receptors involved in the control of food intake, such as the histamine H1 receptors (H1R), the serotonin 2C receptors (5-HT_{2C}) and the dopamine D2 receptors (D2DR), are closely linked to cardiovascular risk and metabolic dysfunction (De Hert et al., 2012; Reynolds and McGowan, 2017). However, the exact downstream mechanisms that may promote the development of metabolic abnormalities in patients receiving APs remain elusive. To date, by using this candidate gene approach, several susceptibility genes of weight gain and other metabolic adverse effects induced by APs have been identified. These genes are mostly related to neurotransmitter systems, food intake regulation and energy metabolism, and include *ADR2A*, *BDNF*, *CNR1*, *DRD2*, *DRD3*, *FTO*, *GNB3*, *HTR2C*, *INSIG2*, *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *MTHFR*, *NPY*, *SNAP25*, and *SREBF1*, among others (Arranz et al., 2011; Shams and Müller, 2014; Devlin and Panagiotopoulos, 2015; MacNeil and Müller, 2016; Zhang et al., 2016; Zhang and Malhotra, 2018; Gassó et al., 2020; Yoshida and Müller, 2020). A meta-analysis of 72 articles with a combined sample of 6700 patients from 46 non-overlapping cohorts found that *ADRA2A*, *DRD2*, *HTR2C*, and

MC4R polymorphisms were some of the variants significantly associated with AP-induced weight gain, and were those with the largest effect sizes (Zhang et al., 2016). Genome-wide association studies (GWAS) have also addressed this issue, suggesting novel variants associated with AP-induced metabolic effects, such as those located in *CIDEA*, *DGKB*, *MC4R*, *MEIS2*, *PRKAR2B* and *PTPRD*, among others (Adkins et al., 2011; Malhotra et al., 2012; Brandl et al., 2016; Yu et al., 2016; Maciukiewicz et al., 2019; Corfittsen et al., 2020; ter Hark et al., 2020). Despite this associations, only few genes have been confirmed in independent studies. Hence, further research is required to identify robust markers and validate their values as predictors of AP-induced metabolic disturbances before their implementation in daily clinical practice (Arranz et al., 2021; Islam et al., 2021).

Here, we aimed to investigate the molecular pathways underlying AP-induced metabolic effects and identify potential candidate genes for future pharmacogenetic studies using a translational gene expression study from mice to humans. First, whole-genome expression changes were analyzed in different mouse tissues after treatment with olanzapine or risperidone, two APs with high and intermediate metabolic risks associated, respectively (Lett et al., 2012; Pillinger et al., 2020), that are considered the most commonly prescribed APs worldwide (Hálfánarson et al., 2017). We focused on analyzing the gene expression and their related biological processes that are modified by both APs in order to investigate the overlapping genes and mechanisms of action involved in AP-induced metabolic imbalance. Then, we explored the genetically predicted gene expression levels of the key genes identified in a cohort of patients with first-episode psychosis (FEP) who were being treated with APs to further assess the association of these genes with metabolic alterations.

MATERIALS AND METHODS

A detailed description of the methods used in the present study is available in **Supplementary Material**.

Animals and Drug Treatment

Mice were chronically treated for 28 days with a daily subcutaneous dose of vehicle (saline containing 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 5% Tween 20), risperidone (1 mg/kg) or olanzapine (3.5 mg/kg). Each group included 8 C57BL/6J OlaHsd mice (4 males and 4 females). The animals were maintained with *ad libitum* access to food and water, using a standard chow diet.

All animal-related procedures were performed in accordance with the European Union guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Animal Care Committee of the University of Barcelona and by the Generalitat de Catalunya.

Metabolic Assessment in Mice

Several metabolic parameters (including body weight, blood glucose levels, total cholesterol levels and triglyceride levels) were assessed in all mice at baseline (1 week before the start of

AP treatment) and after 28 days of treatment. Fasting glucose levels were measured using a glucometer AlphaTRAK[®] 2 (Zoetis, Parsippany, NJ, United States). Total cholesterol levels and triglyceride levels were measured using the Cholesterol Liquid assay kit and the Triglycerides Liquid assay kit, respectively (Química Clínica Aplicada S.A., Amposta, Spain). The percentage of change for each parameter between both measures was calculated. A detailed description of the methods used for the evaluation of metabolic parameters is available in **Supplementary Material**.

RNA Isolation and Microarray Hybridization

After 28 days of treatment, animals were sacrificed by decapitation 1 h after the last injection. Then, their tissues were rapidly removed and placed on ice. Four tissues that are potentially relevant for the development of AP-induced metabolic effects were used: the liver, the pancreas, visceral adipose tissue and the striatum. Total RNA was isolated using Trizol reagent (Life Technologies, Foster City, CA, United States) and was further purified using the miTotal RNA Extraction Miniprep System (Viogene Biotek Corp, New Taipei City, Taiwan). The RNA samples were then submitted to the Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik Microarray Technology (KFB, BioPark Regensburg GmbH, Regensburg, Germany) for labeling and hybridization to the Affymetrix mouse Clariom S Arrays (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, United States).

Microarray Data Analysis

A weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was used to identify modules of highly co-expressed genes significantly associated (p -value < 0.05) with AP treatment (risperidone or olanzapine) (Langfelder and Horvath, 2008). Then, a gene set enrichment analysis of these co-expression modules was performed using FatiGO (Al-Shahrour et al., 2007) and Gene Ontology (GO) terms (Ashburner et al., 2000). From the significantly enriched (false discovery rate (FDR)-corrected p -value < 0.05) biological processes, the GO terms related to metabolic processes and metabolic dysregulation were selected for further analysis. Genes included in the selected GO terms were used to create a single protein-protein interaction (PPI) network for each AP using the SNOW program (Minguez et al., 2009). A single PPI network integrating both APs was also constructed by merging the networks obtained independently for risperidone and olanzapine using the intersection option in Cytoscape 3.7.2 (Shannon et al., 2003). For each node, the degree of connectivity was calculated to identify the candidate hub genes from the constructed PPI networks.

Full details of the extraction, labeling and hybridization protocols as well as the raw array data (.cel files) and the pre-processed data matrix are available at the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; accession number GSE180473).

Exploration of the Hub Genes in a Naturalistic Cohort of Patients With FEP Participants

The sample comprised 226 patients with FEP (age 23.6 ± 6.0 years; 66.8% were males) recruited in the PEPs study. The

participants were prescribed at least one second-generation AP during the 6-month follow-up period. During the follow-up period, about 40% of the patients were treated with olanzapine or clozapine, which have the highest risk of inducing weight gain or worsening metabolic parameters, while more than 50% were administered APs with an intermediate or low risk of causing such side effects, with risperidone and aripiprazole being the most frequently prescribed in this group. Further details of the study population are described in the **Supplementary Material**. The detailed protocol of the PEPs study has been published elsewhere (Bernardo et al., 2013; Bioque et al., 2016). The study was approved by the ethics committees of all the participating clinical centers. Informed consent was obtained from all the participants. In the case of children under 16 years of age, parents or legal guardians gave written informed consent before study participation, while the patients themselves also agreed to participate.

Metabolic Assessment

Several anthropometric and metabolic traits were assessed at baseline and at 6 months, including body weight, body mass index (BMI), blood glucose levels, total cholesterol levels, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels and triglyceride (TG) levels. The percentage of change for each parameter between both visits was calculated (**Table 1**).

Genotyping and Gene Expression Prediction

Samples from all the individuals in the study were genotyped at the Centro Nacional de Genotipado (CeGen, Santiago de Compostela, Spain), using the Affymetrix Axiom Spain Biobank Array. The genotyping data were called using the Axiom Analysis Suite (Mas et al., 2020) and were then submitted to the Michigan Imputation Server (Das et al., 2016), following the standard pipeline for the Minimac4 software. Genotyping data were used to predict the genetically regulated gene expression levels for each individual through the gene expression imputation method, PrediXcan (Gamazon et al., 2015). Gene expression of the previously identified hub genes was predicted in five different tissues that are potentially relevant for the development of AP-induced metabolic alterations, including the small intestine, the pancreas, the liver, visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue, following the standard procedure found at <https://github.com/hakyimlab/PrediXcan>.

Statistics

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics version 20.0 (IBM Corp, Chicago, IL, United States). Normality was assessed using Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Means ± standard deviations (SD) were computed for continuous variables. The differences between groups in the metabolic parameters assessed in mice were analyzed using analysis of variance. As some differences between males and females were observed in some of the parameters evaluated, the analysis was adjusted for gender.

For the analysis of the hub genes identified in the cohort of patients with FEP, the predicted gene expression levels of the

TABLE 1 | Metabolic data of the study participants at baseline and at the 6-months follow-up.

	N	Baseline	6 months	% Gain
Weight (kg), mean \pm SD	226	69.18 \pm 14.58	73.77 \pm 14.62	8.65 \pm 11.17
BMI, mean \pm SD	225	23.49 \pm 4.70	25.13 \pm 4.19	8.60 \pm 11.20
Glucose (mg/dl), mean \pm SD	206	83.98 \pm 15.80	85.52 \pm 14.35	3.39 \pm 16.28
Cholesterol (mg/dl), mean \pm SD	212	160.85 \pm 36.61	167.09 \pm 36.36	6.36 \pm 25.44
LDL cholesterol (mg/dl), mean \pm SD	171	94.53 \pm 29.09	98.97 \pm 31.98	3.98 \pm 30.340
HDL cholesterol (mg/dl), mean \pm SD	172	49.19 \pm 12.46	47.94 \pm 13.02	1.38 \pm 24.46
Triglycerides (mg/dl), mean \pm SD	205	87.84 \pm 49.18	102.10 \pm 58.81	27.53 \pm 66.98

BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

EP300 gene were categorized as low, medium or high according to the three values of gene expression obtained in each tissue (-0.13 , -0.07 , and 0.00 , respectively). Differences in metabolic variables between these categories were tested using analysis of variance. The analysis was adjusted for sociodemographic and clinical variables that might affect the parameters assessed, including gender, age, and the type of AP according to its potency (high, low, or no risk of increasing weight or worsening metabolic parameters). A further pairwise comparison analysis was performed using Bonferroni's post-hoc test.

RESULTS

Figure 1 shows an overview of the analysis procedure followed in the present study.

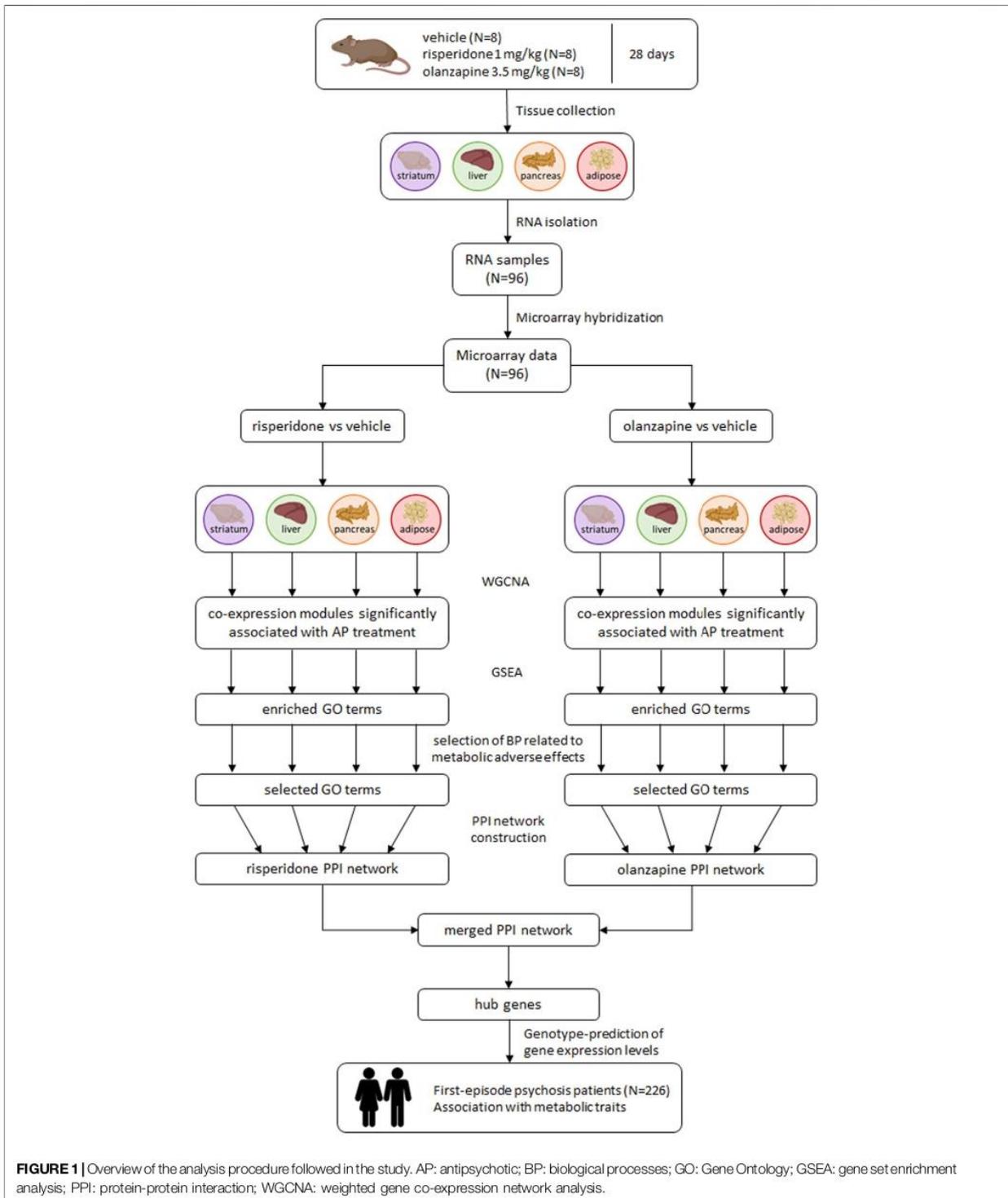
An increase in body weight ($15.56\% \pm 5.25$), fasting glucose levels ($28.10\% \pm 43.95$) and triglyceride levels ($96.52\% \pm 89.50$) was observed in mice after 28 days of treatment while cholesterol levels remained mainly unaltered (-1.56 ± 13.15). No significant differences were identified between the different treatment groups.

Regarding the gene expression analysis, 423 modules of co-expressed genes were obtained in the risperidone-treated mice: 114 in the striatum, 230 in the liver, 73 in the pancreas and six in the adipose tissue (**Supplementary Figure S1**). Twenty of these modules, containing between 37 and 179 genes, were significantly associated with risperidone treatment: three of those in the striatum, 13 of those in the liver and 4 of those in the pancreas (**Supplementary Table S1**). Regarding the olanzapine-treated mice, 483 modules of co-expressed genes were identified in the first analysis: 65 in the striatum, 223 in the liver, 140 in the pancreas and 55 in the adipose tissue (**Supplementary Figure S1**). Forty-six of these modules, containing between 33 and 1841 genes, were significantly associated with olanzapine treatment: five of those in the striatum, 21 of those in the liver, 15 of those in the pancreas and five of those in the adipose tissue (**Supplementary Table S1**). Two of the modules (red and yellow) significantly associated with olanzapine treatment in the striatum contained a large number of co-expressed genes (1,105 and 1,841 genes, respectively); hence, from these modules, only the genes with a module membership (MM) above 0.5 and a gene significance (GS) above 0.6 were selected for further analysis. Thus, 245 and 346 genes were considered for the red and yellow modules, respectively.

To gain further insight into the biological functions of the genes included in each co-expression module that was significantly associated with AP treatment, a functional enrichment analysis was performed. We found significantly enriched GO terms in 14 of the 20 co-expression modules associated with risperidone treatment (2 in the striatum, 11 in the liver and one in the pancreas) and 26 of the 46 modules associated with olanzapine treatment (4 in the striatum, 13 in the liver, five in the pancreas and 4 in the adipose tissue). For both APs, the enriched biological processes were related to different functions including tissue development, cell proliferation and differentiation, intracellular signaling, immune system processes and metabolic and biosynthetic processes, among others (**Supplementary Tables S2, S3**). The significantly enriched GO terms related to metabolic processes and metabolic dysregulation were selected for further analysis. These biological processes were related to glucose and lipid homeostasis, substance metabolism, digestion and the regulation of nutrient levels, hormone and secretion regulation, intracellular signaling through second messengers, the regulation of vascular tone and responses to different stimuli (**Figure 2**). Out of all the significant GO terms identified, 61 processes (21.7%) were selected for risperidone and 341 (25.5%) for olanzapine.

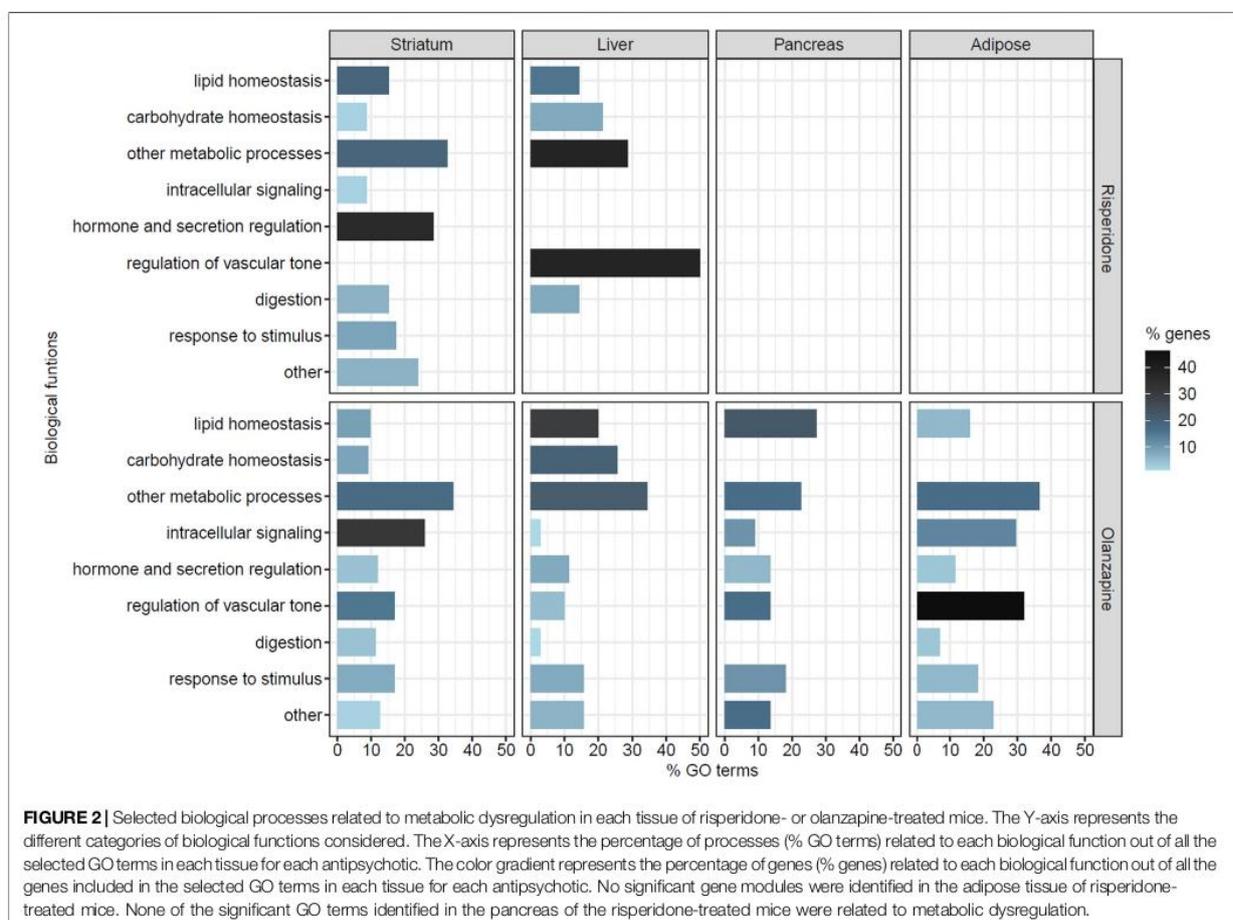
The genes included in the selected GO terms (60 genes for risperidone and 263 for olanzapine) were used to create a PPI network for each AP (**Supplementary Figure S2**). The network constructed with the gene set for the risperidone-treated mice comprised 46 genes and included 29 (48.3%) of the 60 genes from the original list whereas the network constructed with the gene set for the olanzapine-treated mice comprised 295 genes, including 140 (53.2%) of the 263 genes from the original list. The nodes of both PPI networks showed more connections (degree of connectivity p -value $\leq 1 \times 10^{-3}$), greater connectivity (clustering coefficient p -value < 0.01) and more hub nodes (betweenness centrality p -value < 0.01) than would be expected by chance. The degree of connectivity was calculated for each node and the top 10% of the genes with the highest degree were considered the hub genes of each network. Thus, seven hub genes with a degree of connectivity ranging between 5 and 10 were identified in the risperidone network, while 30 hub genes with a node degree of 11–25 were obtained in the olanzapine network.

To find the overlapping genes involved in the downstream processes regulated by both APs, a single PPI network was



constructed by merging the networks obtained independently for risperidone and olanzapine (Figure 3). The resulting network showed 12 common genes, 10 of which were interconnected. The

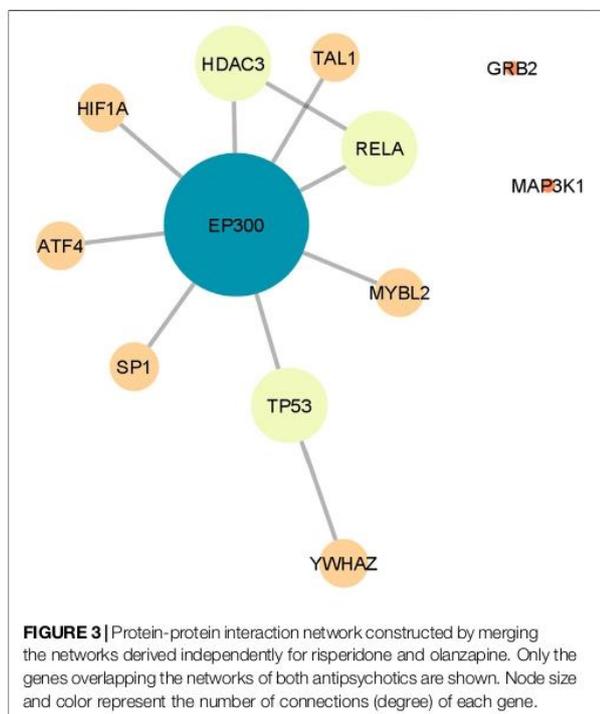
most connected gene was *EP300*, with a degree of connectivity of 8, thereby becoming the central gene of the network. *EP300* was also identified as one of the most important hub genes in the networks of



both APs, showing a node degree of 10 in the risperidone network (thus, becoming the most connected gene of the network) and a degree of 21 in the olanzapine network (becoming the second most connected gene of the network).

To obtain more evidence of the role of *EP300* as a key gene in AP-induced metabolic effects, we used the genetically predicted gene expression levels in a naturalistic cohort of patients with FEP receiving APs. Two predictive models were used to impute the gene expression levels of *EP300* in different tissues based on the genotyping data: one for the prediction in the small intestine, the liver and subcutaneous adipose tissue and another one for the prediction in the pancreas and visceral adipose tissue. Then, we tested the association between the predicted gene expression values and the metabolic status of the patients at baseline and after the 6-months follow-up. No significant association was observed between the *EP300* expression levels and the anthropometric and metabolic parameters measured at baseline (data not shown). By contrast, the gene expression levels of *EP300*, as predicted with the prediction model for the small intestine, the liver and the adipose tissue, were significantly associated with the changes in body weight ($F = 4.14$, $p = 0.016$), BMI ($F = 4.48$, $p = 0.012$), total cholesterol levels ($F = 6.22$,

$p = 0.002$), LDL cholesterol levels ($F = 12.53$, $p < 0.001$) and TG levels ($F = 4.01$, $p = 0.02$) after 6 months of AP treatment. Post-hoc analysis revealed that patients with the lowest levels of *EP300* expression showed higher increases in the abovementioned anthropometric and metabolic traits ($p < 0.05$) (Figure 4). The increase in body weight and the BMI was almost two times higher in these patients (weight increase of 14.56%; BMI increase of 15.05%) than in individuals with medium (weight increase of 7.07%, $p = 0.006$; BMI increase of 7.09%, $p = 0.004$) or high *EP300* expression (weight increase of 8.76%, $p = 0.054$; BMI increase of 8.64%, $p = 0.029$). Regarding the lipid metabolic parameters, subjects with low *EP300* expression levels showed an increase in cholesterol concentrations (22.81%) that was four times higher than those observed in patients with medium (5.08%, $p = 0.002$) or high gene expression levels (5.43%, $p = 0.002$). Furthermore, those with low *EP300* expression levels presented an increase in LDL cholesterol levels (36.81%) that was almost 12 times higher than that of patients with medium (3.16%, $p < 0.001$) or high (3.06%, $p < 0.001$) *EP300* expression. Moreover, the rise in TG concentrations was more than 2.5 times higher in individuals with the lowest *EP300* expression levels (69.98%) compared to the other participants



(medium *EP300* expression: 25.75%, $p = 0.019$; high *EP300* expression: 28.27%, $p = 0.032$).

DISCUSSION

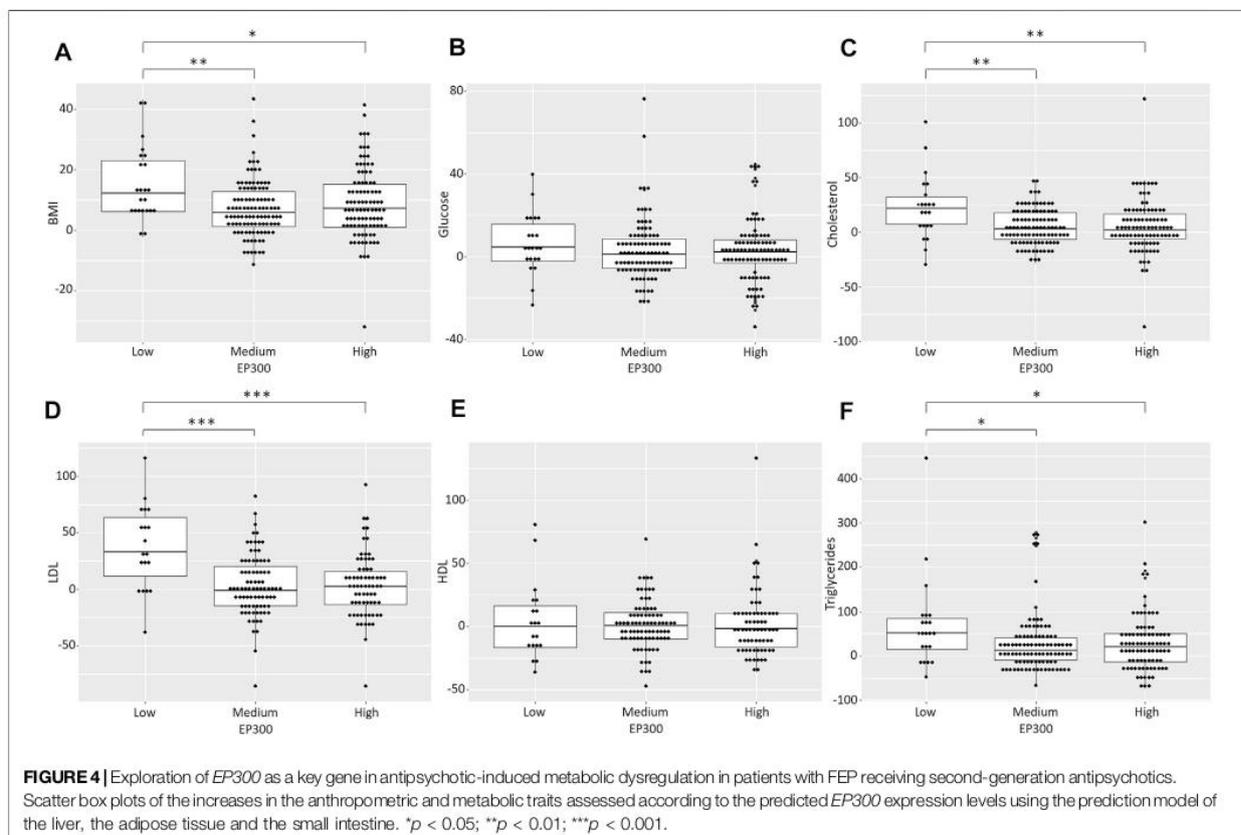
While accumulating evidence has linked AP therapy to metabolic disturbances, the mechanistic bases and susceptibility factors of these side effects remain unclear. In the present study, we performed an integrated analysis of gene expression profiles in four different mouse tissues after treatment with risperidone or olanzapine to identify important genes involved in the development of metabolic alterations. The key genes identified were further assessed in a naturalistic cohort of patients with FEP who were being treated with APs. Our findings provide new insights into the molecular mechanism involved in AP-induced metabolic adverse events, suggesting new candidate genes for future pharmacogenetic studies.

We first performed a WGCNA of gene expression in mice that allowed us to identify several modules of co-expressed genes that were significantly associated with risperidone or olanzapine treatment in each tissue. This approach considers the overall gene-gene correlation structure instead of focusing on individual genes, providing modules of highly interconnected genes that are enriched with genes involved in known biological pathways (Zhao et al., 2010). In our study, we found that the genes in the modules were related to biological functions that were similar for the two APs, including a high number of processes related to energy metabolism, hormone regulation and the control of

vascular tone, among others. The modulation of these processes by APs at a transcriptomic level may lead to the development of AP-induced metabolic disturbances.

Most proteins carry out their functions by interacting with other components that are found either in the same cell or among different cells and even among different tissues (Barabási et al., 2011). We found that the genes of these metabolic-related pathways were highly interconnected, as demonstrated by the PPI networks constructed for each AP. The risperidone and olanzapine networks were merged to identify the overlapping genes in order to obtain a general picture of the molecular effects of both APs. The central gene of this merged network was *EP300*, which showed connections with almost all the other genes in the network. In addition, *EP300* was found to be one of the most important hub genes in the networks constructed independently for each AP. In a PPI network, nodes with a higher degree of connectivity are considered central proteins of functional importance that are essential for the maintenance of the entire network (Barabási et al., 2011). Thus, our findings suggested that *EP300* could be a crucial gene in the downstream mechanism of APs that leads to metabolic dysregulation. *EP300* encodes the protein p300, which functions as an acetyltransferase for histones and other proteins, thereby regulating transcriptional activity (Yao et al., 2018). This protein is involved in the downstream signaling of glucagon and insulin and participates in the regulation of energy homeostasis in major metabolic organs. Therefore, it has a crucial role in maintaining blood glucose levels in both fasting and postprandial states through the regulation of glycolysis, gluconeogenesis and glycogen synthesis (He et al., 2012; Wondisford et al., 2014; Huang et al., 2018; Yano et al., 2018; Yao et al., 2018; Namwanje et al., 2019). In addition, p300 is important for the maintenance of β -cell function, promotes glucose-induced insulin secretion and is associated with the disruption of insulin signaling in obesity (Mosley et al., 2004; Bompada et al., 2016; Cao et al., 2017; Wong et al., 2018). Therefore, p300 has been proposed to be a prime factor leading to the development of hyperglycemia, impaired insulin levels and insulin resistance (Cao et al., 2017; Yao et al., 2018), which frequently occur in individuals treated with second-generation APs (Newcomer et al., 2002; Henderson et al., 2005; Teff et al., 2013). Interestingly, a previous study revealed that some T2D-associated genetic variants identified by GWAS were located in sequences encoding protein binding sites, including those for p300 (Cheng et al., 2017). In addition, as observed in our study, earlier analyses have revealed *EP300* and its paralog *CBP* to be the most connected genes of the networks associated with T2D (Morris et al., 2012; Randhawa et al., 2013).

By regulating gene expression, p300 is also involved in the regulation of lipid homeostasis and adipogenesis. Thus, p300 activity may enhance triglyceride synthesis and alter lipid export, thereby increasing body weight and fat mass (Yao et al., 2018; Zhou et al., 2020). APs are associated with a higher risk of these metabolic disturbances, as patients on AP treatment frequently experience dyslipidemia, mainly due to an elevation in TG levels, as well as body weight increases and central obesity (Bioque et al., 2018; Nicol et al., 2018; Wedervang-Resell et al., 2020).



We further explored the reliability of *EP300* as a candidate gene for AP-induced metabolic dysregulation in a naturalistic cohort of patients with FEP receiving APs. To this end, we used the genetically predicted gene expression levels to assess the influence of *EP300* on different anthropometric and metabolic traits. Gene expression is an intermediate phenotype between genetic variability and disease manifestation. Most disease-associated genetic variants are located in non-coding regions, suggesting that these variants may exert their effects by modulating gene expression (Nicolae et al., 2010). In this scenario, a new promising approach has been developed that enables the prediction of gene expression based on genetic data. The imputed gene expression can then be used in place of genotypes to assess the effect of genes on a given phenotype (Gamazon et al., 2015). This strategy has been previously used to identify candidate genes associated with schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder and other complex traits (Gusev et al., 2018; Liao et al., 2019; Lindström et al., 2019; Wu et al., 2021). Here, we found that the predicted expression levels of *EP300* in different metabolic-related tissues of patients with FEP receiving APs were significantly associated with increases in body weight, BMI, total cholesterol levels, LDL cholesterol levels and TG concentrations at the 6-months follow-up. Although metabolic alterations have been described in schizophrenia patients even in the absence of AP treatment, we found no

association between the genetically predicted *EP300* expression levels and the metabolic status of FEP patients at baseline, suggesting that this gene might be related to the AP effects instead of being a risk factor for the metabolic dysregulation associated with the disease. Thus, the genetic background would affect *EP300* expression levels which in turn could make patients more susceptible to the effects exerted by AP on this gene. Hence, these results give more support to the findings obtained in mice and strongly indicate the influence of *EP300* on AP-induced metabolic impairment.

Previous studies have found that common and rare variants of *EP300* are associated with schizophrenia risk (Ripke et al., 2014; Girard et al., 2015). However, to the best of our knowledge, this is the first time this gene has been associated with AP treatment. To date, the main mechanism of action used to explain the AP-induced metabolic adverse effects is the blockade of DRD2, H1R and 5-HT_{2C} receptors, leading to increased food intake and other metabolic impairments (De Hert et al., 2012; Reynolds and McGowan, 2017). However, a more complicated mechanism is expected to explain these effects. Recently, Chen et al. (2020) proposed a molecular mechanism of olanzapine-induced hyperphagia and obesity that could be in agreement with our results. They reported that the antagonistic effect of olanzapine on H1R activates GHSR1a (ghrelin receptor) downstream signaling in hypothalamic neurons that includes AMPK-

FOXO1-pCREB signaling, which involves p300. This action increases the expression of neuropeptide Y, leading to excessive food intake and weight gain (Chen et al., 2020). Our results suggested that the regulation of *EP300* by APs in other tissues could also contribute to the appearance of metabolic disturbances. Further studies are needed to elucidate the pleiotropic effect of *EP300* on schizophrenia and AP effects and to disentangle the specific role of this gene in the mechanism of action of APs and, consequently, in AP-induced metabolic dysregulation.

The main strength of our study was the translational design, which included the integration of transcriptomic data from various mouse tissues after treatment with different APs and the subsequent exploration of the *EP300* effects in a human cohort. Nevertheless, some limitations should be considered when interpreting our findings. First, the strategy used to select the biological processes that could be related to AP-induced metabolic disturbances might have been affected by bias and, therefore, we cannot rule out the possible contribution of other genes that were not included in our analysis. Secondly, although drug dosage regimens were selected based on previous studies, here we do not control for drug plasma levels as we were unable to obtain enough blood volume of each animal to measure plasmatic drug levels with the methodology available in our facilities. Besides, the lack of a mouse group treated with an AP with a low risk of metabolic dysregulation meant that the specific effect of high and intermediate risk APs could not be explored. In addition, as no significant differences were observed in the metabolic parameters assessed between treatment groups in mice, we were not able to correlate these variables with AP-induced gene expression changes. This lack of significant differences may be due to the experimental design, in which mice were fed using a standard chow diet. Although a high-fat diet could mimic better the clinical effects of APs on metabolic parameters, which are in part due to changes in the food intake profile, we maintain the animals on a standard diet to test specifically the AP-induced gene expression changes, without the influence of external factors. Despite these limitations, we could ensure the influence of the key gene identified on metabolic impairment by assessing the effect of the genetically predicted gene expression levels in a human cohort. This exploration was conducted in a cohort of patients in a naturalistic study, and hence the sociodemographic and clinical characteristics of these individuals, such as the type of antipsychotic prescribed, could have affected the parameters assessed. For this reason, as the sample size did not allow the study of subgroups stratified by AP treatment, the statistical analysis was adjusted for several variables, including gender, age and AP potency. However, other confounders such as diagnosis, concomitant treatment or diet that we did not control for could have had an effect on the metabolic traits assessed. Finally, the prediction of the gene expression levels in this population was limited by the prediction models currently available, which in the future could include more genetic variants based on scientific advances. Hence, our results should be interpreted as exploratory and require replication.

In summary, our findings provide novel insights into the molecular mechanisms involved in the metabolic side effects of APs. Based on our results, we propose that the dysregulation of *EP300* functioning could be important in the development of AP-induced metabolic disturbances. Hence, both *EP300* and the genes involved in the *EP300* network could be considered potential candidate genes for future pharmacogenetic studies on these side effects of APs.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: NCBI GEO, accession no: GSE180473.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic de Barcelona. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants or their legal guardian/next of kin. The animal study was reviewed and approved by the Animal Care Committee of the University of Barcelona and Generalitat de Catalunya.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM-P participated designing and carrying out the experimental procedures, contributed to data acquisition and analysis and helped in the drafting of the manuscript. PG participated in data analysis and the interpretation of results and writing the first version of the manuscript. LP and AS participated in data analysis and helped in the drafting of the manuscript. MP, JS-R, MC, and MB provided clinical samples, collected clinical information and helped in the drafting of the manuscript. MB and AL acquired funding for the research, participated in designing the study and helped in the drafting of the manuscript. SM and NR participated in designing the study, supervised the data analysis and contributed to the interpretation of results and the writing of the first version of the manuscript. All authors revised the manuscript and approved the final version for publication.

FUNDING

This study was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI16/01,222 and PI08/0208); and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)-Unión Europea. Support was also given by the “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i Recerca” (AGAUR) of the “Generalitat de Catalunya” (2017SGR1562, 2017SGR1355 and 2017SGR881).

and with the grant FI-SDUR 2019-2020 (AGAUR) (2020 FI-SDUR 00327) to AS.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Language Advisory Service at the University of Barcelona for manuscript revision. The authors also thank all subjects and their families for the time and effort

spent on this study as well as Ana Meseguer for sample collection assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.729474/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Adkins, D. E., Åberg, K., McClay, J. L., Bukszár, J., Zhao, Z., Jia, P., et al. (2011). Genomewide Pharmacogenomic Study of Metabolic Side Effects to Antipsychotic Drugs. *Mol. Psychiatry* 16, 321–332. doi:10.1038/mp.2010.14
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárrega, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D., et al. (2007). FatiGO+: A Functional Profiling Tool for Genomic Data. Integration of Functional Annotation, Regulatory Motifs and Interaction Data with Microarray Experiments. *Nucleic Acids Res.* 35, W91–W96. doi:10.1093/nar/gkm260
- Arranz, M. J., Rivera, M., and Munro, J. C. (2011). Pharmacogenetics of Response to Antipsychotics in Patients with Schizophrenia. *CNS Drugs* 25, 933–969. doi:10.2165/11595380-000000000-00000
- Arranz, M. J., Salazar, J., and Hernández, M. H. (2021). Pharmacogenetics of Antipsychotics: Clinical Utility and Implementation. *Behav. Brain Res.* 401, 113058. doi:10.1016/j.bbr.2020.113058
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., et al. (2000). Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25–29. doi:10.1038/75556
- Barabási, A. L., Gulbahce, N., and Loscalzo, J. (2011). Network Medicine: A Network-Based Approach to Human Disease. *Nat. Rev. Genet.* 12, 56–68. doi:10.1038/nrg2918
- Bernardo, M., Bioque, M., Parellada, M., Saiz Ruiz, J., Cuesta, M. J., Llerena, A., et al. (2013). Assessing Clinical and Functional Outcomes in a Gene-Environment Interaction Study in First Episode of Psychosis (PEPs). *Rev. Psiquiatr. Salud Ment.* 6, 4–16. doi:10.1016/j.rpsm.2012.11.001
- Bioque, M., García-Portilla, M. A. P., García-Rizo, C., Cabrera, B., Lobo, A., González-Pinto, A., et al. (2018). Evolution of Metabolic Risk Factors over a Two-Year Period in a Cohort of First Episodes of Psychosis. *Schizophr. Res.* 193, 188–196. doi:10.1016/j.schres.2017.06.032
- Bioque, M., Llerena, A., Cabrera, B., Mezquida, G., Lobo, A., González-Pinto, A., et al. (2016). A Pharmacovigilance Study in First Episode of Psychosis: Psychopharmacological Interventions and Safety Profiles in the PEPs Project. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, 1–10. doi:10.1093/ijnp/pyv121
- Bompada, P., Atac, D., Luan, C., Andersson, R., Omella, J. D., Laakso, E. O., et al. (2016). Histone Acetylation of Glucose-Induced Thioredoxin-Interacting Protein Gene Expression in Pancreatic Islets. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 81, 82–91. doi:10.1016/j.biocel.2016.10.022
- Brandl, E. J., Tiwari, A. K., Zai, C. C., Nummi, E. L., Chowdhury, N. I., Arenovich, T., et al. (2016). Genome-wide Association Study on Antipsychotic-Induced Weight Gain in the CATIE Sample. *Pharmacogenomics J.* 16, 352–356. doi:10.1038/tpj.2015.59
- Cao, J., Peng, J., An, H., He, Q., Boronina, T., Guo, S., et al. (2017). Endotoxemia-mediated Activation of Acetyltransferase P300 Impairs Insulin Signaling in Obesity. *Nat. Commun.* 8, 131. doi:10.1038/s41467-017-00163-w
- Chen, X., Yu, Y., Zheng, P., Jin, T., He, M., Zheng, M., et al. (2020). Olanzapine Increases AMPK-NPY Orexigenic Signaling by Disrupting H1R-GHSR1a Interaction in the Hypothalamic Neurons of Mice. *Psychoneuroendocrinology* 114, 104594. doi:10.1016/j.psyneuen.2020.104594
- Cheng, M., Liu, X., Yang, M., Han, L., Xu, A., and Huang, Q. (2017). Computational Analyses of Type 2 Diabetes-Associated Loci Identified by Genome-wide Association Studies. *J. Diabetes* 9, 362–377. doi:10.1111/1753-0407.12421
- Corftsen, H. T., Krantz, B., Larsen, A., and Drago, A. (2020). Molecular Pathway Analysis Associates Alterations in Obesity-Related Genes and Antipsychotic-Induced Weight Gain. *Acta Neuropsychiatr.* 32, 72–83. doi:10.1017/neu.2019.41
- Correll, C. U., Robinson, D. G., Schooler, N. R., Brunette, M. F., Mueser, K. T., Rosenheck, R. A., et al. (2014). Cardiometabolic Risk in Patients with First-Episode Schizophrenia Spectrum Disorders: Baseline Results from the RAISE-ETP Study. *JAMA Psychiatry* 71, 1350–1363. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.1314
- Das, S., Forer, L., Schönherr, S., Sidore, C., Locke, A. E., Kwong, A., et al. (2016). Next-generation Genotype Imputation Service and Methods. *Nat. Genet.* 48, 1284–1287. doi:10.1038/ng.3656
- De Hert, M., Detraux, J., Van Winkel, R., Yu, W., and Correll, C. U. (2012). Metabolic and Cardiovascular Adverse Effects Associated with Antipsychotic Drugs. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 114–126. doi:10.1038/nrendo.2011.156
- Devlin, A. M., and Panagiotopoulos, C. (2015). Metabolic Side Effects and Pharmacogenetics of Second-Generation Antipsychotics in Children. *Pharmacogenomics* 16, 981–996. doi:10.2217/pgs.15.55
- Doane, M. J., Sajatovic, M., Weiden, P. J., O'Sullivan, A. K., Maher, S., Bjorner, J. B., et al. (2020). Antipsychotic Treatment Experiences of People with Schizophrenia: Patient Perspectives from an Online Survey. *Patient Prefer. Adherence* 14, 2043–2054. doi:10.2147/PPA.S270020
- Fernandez-Egea, E., Miller, B., Garcia-Rizo, C., Bernardo, M., and Kirkpatrick, B. (2011). Metabolic Effects of Olanzapine in Patients with Newly Diagnosed Psychosis. *J. Clin. Psychopharmacol.* 31, 154–159. doi:10.1097/JCP.0b013e31820fcea3
- Foley, D. L., and Morley, K. I. (2011). Systematic Review of Early Cardiometabolic Outcomes of the First Treated Episode of Psychosis. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 609–616. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.2
- Gamazon, E. R., Wheeler, H. E., Shah, K. P., Mozaffari, S. V., Aquino-Michaels, K., Carroll, R. J., et al. (2015). A Gene-Based Association Method for Mapping Traits Using Reference Transcriptome Data. *Nat. Genet.* 47, 1091–1098. doi:10.1038/ng.3367
- Gassó, P., Arnaiz, J. A., Mas, S., Lafuente, A., Bioque, M., Cuesta, M. J., et al. (2020). Association Study of Candidate Genes with Obesity and Metabolic Traits in Antipsychotic-Treated Patients with First-Episode Psychosis over a 2-year Period. *J. Psychopharmacol.* 34, 514–523. doi:10.1177/0269881120903462
- Gebhardt, S., Theisen, F. M., Haberhausen, M., Heinzl-Gutenbrunner, M., Wehmeier, P. M., Krieg, J. C., et al. (2010). Body Weight Gain Induced by Atypical Antipsychotics: an Extension of the Monozygotic Twin and Sib Pair Study. *J. Clin. Pharm. Ther.* 35, 207–211. doi:10.1111/j.1365-2710.2009.01084.x
- Girard, S. L., Dion, P. A., Bourassa, C. V., Geoffroy, S., Lachance-Touchette, P., Barhdadi, A., et al. (2015). Mutation burden of Rare Variants in Schizophrenia Candidate Genes. *PLoS One* 10, e0128988. doi:10.1371/journal.pone.0128988
- Gusev, A., Mancuso, N., Won, H., Kousi, M., Finucane, H. K., Reshef, Y., et al. (2018). Transcriptome-wide Association Study of Schizophrenia and Chromatin Activity Yields Mechanistic Disease Insights. *Nat. Genet.* 50, 538–548. doi:10.1038/s41588-018-0092-1
- Hálfánarson, Ó., Zoëga, H., Aagaard, L., Bernardo, M., Brandt, L., Fusté, A. C., et al. (2017). International Trends in Antipsychotic Use: A Study in 16 Countries, 2005–2014. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27, 1064–1076. doi:10.1016/j.euroneuro.2017.07.001
- He, L., Naik, K., Meng, S., Cao, J., Sidhaye, A. R., Ma, A., et al. (2012). Transcriptional Co-activator P300 Maintains Basal Hepatic Gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 32069–32077. doi:10.1074/jbc.M112.385864
- Henderson, D. C., Cagliero, E., Copeland, P. M., Borba, C. P., Evins, A. E., Hayden, D., et al. (2005). Glucose Metabolism in Patients with Schizophrenia Treated

- with Atypical Antipsychotic Agents: a Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test and Minimal Model Analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 19–28. doi:10.1001/archpsyc.62.1.19
- Holt, R. I., and Peveler, R. C. (2009). Obesity, Serious Mental Illness and Antipsychotic Drugs. *Diabetes Obes. Metab.* 11, 665–679. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01038.x
- Huang, H., Tang, S., Ji, M., Tang, Z., Shimada, M., Liu, X., et al. (2018). p300-mediated Lysine 2-hydroxyisobutyrylation Regulates Glycolysis. *Mol. Cell* 70, 984–678. doi:10.1016/j.molcel.2018.05.035
- Islam, F., Men, X., Yoshida, K., Zai, C. C., and Müller, D. J. (2021). Pharmacogenetics-guided Advances in Antipsychotic Treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2021, 1. doi:10.1002/cpt.2339
- Kritharides, L., Chow, V., and Lambert, T. J. (2017). Cardiovascular Disease in Patients with Schizophrenia. *Med. J. Aust.* 207, 179–195. doi:10.5694/mja17.00258
- Langfelder, P., and Horvath, S. (2008). WGCNA: An R Package for Weighted Correlation Network Analysis. *BMC Bioinformatics* 9, 559. doi:10.1186/1471-2105-9-559
- Lett, T. A., Wallace, T. J., Chowdhury, N. I., Tiwari, A. K., Kennedy, J. L., and Müller, D. J. (2012). Pharmacogenetics of Antipsychotic-Induced Weight Gain: Review and Clinical Implications. *Mol. Psychiatry* 17, 242–266. doi:10.1038/mp.2011.109
- Liao, C., Laporte, A. D., Spiegelman, D., Akçimen, F., Joobar, R., Dion, P. A., et al. (2019). Transcriptome-wide Association Study of Attention Deficit Hyperactivity Disorder Identifies Associated Genes and Phenotypes. *Nat. Commun.* 10, 4450–4457. doi:10.1038/s41467-019-12450-9
- Lindström, S., Wang, L., Smith, E. N., Gordon, W., Van Hylckama Vlieg, A., De Andrade, M., et al. (2019). Genomic and Transcriptomic Association Studies Identify 16 Novel Susceptibility Loci for Venous Thromboembolism. *Blood* 134, 1645–1657. doi:10.1182/blood.2019.00435
- Maciukiewicz, M., Tiwari, A. K., Zai, C. C., Gorbovskaya, I., Laughlin, C. P., Nurmi, E. L., et al. (2019). Genome-wide Association Study on Antipsychotic-Induced Weight Gain in Europeans and African-Americans. *Schizophr. Res.* 212, 204–212. doi:10.1016/j.schres.2019.07.022
- MacNeil, R. R., and Müller, D. J. (2016). Genetics of Common Antipsychotic-Induced Adverse Effects. *Mol. Neuropsychiatry* 2, 61–78. doi:10.1159/000445802
- Malhotra, A. K., Correll, C. U., Chowdhury, N. I., Müller, D. J., Gregersen, P. K., Lee, A. T., et al. (2012). Association between Common Variants Near the Melanocortin 4 Receptor Gene and Severe Antipsychotic Drug-Induced Weight Gain. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 904–912. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2012.191
- Mas, S., Boloc, D., Rodríguez, N., Mezquida, G., Amoretti, S., Cuesta, M. J., et al. (2020). Examining Gene-Environment Interactions Using Aggregate Scores in a First-Episode Psychosis Cohort. *Schizophr. Bull.* 46, 1019–1025. doi:10.1093/schbul/sbaa012
- Mas, S., Gassó, P., and Lafuente, A. (2015). Applicability of Gene Expression and Systems Biology to Develop Pharmacogenetic Predictors; Antipsychotic-Induced Extrapyramidal Symptoms as an Example. *Pharmacogenomics* 16, 1975–1988. doi:10.2217/pgs.15.134
- Mas, S., Llerena, A., Saiz, J., Bernardo, M., and Lafuente, A. (2012). Strengths and Weaknesses of Pharmacogenetic Studies of Antipsychotic Drugs: The Potential Value of the PEPs Study. *Pharmacogenomics* 13, 1773–1782. doi:10.2217/pgs.12.159
- Mínguez, P., Götz, S., Montaner, D., Al-Shahrour, F., and Dopazo, J. (2009). SNOW, a Web-Based Tool for the Statistical Analysis of Protein-Protein Interaction Networks. *Nucleic Acids Res.* 37, W109–W114. doi:10.1093/nar/gkp402
- Mitchell, A. J., Vancampfort, D., De Herdt, A., Yu, W., and De Hert, M. (2013). Is the Prevalence of Metabolic Syndrome and Metabolic Abnormalities Increased in Early Schizophrenia? A Comparative Meta-Analysis of First Episode, Untreated and Treated Patients. *Schizophr. Bull.* 39, 295–305. doi:10.1093/schbul/sbs082
- Morris, A. P., Voight, B. F., Teslovich, T. M., Ferreira, T., Segre, A. V., Steinthorsdottir, V., et al. (2012). Large-scale Association Analysis Provides Insights into the Genetic Architecture and Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Nat. Genet.* 44, 981–990. doi:10.1038/ng.2383
- Mosley, A. L., Corbett, J. A., and Özcan, S. (2004). Glucose Regulation of Insulin Gene Expression Requires the Recruitment of P300 by the Beta-cell-specific Transcription Factor Pdx-1. *Mol. Endocrinol.* 18, 2279–2290. doi:10.1210/me.2003-0463
- Namwanje, M., Liu, L., Chan, M., Aaron, N., Kraakman, M. J., and Qiang, L. (2019). The Depot-specific and Essential Roles of CBP/p300 in Regulating Adipose Plasticity. *J. Endocrinol.* 240, 257–269. doi:10.1530/JOE-18-0361
- Newcomer, J. W., Haupt, D. W., Fucetola, R., Melson, A. K., Schweiger, J. A., Cooper, B. P., et al. (2002). Abnormalities in Glucose Regulation during Antipsychotic Treatment of Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 337–345. doi:10.1001/archpsyc.59.4.337
- Nicol, G. E., Yingling, M. D., Flavin, K. S., Schweiger, J. A., Patterson, B. W., Schechtman, K. B., et al. (2018). Metabolic Effects of Antipsychotics on Adiposity and Insulin Sensitivity in Youths: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry* 75, 788–796. doi:10.1001/jamapsychiatry.2018.1088
- Nicolae, D. L., Gamazon, E., Zhang, W., Duan, S., Dolan, M. E., and Cox, N. J. (2010). Trait-associated SNPs Are More Likely to Be eQTLs: Annotation to Enhance Discovery from GWAS. *Plos Genet.* 6, e1000888. doi:10.1371/journal.pgen.1000888
- Pillinger, T., McCutcheon, R. A., Vano, L., Mizuno, Y., Arumham, A., Hindley, G., et al. (2020). Comparative Effects of 18 Antipsychotics on Metabolic Function in Patients with Schizophrenia, Predictors of Metabolic Dysregulation, and Association with Psychopathology: a Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Lancet Psychiatry* 7, 64–77. doi:10.1016/S2215-0366(19)30416-X
- Randhawa, V., Sharma, P., Bhushan, S., and Bagler, G. (2013). Identification of Key Nodes of Type 2 Diabetes Mellitus Protein Interactome and Study of Their Interactions with Phloridzin. *OMICS* 17, 302–317. doi:10.1089/omi.2012.0115
- Reynolds, G. P., and McGowan, O. O. (2017). Mechanisms Underlying Metabolic Disturbances Associated with Psychosis and Antipsychotic Drug Treatment. *J. Psychopharmacol.* 31, 1430–1436. doi:10.1177/0269881117722987
- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T., Farth, K.-H., Holmans, P. A., et al. (2014). Biological Insights from 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci. *Nature* 511, 421–427. doi:10.1038/nature13595
- Shams, T. A., and Müller, D. J. (2014). Antipsychotic Induced Weight Gain: Genetics, Epigenetics, and Biomarkers Reviewed. *Curr. Psychiatry Rep.* 16, 473. doi:10.1007/s11920-014-0473-9
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303
- Teff, K. L., Rickels, M. R., Grudziak, J., Fuller, C., Nguyen, H. L., and Rickels, K. (2013). Antipsychotic-induced Insulin Resistance and Postprandial Hormonal Dysregulation Independent of Weight Gain or Psychiatric Disease. *Diabetes* 62, 3232–3240. doi:10.2337/db13-0430
- Tek, C., Kucukgoncu, S., Guloksuz, S., Woods, S. W., Srihari, V. H., and Annamalai, A. (2016). Antipsychotic-induced Weight Gain in First-Episode Psychosis Patients: A Meta-Analysis of Differential Effects of Antipsychotic Medications. *Early Interv. Psychiatry* 10, 193–202. doi:10.1111/eip.12251
- ter Hark, S. E., Jamain, S., Schijven, D., Lin, B. D., Bakker, M. K., Boland-Auge, A., et al. (2020). A New Genetic Locus for Antipsychotic-Induced Weight Gain: A Genome-wide Study of First-Episode Psychosis Patients Using Amisulpride (From the OPTiMiSE Cohort). *J. Psychopharmacol.* 34, 524–531. doi:10.1177/0269881120907972
- Ward, A., Quon, P., Abouzaid, S., Haber, N., Ahmed, S., and Kim, E. (2013). Cardiometabolic Consequences of Therapy for Chronic Schizophrenia Using Second-Generation Antipsychotic Agents in a Medicaid Population: Clinical and Economic Evaluation. *P T* 38, 109–115.
- Wedervang-Resell, K., Friis, S., Lonning, V., Smelror, R. E., Johannessen, C., Agartz, I., et al. (2020). Lipid Alterations in Adolescents with Early-Onset Psychosis May Be Independent of Antipsychotic Medication. *Schizophr. Res.* 216, 295–301. doi:10.1016/j.schres.2019.11.039
- Wondisford, A. R., Xiong, L., Chang, E., Meng, S., Meyers, D. J., Li, M., et al. (2014). Control of Foxo1 Gene Expression by Co-activator P300. *J. Biol. Chem.* 289, 4326–4333. doi:10.1074/jbc.M113.540500
- Wong, C. K., Wade-Vallance, A. K., Luciani, D. S., Brindle, P. K., Lynn, F. C., and Gibson, W. T. (2018). The P300 and CBP Transcriptional Coactivators Are Required for β -Cell and α -Cell Proliferation. *Diabetes* 67, 412–422. doi:10.2337/db17-0237
- Wu, C., Tan, S., Liu, L., Cheng, S., Li, P., Li, W., et al. (2021). Transcriptome-wide Association Study Identifies Susceptibility Genes for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 23, 38. doi:10.1186/s13075-021-02419-9

- Yano, H., Sakai, M., Matsukawa, T., Yagi, T., Naganuma, T., Mitsushima, M., et al. (2018). PHD3 Regulates Glucose Metabolism by Suppressing Stress-Induced Signalling and Optimising Gluconeogenesis and Insulin Signalling in Hepatocytes. *Sci. Rep.* 8, 14290. doi:10.1038/s41598-018-32575-z
- Yao, W., Wang, T., and Huang, F. (2018). P300/CBP as a Key Nutritional Sensor for Hepatic Energy Homeostasis and Liver Fibrosis. *Biomed. Res. Int.* 2018, 8168791. doi:10.1155/2018/8168791
- Yoshida, K., and Müller, D. J. (2020). Pharmacogenetics of Antipsychotic Drug Treatment: Update and Clinical Implications. *Mol. Neuropsychiatry* 5, 1–26. doi:10.1159/000492332
- Yu, H., Wang, L., Lv, L., Ma, C., Du, B., Lu, T., et al. (2016). Genome-wide Association Study Suggested the PTPRD Polymorphisms Were Associated with Weight Gain Effects of Atypical Antipsychotic Medications. *Schizophr. Bull.* 42, 814–823. doi:10.1093/schbul/sbv179
- Zhang, J. P., Lencz, T., Zhang, R. X., Nitta, M., Maayan, L., John, M., et al. (2016). Pharmacogenetic Associations of Antipsychotic Drug-Related Weight Gain: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Schizophr. Bull.* 42, 1418–1437. doi:10.1093/schbul/sbw058
- Zhang, J. P., and Malhotra, A. K. (2018). Recent Progress in Pharmacogenomics of Antipsychotic Drug Response. *Curr. Psychiatry Rep.* 20, 24. doi:10.1007/s11920-018-0886-y
- Zhao, W., Langfelder, P., Fuller, T., Dong, J., Li, A., and Hovarth, S. (2010). Weighted Gene Coexpression Network Analysis: State of the Art. *J. Biopharm. Stat.* 20, 281–300. doi:10.1080/10543400903572753
- Zhou, F., Liu, Q., Zhang, L., Zhu, Q., Wang, S., Zhu, K., et al. (2020). Selective Inhibition of CBP/p300 HAT by A-485 Results in Suppression of Lipogenesis and Hepatic Gluconeogenesis. *Cell Death Dis.* 11, 745. doi:10.1038/s41419-020-02960-6

Conflict of Interest: MP has been a consultant for and received educational honoraria and travel grants from Exeltis, Janssen-Cilag, Otsuka and Servier. JS-R has been a speaker for and on the advisory boards of Lilly, GlaxoSmithKline, Lundbeck, Janssen, Servier, and Pfizer and has received grant/honoraria from Lilly and Astra-Zeneca. MB has been a consultant for, received grant/research support and honoraria from, and been on the speakers/advisory board of ABBiotics, Adamed, Almirall, AMGEN, Boehringer, Eli Lilly, Ferrer, Forum Pharmaceuticals, Gedeon, Hersill, Janssen-Cilag, Lundbeck, Otsuka, Pfizer, Roche, and Servier.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Martínez-Pinteño, Gassó, Prohens, Segura, Parellada, Saiz-Ruiz, Cuesta, Bernardo, Lafuente, Mas and Rodríguez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary material

MATERIALS AND METHODS

Animals and drug treatment

C57BL/6J01aHsd male and female mice were purchased at 6 weeks of age from Harlan Laboratories (Sant Feliu de Codines, Spain) and housed in the laboratory animal center of the Faculty of Medicine at the University of Barcelona. Mice were maintained at 22°C on a 12-hour alternating light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water, using a standard chow diet.

After allowing the animals to acclimatize for at least ten days, they were randomly divided into three experimental groups: one received a daily subcutaneous (0.25 ml, 25G needle) dose of vehicle (saline containing 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 5% Tween 20), one received risperidone (1 mg/kg), and one received olanzapine (3.5 mg/kg) chronically for 28 days. Drug doses were chosen based on previous studies (Mas et al., 2016; Chen et al., 2018; May et al., 2019). Risperidone and olanzapine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) were dissolved in saline containing 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 5% Tween 20. Each group included 8 animals (4 males and 4 females).

All animal-related procedures were performed in accordance with the European Union guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Animal Care Committee of the University of Barcelona and by the Department of the Environment of the Generalitat de Catalunya.

Metabolic assessment in mice

Several metabolic parameters (including body weight, blood glucose levels, total cholesterol levels and triglyceride levels) were assessed in all mice at baseline (one week before the start of AP treatment) and after 28 days of treatment. Blood glucose levels were measured in the morning, after 6 hours of fasting, using a glucometer AlphaTRAK® 2 (Zoetis, Parsippany, NJ, USA), which uses coulometric technology to measure glucose in whole blood. Following the manufacturer's recommendations, the glucometer was calibrated with the manufacturer's control sample every time a new package of strips was opened. AlphaTRAK® 2 was set to "Dog Code" as indicated for its use in C57BL/6J mice (Zoetis, 2015). Blood samples were collected through tail-vein puncture by using AlphaTRAK® animal lancets (Zoetis); 0.3µl of whole blood was needed for the measurement.

Once the fasting glucose measurement was obtained, blood samples were collected to assess the levels of total cholesterol and triglycerides. For the evaluation at baseline, the distal tip (1 - 1.5 mm) of the tail was removed using a sterile scalpel blade. Blood samples (80-100µl) were collected by gently milking the tail from the base to the tip into Eppendorf tubes with heparin (40UI) and flow was stopped applying pressure with sterile gauze to achieve hemostasis. This procedure took less than 1 minute. For the blood collection after 28 days of treatment, the animal had already been sacrificed previously by decapitation. Then, blood was centrifugated at 4000 rpm (1252 g) during 10 minutes and the supernatant was collected. The levels of cholesterol and triglycerides were

measured using the corresponding assay kit (Cholesterol Liquid and Triglycerides Liquid; Química Clínica Aplicada S.A., Amposta, Spain). Absorbance was measured at 505 nm using a microplate reader Tecan Spark® (Tecan, Männedorf, Switzerland). Each measure was done at least in duplicate.

Tissue collection, RNA isolation and microarray hybridization

After 28 days of treatment, animals were sacrificed by decapitation 1 hour after the last injection. Then, their tissues were rapidly removed and placed on ice. In the present study, four tissues that are potentially relevant for the development of AP-induced metabolic adverse events were used: the liver, the pancreas, visceral adipose tissue (obtained from the gonadal fat pads) and the striatum (dissected out of the brain). All tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and preserved at -80°C until analysis. The tissue samples were homogenized in Trizol reagent (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and total RNA was isolated following the manufacturer's instructions. The RNA samples were then further purified using the miTotal RNA Extraction Miniprep System (Viogene Biotek Corp, New Taipei City, Taiwan). RNA quantity and quality were determined using a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). An Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used to assess the purity and integrity of the RNA.

A total of 1200 ng of purified RNA from each of the samples was submitted to the Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik Microarray Technology (KFB, BioPark Regensburg GmbH, Regensburg, Germany) for labeling and hybridization to microarray plates. Two different protocols were used for sample processing based on the RNA quality and amount. Samples from the striatum and the liver were prepared with the Affymetrix GeneChip WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), whereas samples from the pancreas and adipose tissue were prepared using the Affymetrix GeneChip WT Pico Reagent Kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA). The resulting cDNA was hybridized to the Affymetrix mouse Clariom S Arrays (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), which comprises more than 221 000 probes targeting more than 22 000 genes.

Microarray data analysis

Full details of the extraction, labeling and hybridization protocols as well as the raw array data (.cel files) and the pre-processed data matrix are available at the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; accession number GSE180473).

Pre-processing

The pre-processing of microarray data was performed using the Babelomics 5.0 suite (<http://www.babelomics.org/>) (Alonso et al., 2015). The data were standardized using robust multichip analysis. Multiple probes mapping to the same gene were merged, using the average as the sum of the hybridization values.

Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

WGCNA identifies gene correlation patterns across different samples and groups highly co-expressed genes into modules that can be related to clinical traits (Langfelder and Horvath, 2008). Here, the WGCNA R package was used to identify gene co-expression

modules (<https://cran.r-project.org/web/packages/WGCNA/index.html>). First, a matrix of pairwise correlations between all pairs of genes across all samples was constructed. Next, a soft-thresholding power of 9 was used to obtain an adjacency matrix, a measurement of topology similarity, which was then transformed into a topological overlap matrix (TOM) and the corresponding dissimilarity. Afterwards, the dissimilarity matrix was used to construct a hierarchical clustering dendrogram whose branches were cut using the dynamic tree-cutting algorithm to obtain different modules of co-expressed genes. The above steps were performed using the automatic network construction and module detection function (*blockwiseModules* in WGCNA), with the following parameters: a *minModuleSize* of 30; a *reassignThreshold* of 0; and a *mergeCutHeight* of 0.25. The association of the different modules with AP treatment (risperidone or olanzapine) was evaluated by calculating the correlation between the module eigengenes (MEs, the first principal component of each module) and the treatment status (risperidone vs vehicle or olanzapine vs vehicle). Modules with a significant correlation (p-value < 0.05) were selected for further analysis. For all the genes included in each significant module, the gene significance (GS, representing the association between each gene expression and AP treatment) and its module membership (MM, the correlation between gene expression and the module eigengene) were calculated.

Gene set enrichment analysis

To provide a functional interpretation of the different transcriptional activities identified, a gene set enrichment analysis was performed using the genes included in each gene co-expression module that was significantly associated with AP treatment (risperidone or olanzapine). First, mouse genes were converted into human orthologs in order to use the most well-described human annotation databases. The analysis was conducted using FatiGO (Al-Shahrour et al., 2007), a web-based tool implemented in the Babelomics 5.0 suite that uses Fisher's exact test to identify the biological processes significantly overrepresented in a set of genes. Gene Ontology (GO) terms (Ashburner et al., 2000) were used to define the biological processes and a functional enrichment of the submitted gene lists was performed against the rest of the genome. Only functional terms with a false discovery rate (FDR)-corrected p-value < 0.05 were considered significantly enriched. The GO terms related to metabolic processes and metabolic dysregulation were then selected for further analysis. This prioritization was achieved by a final consensus among four independent researchers.

Protein-protein interaction (PPI) network construction and evaluation

Genes included in the selected GO terms were used to create a single PPI network for each AP (risperidone or olanzapine). The minimum connected network (MCN), defined as the shortest network connecting all the interacting nodes within a gene list, was obtained using the SNOW program (Minguez et al., 2009) implemented in the Babelomics 5.0 suite. Briefly, we used the curated interactome (validated by at least two independent methods) and allowed the inclusion of extra nodes that were not included in our list and that connected two or more nodes in the list. Network enrichment analysis was performed to test whether the parameters that described the network were beyond random expectations or not. The parameters analyzed were the degree of connectivity, the clustering coefficient and the betweenness centrality. The PPI networks obtained were visualized and analyzed using Cytoscape 3.7.2 (Shannon et al., 2003). A single PPI network integrating both APs was also constructed by merging the networks obtained independently for risperidone and olanzapine using the intersection option in Cytoscape.

For each node, the degree of connectivity, which accounts for the number of edges or direct interactions a particular node has, was calculated to identify the candidate hub genes from the constructed PPI networks.

Exploration of the hub genes in a naturalistic cohort of patients with FEP

Participants

From the original sample of 335 patients with FEP recruited in the project “Phenotype–genotype and environmental interaction: application of a predictive model in first-episode psychosis, FIS PI080208” (known as the PEPs study from the Spanish abbreviation for first-episode psychosis), 302 participants were prescribed at least one second-generation AP during the follow-up period. Of these, 226 (age 23.6 ± 6.0 years; 66.8% were males) provided biological samples for genotyping and completed the six-month follow-up period. As this was a naturalistic study, there were no specific guidelines for treatments (drugs and/or psychotherapy). During the follow-up period, about 40% of the patients were treated with olanzapine or clozapine, which have the highest risk of inducing weight gain or worsening metabolic parameters, while more than 50% were administered APs with an intermediate or low risk of causing such side effects, with risperidone and aripiprazole being the most frequently prescribed in this group.

A complete description of the protocol for the PEPs study has been published (Bernardo et al., 2013; Bioque et al., 2016). The study was approved by the ethics committees of all the participating clinical centers. Informed consent was obtained from all the participants. In the case of children under 16 years of age, parents or legal guardians gave written informed consent before study participation, while the patients themselves also agreed to participate.

Metabolic assessment

Several anthropometric and metabolic traits were assessed at each visit during the PEPs study (Bioque et al., 2018; Gassó et al., 2020). The metabolic-related variables measured were body weight, body mass index (BMI), blood glucose levels, total cholesterol levels, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels and triglyceride (TG) levels. For the present study, we calculated the percentage of change for each parameter between the six-month follow-up and the baseline visit.

Sample collection, genotyping and SNP imputation

Blood samples from all participants were collected in EDTA tubes (K2EDTA BD Vacutainer; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Genomic DNA was extracted using the MagNA Pure LC DNA isolation Kit III and an LC MagNA Pure system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The concentration and quality of DNA were measured using a NanoDrop 2000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Samples from all the individuals in the study were genotyped at the Centro Nacional de Genotipado (CeGen, Santiago de Compostela, Spain), using the Affymetrix Axiom Spain Biobank Array containing probes for 758 740 SNPs. The genotyping data were then called using the Axiom Analysis Suite (Mas et al., 2020). The genotyping data were submitted to the Michigan Imputation Server (Das et al., 2016), following the standard pipeline for the

Minimac4 software and setting the European population reference from the GRCh37/hg19 build and Eagle v2.4 phasing.

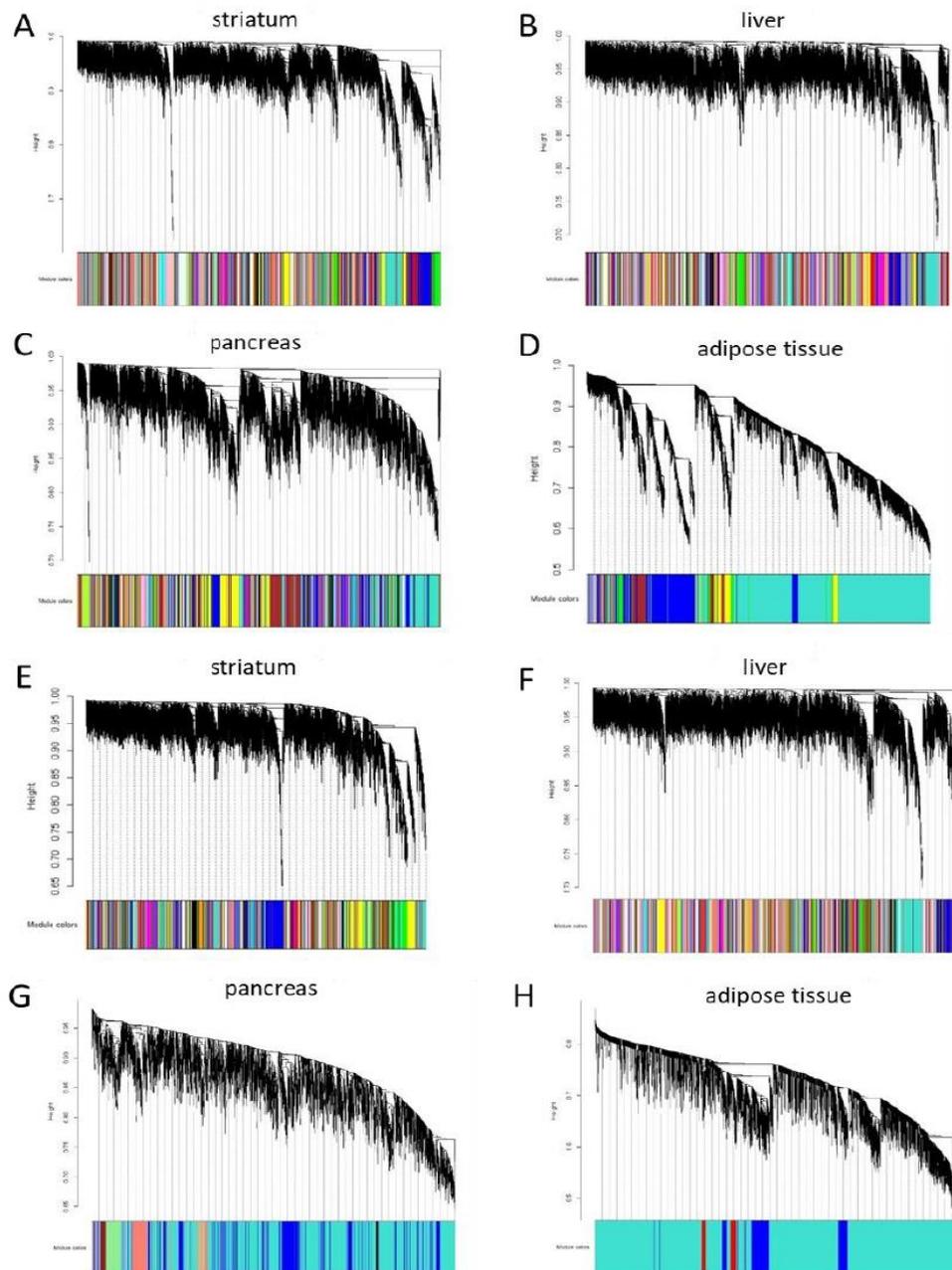
Gene expression prediction

Genotyping data were used to predict the genetically regulated gene expression levels for each individual through the gene expression imputation method, PrediXcan (Gamazon et al., 2015). PrediXcan uses reference transcriptome datasets from the Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project to train additive models of gene expression levels. After that, these models are used to estimate the genetically regulated expression of genes that constitutes the prediction of expression levels using multiple SNPs. These predictive models are used to 'impute' gene expression in local data. Gene expression of the previously identified hub genes was predicted using the multivariate shrinkage (mashr) models built from the GTEx version 8 available at <https://predictdb.org/>. We predicted expression levels in five different tissues that are potentially relevant for the development of AP-induced metabolic adverse events, including the small intestine, the pancreas, the liver, visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue, following the standard procedure found at <https://github.com/hakyimlab/PrediXcan>.

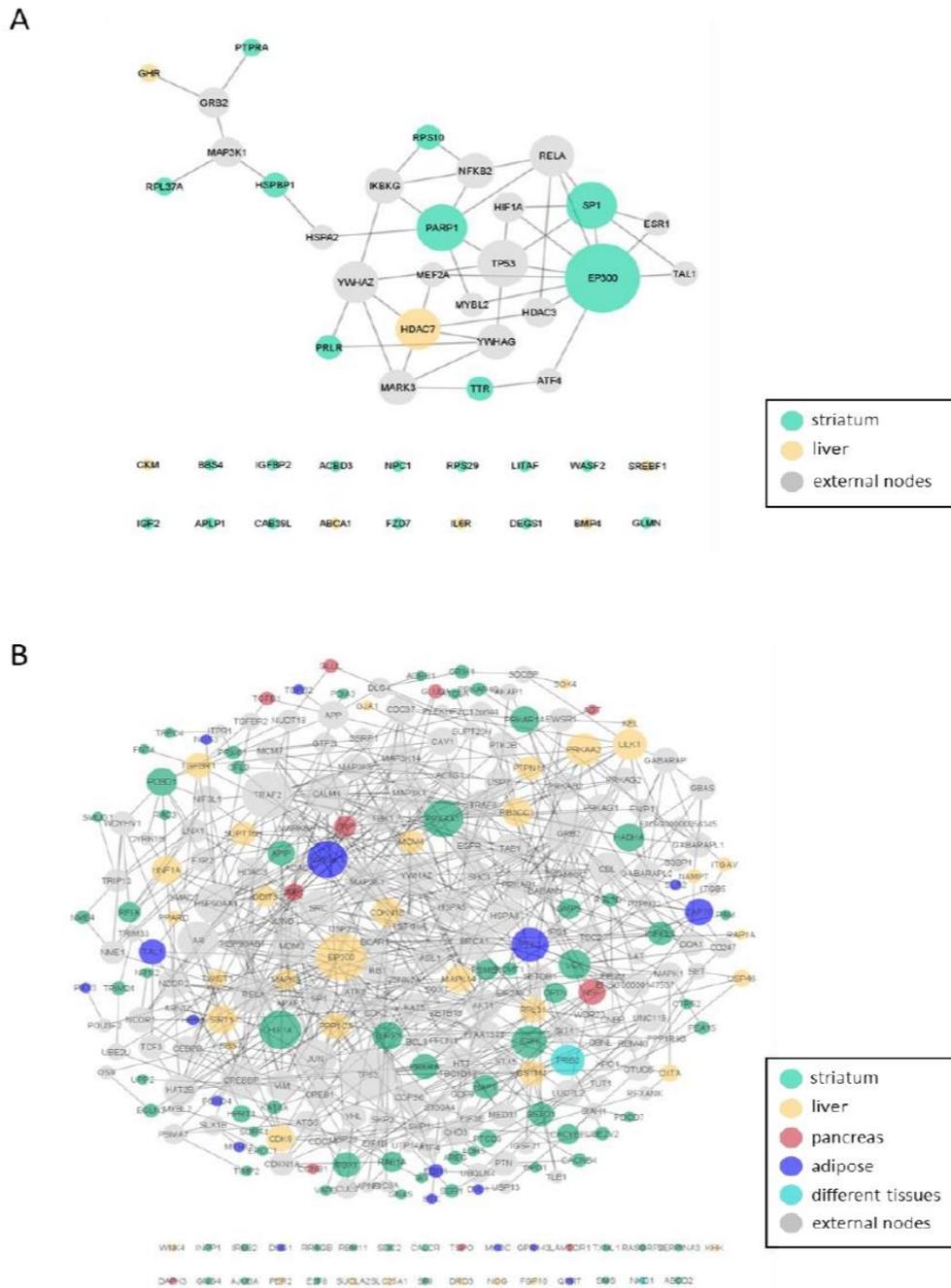
Statistics

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics version 20.0 (IBM Corp, Chicago, IL, USA). Normality was assessed using Kolmogorov-Smirnov test. The predicted gene expression levels of the *EP300* gene were categorized as low, medium or high according to the three values of gene expression obtained in each tissue (-0.13, -0.07 and 0.00, respectively). Differences in metabolic variables between these categories were tested using analysis of variance. The analysis was adjusted for sociodemographic and clinical variables that might affect the parameters assessed, including gender, age, and the type of AP according to its potency (high, low, or no risk of increasing weight or worsening metabolic parameters). A further pairwise comparison analysis was performed using Bonferroni's post-hoc test.

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1. Clustering dendrogram showing the co-expression modules identified in the striatum, liver, pancreas and adipose tissue of risperidone-treated mice (A-D) and olanzapine-treated mice (E-H). Each module is represented by a different color in the corresponding color bar below the dendrogram.



Supplementary Figure 2. Protein-protein interaction networks constructed using the genes included in the selected GO terms that were significantly enriched in the co-expression modules identified for risperidone (A) and olanzapine (B). Node size represents the number of connections (degree) of each gene.

REFERENCES

- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D., et al. (2007). FatiGO +: A functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res.* 35, 91–96. doi:10.1093/nar/gkm260.
- Alonso, R., Salavert, F., Garcia-Garcia, F., Carbonell-Caballero, J., Bleda, M., Garcia-Alonso, L., et al. (2015). Babelomics 5.0: Functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res.* 43, W117–W121. doi:10.1093/nar/gkv384.
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., et al. (2000). Gene ontology: Tool for the identification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. doi:10.1038/75556.
- Bernardo, M., Bioque, M., Parellada, M., Ruiz, J. S., Cuesta, M. J., Llerena, A., et al. (2013). Assessing clinical and functional outcomes in a gene–environment interaction study in first episode of psychosis (PEPs). *Rev. Psiquiatr. y Salud Ment. (English Ed.* 6, 4–16. doi:10.1016/j.rpsmen.2012.11.001.
- Bioque, M., García-Portilla, M. P., García-Rizo, C., Cabrera, B., Lobo, A., González-Pinto, A., et al. (2018). Evolution of metabolic risk factors over a two-year period in a cohort of first episodes of psychosis. *Schizophr. Res.* 193, 188–196. doi:10.1016/j.schres.2017.06.032.
- Bioque, M., Llerena, A., Cabrera, B., Mezquida, G., Lobo, A., González-Pinto, A., et al. (2016). A pharmacovigilance study in first episode of psychosis: psychopharmacological interventions and safety profiles in the PEPs Project. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, 1–10. doi:10.1093/ijnp/pyv121.
- Chen, C. H., Shyue, S. K., Hsu, C. P., and Lee, T. S. (2018). Atypical antipsychotic drug olanzapine deregulates hepatic lipid metabolism and aortic inflammation and aggravates atherosclerosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 50, 1216–1229. doi:10.1159/000494573.
- Das, S., Forer, L., Schönherr, S., Sidore, C., Locke, A. E., Kwong, A., et al. (2016). Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat. Genet.* 48, 1284–1287. doi:10.1038/ng.3656.
- Gamazon, E. R., Wheeler, H. E., Shah, K. P., Mozaffari, S. V., Aquino-Michaels, K., Carroll, R. J., et al. (2015). A gene-based association method for mapping traits using reference transcriptome data. *Nat. Genet.* 47, 1091–1098. doi:10.1038/ng.3367.
- Gassó, P., Arnaiz, J. A., Mas, S., Lafuente, A., Bioque, M., Cuesta, M. J., et al. (2020). Association study of candidate genes with obesity and metabolic traits in antipsychotic-treated patients with first-episode psychosis over a 2-year period. *J. Psychopharmacol.* 34, 514–523. doi:10.1177/0269881120903462.
- Langfelder, P., and Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9, 559. doi:10.1186/1471-2105-9-559.
- Mas, S., Boloc, D., Rodríguez, N., Mezquida, G., Amoretti, S., Cuesta, M. J., et al. (2020). Examining gene-environment interactions using aggregate scores in a first-episode psychosis cohort. *Schizophr. Bull.* 46, 1019–1025.

- doi:10.1093/schbul/sbaa012.
- Mas, S., Gassó, P., Boloc, D., Rodriguez, N., Mármol, F., Sánchez, J., et al. (2016). Network analysis of gene expression in mice provides new evidence of involvement of the mTOR pathway in antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms. *Pharmacogenomics J.* 16, 293–300. doi:10.1038/tpj.2015.48.
- May, M., Beauchemin, M., Vary, C., Barlow, D., and Houseknecht, K. L. (2019). The antipsychotic medication, risperidone, causes global immunosuppression in healthy mice. *PLoS One* 14, e0218937. doi:10.1371/journal.pone.0218937.
- Mínguez, P., Götz, S., Montaner, D., Al-Shahrour, F., and Dopazo, J. (2009). SNOW, a web-based tool for the statistical analysis of protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res.* 37, W109–W114. doi:10.1093/nar/gkp402.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303.
- Zoetis 2015. AlphaTRAK2 blood glucose monitoring system user guide and package insert. Parsippany (NJ): Zoetis Services

Supplementary Table 1. Risperidone co-expression modules that were significantly associated with antipsychotic treatment.

module name	p-value	Number of genes
striatum		
MEblue2	2,71E-02	77
MEdarkred	2,97E-02	179
MEhoneydew	3,72E-02	70
liver		
MElavenderblush	1,94E-04	53
MEtan2	2,45E-03	46
MEslateblue2	5,55E-03	44
MEfloralwhite	8,67E-03	99
MElightcyan1	1,33E-02	100
MEfirebrick2	1,38E-02	57
MEpalevioletred3	1,40E-02	90
MEthistle3	2,50E-02	77
MEbrown2	2,61E-02	79
MEseashell4	2,79E-02	37
MEskyblue2	3,69E-02	83
MEblueviolet	3,87E-02	65
MEdarksalmon	3,88E-02	39
pancreas		
MEplum	1,60E-02	37
MEcoral2	2,14E-02	39
MEivory	3,31E-02	58
MEplum1	3,70E-02	70

Supplementary Table 1. Olanzapine co-expression modules that were significantly associated with antipsychotic treatment.

module name	p-value	Number of genes
striatum		
MEred	4,41E-03	1105 (245) ¹
MEsaddlebrown	7,95E-03	168
MEorange	3,63E-02	209
MEyellow	3,65E-02	1841 (346) ¹
MElightsteelblue1	4,77E-02	111
liver		
MEorangered3	3,66E-03	82
MEdarkolivegreen2	6,97E-03	64
MEbisque4	7,69E-03	100
MElightpink	7,83E-03	43
MEplum	1,55E-02	82
MEseashell4	1,72E-02	35
MEdodgerblue4	1,97E-02	39
MEchocolate3	2,18E-02	50
MEcornsilk	2,44E-02	42
MEthistle	2,66E-02	73
MEcornflowerblue	2,69E-02	49
MEdarkred	2,84E-02	155
MEnavajowhite	2,94E-02	62
MEslateblue	3,54E-02	59
MEgreen1	3,76E-02	36
MEbrown3	3,83E-02	47
MEhoneydew	3,88E-02	69
MEsienna3	3,95E-02	115
MEsaddlebrown	4,05E-02	129
MEslateblue2	4,62E-02	41
MEpink4	4,66E-02	66
pancreas		
MEtan4	1,70E-03	39
MEviolet	7,56E-03	97
MEorangered	1,02E-02	33
MEdarkolivegreen4	1,43E-02	53
MEdarkolivegreen2	1,65E-02	42
MEorangered1	1,70E-02	44
MEfirebrick4	1,94E-02	53
MElightsteelblue	2,91E-02	55
MEorangered3	3,24E-02	56
MEorange	3,66E-02	119
MEdarkseagreen2	3,76E-02	37
MElightsteelblue1	4,07E-02	85
MElightcyan1	4,52E-02	83
MEmistyrose	4,71E-02	36

MElightblue4	4,73E-02	43
adipose tissue		
MEdarkorange2	7,94E-04	43
MElightyellow	4,10E-03	160
MEdarkgrey	2,33E-02	86
MEfloralwhite	2,37E-02	44
MEroyalblue	3,79E-02	154

¹ The total number of genes included in the co-expression module and the number of genes (in brackets) selected for further analysis based on module membership and gene significance are shown.

4.2. Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (*Estudios 2, 3 y 4*)

4.2.1. *Estudio in vitro: modelo celular (Estudio 2)*

Gassó P*, Martínez-Pinteño A*, Rodríguez N, Madero S, Gómez M, González-Segura AG, García-Rizo C, Morén C, Mas S, Parellada E. **Neuroprotective effect of the positive allosteric modulator of the mGluR2 JNJ-46356479 in human neuroblastoma cell cultures.** *International Journal of molecular Science.* (*En revisión*)

El análisis de la viabilidad celular determinada con alamarBlue™ a las 24 y 48 horas de tratamiento farmacológico, en la línea de neuroblastoma SK-N-SH, mostró que el tratamiento con clozapina disminuyó significativamente la viabilidad celular, mostrando una relación dosis-dependiente, después de 24 horas (12-26%, $p < 3 \times 10^{-5}$) y 48 horas (5-37%, $p < 0,008$). Sin embargo, en el tratamiento con JNJ no se observó una alteración significativa de la viabilidad celular a excepción de un pequeño incremento a 10 μM (6%, $p = 6 \times 10^{-4}$) y una pequeña reducción a 25 μM (4%, $p = 0,0025$) a 48 horas. Con las células expuestas a dopamina (100 μM) o glutamato (80 mM), la viabilidad celular a 24 y 48 horas se redujo en un 20% y un 30%, respectivamente. La clozapina a concentraciones de 10 y 25 μM aumentó la toxicidad de la dopamina y del glutamato, constatada por la disminución significativa de la viabilidad celular de manera dosis-dependiente después de 24 horas (dopamina: 20-39%, $p < 3 \times 10^{-6}$; y glutamato: 17-31%, $p < 7 \times 10^{-6}$) y 48 horas (dopamina: 17-45% $p < 8 \times 10^{-4}$; y glutamato: 17-38%, $p < 1 \times 10^{-4}$) en comparación con las células únicamente tratadas con dopamina o glutamato. El tratamiento con JNJ disminuyó significativamente la viabilidad celular solo en los cultivos expuestos a dopamina. Concretamente, en células expuestas a dopamina, el JNJ a concentraciones de 10 y 25 μM redujo la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento (9-17%, $p < 0,014$) y tras 48 horas a 25 μM (17%, $p = 0,001$). Destacar que, con las mismas dosis de fármaco, las células expuestas a dopamina y tratadas

con JNJ mostraron una mayor viabilidad que las tratadas con clozapina después de 24 horas ($p < 0,02$) y 48 horas ($p < 0,023$).

La actividad de caspasa-3 medida a las 24 horas mostró incrementos significativos en las células tratadas con clozapina a 10 y 25 μM (49-116%, $p < 0,02$), mientras que el tratamiento con JNJ no afectó dicha actividad. Las células expuestas a altas concentraciones de dopamina (200 μM) o glutamato (160 mM) experimentaron un aumento de 5 veces en la actividad de caspasa-3. El efecto apoptótico de la dopamina se potenció en células tratadas con clozapina observándose un incremento significativo de los niveles de caspasa-3 con la dosis más alta (60%, $p = 0,003$). De forma opuesta, el tratamiento con JNJ a 25 μM redujo el efecto apoptótico de la dopamina (40%, $p = 0,03$). En cultivos expuestos a glutamato, la dosis más alta de clozapina y JNJ mostró un efecto protector frente a la apoptosis inducida por glutamato, al observarse una reducción en la actividad de caspasa-3 (27-41%, $p < 0,045$).

En los análisis de citometría, los tratamientos con clozapina y JNJ a las diferentes concentraciones no afectaron a la viabilidad celular. Los cultivos celulares expuestos a altas concentraciones de dopamina (200 μM) o glutamato (160 mM) experimentaron un incremento de la apoptosis y de la muerte celular, aumentando 3 veces el número de células con fosfatidilserina en la superficie exterior de la membrana celular y reduciendo un 50% el número de células vivas. Cuando los cultivos expuestos a dopamina se trataron con clozapina o JNJ se observaron efectos similares sobre la viabilidad a 10 y 25 μM (40-60%, $p < 0,0002$) y sobre la muerte celular a 25 μM ($p < 0,005$), ya que ambos fármacos aumentaron la toxicidad de la dopamina de manera dosis-dependiente. Sin embargo, se observaron efectos opuestos en la viabilidad y muerte celular cuando los cultivos celulares expuestos a glutamato se trataron con clozapina o JNJ. Mientras que el tratamiento con clozapina a 25 μM aumentó la toxicidad del glutamato, reduciendo la viabilidad celular e incrementando la muerte celular en un 20% ($p < 0,006$), el tratamiento con JNJ, a 10 y 25 μM , parecía proteger contra dicha toxicidad, aumentando el número de células vivas (21-25%, $p < 0,005$) y disminuyendo, a 25 μM , la muerte celular en un 15% ($p = 0,027$).



Article

Neuroprotective effect of the positive allosteric modulator of the mGluR2 JNJ-46356479 in human neuroblastoma cell cultures

Patricia Gassó^{1,3,4,†,*}, Albert Martínez-Pinteño^{1,†}, Natalia Rodríguez¹, Santiago Madero^{2,3,4}, Marta Gómez^{2,3,4}, Alex G Segura¹, Clemente García-Rizo^{2,3,4}, Constanza Morén^{2,3,5}, Sergi Mas^{1,3,4} and Eduard Parellada^{2,3,4,*}

¹ Dept. of Basic Clinical Practice, University of Barcelona, Spain.

² Barcelona Clínic Schizophrenia Unit (BCSU), Dpt. of Psychiatry, Institute of Neuroscience, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Spain.

³ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain.

⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain.

† These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

* Correspondence: pgasso@ub.edu; eparella@clinic.cat

Citation: Gassó, P.; Martínez-Pinteño, A.; Rodríguez, N.; Madero, S.; Gómez, M.; García-Rizo, C.; Morén, C.; Mas, S.; Parellada, E. Neuroprotective effect of the positive allosteric modulator of the mGluR2 JNJ-46356479 in human neuroblastoma cell cultures. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional

claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Current antipsychotics effectively control positive psychotic symptoms, mainly by blocking dopamine (DA) D2 receptors, but have little effect on negative and cognitive symptoms. Increased glutamate (GLU) release would trigger neurotoxicity leading to apoptosis and synaptic pruning involved in the pathophysiology of schizophrenia. New pharmacological strategies are being developed such as positive allosteric modulators (PAMs) of the metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2) that inhibit the presynaptic release of GLU. We have reported that treatment of adult mice with JNJ-46356479 (JNJ), a recently developed mGluR2 PAM, partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviour in a postnatal ketamine mouse model. In the present study, we evaluated, for the first time, the putative neuroprotective and antiapoptotic activity of JNJ in a human neuroblastoma cell line and compare it with the effect of clozapine (CLZ), as a clinical AP with the highest efficacy and with apparent utility in managing negative symptoms. Specifically, we measured changes in cell viability, caspase-3 activity and cell death produced by CLZ and JNJ alone and in combination with a high DA or GLU concentration, as apoptosis inducers. Our results demonstrate that JNJ-46356479 is not neurotoxic and attenuates the apoptosis, particularly the caspase-3 activation, induced by DA and GLU in neuroblastoma cell cultures. Its effects seem to be less neurotoxic and more neuroprotective than those observed with CLZ. More studies are needed to define the mechanisms of action of this GLU modulator and its potential to become a novel therapeutic agent for schizophrenia.

Keywords: JNJ-46356479; positive allosteric modulator; mGluR2; apoptosis; antipsychotic; schizophrenia

1. Introduction

Schizophrenia is a heterogeneous and complex psychiatric disorder whose etiopathogenesis remains poorly understood [1]. There are different theories involved in the pathophysiology of this psychiatric disorder. The dopamine hypothesis is one of the main theories that explains the development of positive psychotic symptoms. In recent decades this has led to the glutamate hypothesis which also plays a key role in schizophrenia pathophysiology, particularly in the development of negative symptoms and cognitive dysfunction [2,3].

Evidence from pharmacological, post-mortem, brain imaging, and genetic studies supports the role of glutamatergic dysregulation in schizophrenia [4]. This theory was proposed based on the capacity of N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor antagonists, such as ketamine, to mimic the positive, negative and cognitive symptoms of schizophrenia in healthy individuals, and to exacerbate psychotic symptoms and cognitive decline in patients with the disease [5]. The blockade of NMDA receptors in gamma-aminobutyric (GABAergic) interneurons, which express calcium-binding protein parvalbumin (PV), generates a hyperglutamatergic condition as a consequence of decreased inhibitory control of excitatory pyramidal neurons. This leads to increased glutamate release and excessive stimulation of glutamatergic receptors [3]. This results in excitotoxic damage and cognitive impairment [6]. Dendritic spine alterations are thought to be related to the pathology of schizophrenia: there are many reports of decreases in dendritic spine density in different brain regions of patients with the disease [7]. An excess of glutamate would trigger neurotoxicity, apoptosis and synaptic pruning by local activation of caspase-3, leading to a loss of density of dendritic spines in critical brain areas [8,9]. Previous results of our group support this hypothesis. We have observed increased apoptotic susceptibility in primary fibroblast cell cultures from antipsychotic-naïve patients with a first-psychotic episode [10], which showed alterations in the expression of genes involved in the apoptotic pathways [11]. Moreover, correlations between altered apoptotic markers and both the volume of specific brain regions and the concentration of neurometabolites were found by magnetic resonance imaging [12].

Current pharmacological treatment of schizophrenia is based on the use of both first- and second-generation antipsychotics (APs). These block post-synaptic dopamine D2 receptors and can be effective in the control of positive psychotic symptoms, but have little effect on the negative and cognitive symptoms [13]. Clozapine is a second-generation AP with low D2 potency but with an established benefit in patients with treatment-resistant schizophrenia due to its superior efficacy among all antipsychotic agents and with apparent utility, based on existing evidence, in managing the negative symptoms of schizophrenia [14-16]. Given the importance of glutamate in the pathophysiology of this disease, new pharmacological strategies are currently being developed to reduce the hyperglutamatergic state in order to improve treatment of negative and cognitive symptoms. One such example is 8-trifluoromethyl-3-cyclopropylmethyl-7-[(4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl)methyl]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine (JNJ-46356479): a new selective and orally bioavailable positive allosteric modulator (PAM) of the metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2) that inhibits the presynaptic release of glutamate [17,18]. We have recently found that treatment of adult mice with JNJ-46356479 partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviour in a postnatal ketamine mouse model [19]. Particularly, JNJ-46356479 treatment partially ameliorates the reduction in PV⁺ neurons in the medial prefrontal cortex and dentate gyrus that is induced by postnatal ketamine exposure. JNJ-46356479 could play a neuroprotective role through different mechanisms of action, including an antiapoptotic effect that may be more potent than that of other APs we have previously observed in neuroblastoma cell culture [20]. Human neuroblastoma cell line displays neuronal properties and is a popular *in-vitro* model used in neuropsychiatric research including schizophrenia [21,22] that has been widely used to test pharmacological effects of drugs including antipsychotics [23-25].

In this study, we aimed to evaluate, for the first time, the putative neuroprotective and antiapoptotic activity of JNJ-46356479 (JNJ) in a human neuroblastoma cell line and compare it with the effect of clozapine (CLZ), as a clinical AP with an apparent efficacy in treating negative symptoms. Specifically, we measured changes in cell viability, caspase-3 activity and cell death produced by CLZ and JNJ alone and in combination with a high dopamine (DA) or glutamate (GLU) concentration, as apoptosis inducers.

2. Results

2.1. Effects of CLZ and JNJ alone and in combination with DA or GLU on viability of SK-N-SH cells 96
97

The effects of CLZ and JNJ at concentrations of 1, 10 and 25 μM on the cell viability of human neuroblastoma cell-line SK-N-SH after 24 and 48 hours are compared in Figure 1A. Except for the lowest concentration, the CLZ treatment resulted in a significant decrease in cell viability, showing a dose-dependent relationship after 24 h (by 12%: $p = 3 \times 10^{-5}$; and 26%: $p = 3 \times 10^{-9}$, at 10 and 25 μM , respectively) and after 48 h (by 5%: $p = 0.008$; 15%: $p = 2 \times 10^{-8}$; and 37%: 1×10^{-13} , at 1, 10 and 25 μM , respectively). However, the JNJ treatment did not affect cell viability and only a modest increase (6%: $p = 6 \times 10^{-4}$) and decrease (4%: $p = 0.025$) was observed after 48 h of JNJ treatment at 10 and 25 μM , respectively. 98
99
100
101
102
103
104
105

After 24 h and 48 h, the viability of cells exposed to DA (100 μM) was reduced by 20% and 30%, respectively. CLZ at concentrations of 10 and 25 μM enhanced this DA toxicity as indicated by a dose-dependent decrease of cell viability after 24 h (20%: $p = 3 \times 10^{-6}$ and 39%: $p = 6 \times 10^{-10}$, respectively) and 48 h (17%: $p = 8 \times 10^{-4}$ and 45%: $p = 9 \times 10^{-9}$, respectively), compared with cells treated with DA alone. To a lesser extent, cotreatment with the highest concentration of JNJ (25 μM) also enhanced DA toxicity, producing a decrease in cell viability of 17% at both exposure times (24 h: $p = 2 \times 10^{-5}$ and 48 h: $p = 0.001$). A decrease of 9% was also detected 24 h after JNJ cotreatment at 10 μM ($p = 0.014$) (Figure 1B). Therefore, with the same drug doses, cell cultures exposed to DA showed significantly higher cell viability when treated in combination with JNJ than when treated in combination with CLZ after 24 h (10 μM : 90% vs 80%: $p = 0.002$; 25 μM : 80% vs 60%: $p = 6 \times 10^{-6}$) and 48 h (10 μM : 94% vs 82%: $p = 0.023$; 25 μM : 83% vs 55%: $p = 4 \times 10^{-6}$). 106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117

Similarly to the effects of DA exposure, the viability of cells exposed to GLU (80 mM) was reduced by 20% and 30% after 24 h and 48 h, respectively. Again, cotreatment with CLZ enhanced GLU toxicity as shown by a dose-dependent decrease of cell viability after 24 h (9%: $p = 0.008$; 17%: $p = 7 \times 10^{-6}$; and 31%: $p = 2 \times 10^{-9}$, at 1, 10 and 25 μM , respectively) and 48 h (17%: $p = 1 \times 10^{-4}$ and 38%: $p = 6 \times 10^{-10}$, at 1, 10 and 25 μM , respectively), compared with cells exposed to GLU alone. Although slight differences were detected, the viability of cells cotreated with increasing doses of JNJ was similar to that of cells exposed only to GLU (Figure 1C). 118
119
120
121
122
123
124
125

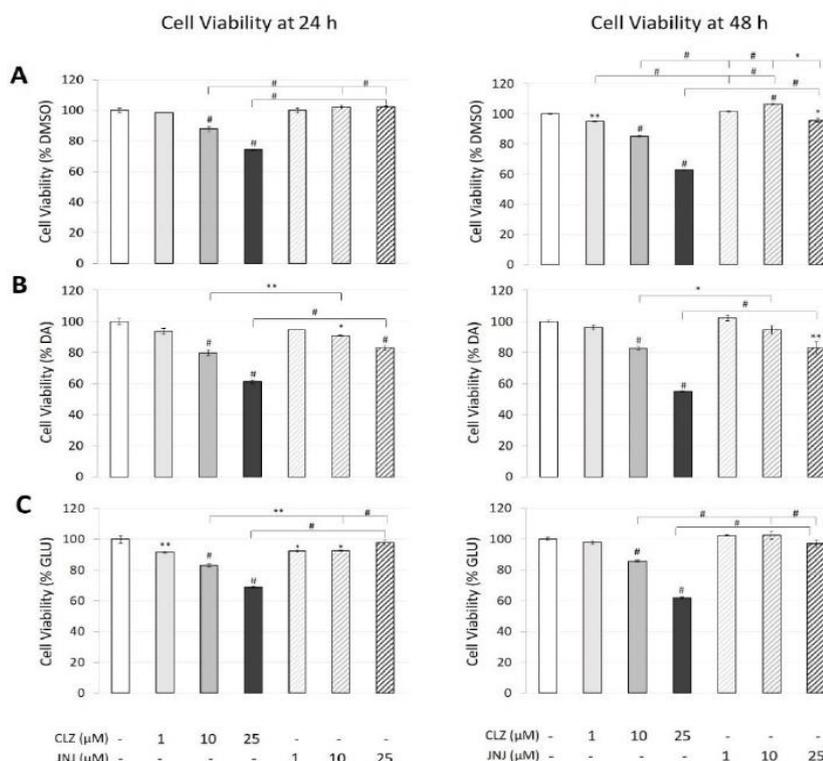


Figure 1. Effects of different concentrations (1, 10 and 25 μM) of clozapine (CLZ) and JNJ-46356479 (JNJ) alone (A), in combination with dopamine (DA) at 100 μM (B), or with glutamate (GLU) at 80 mM (C), on SK-N-SH cell viability after 12 h and 24 h as measured by alamarBlue® assays. The values represent percentages of the control (DMSO-treated), DA-treated or GLU-treated cells and are expressed as means ± S.E.M. * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, # p ≤ 0.001 vs control and those included in square brackets always indicate comparisons between CLZ and JNJ.

2.2. Effects of CLZ and JNJ alone and in combination with DA or GLU on caspase-3 activity

The effects of CLZ and JNJ at concentrations of 1, 10 and 25 μM on the caspase-3 activity, an apoptotic marker, of the SK-N-SH cell-line after 24 h are compared in Figure 2A. CLZ significantly increased caspase-3 activity in a dose-dependent way (by 49%: p = 0.02; and by 116%: p = 0.0002, at 10 and 25 μM, respectively). The JNJ treatment did not affect caspase-3 activity; and the highest concentration even appeared to produce a decrease in it, although it was not statistically significant.

In order to induce similar marked increases in apoptosis and cell death, the cells were exposed to high concentrations of both DA (200 μM) and GLU (160 mM), which produced a 5-fold increase in caspase-3 activity in both conditions. Cotreatment with CLZ seemed to enhance the apoptotic effect of DA by producing dose-dependent increases of caspase-3 activity, with a significant increase (of almost 60%) at the highest dose (p = 0.003) (Figure 2B). In contrast, cotreatment with the highest JNJ dose reduced the apoptotic effect of DA, decreasing caspase-3 activity by 40% compared to cells treated with DA alone (p = 0.03). Similarly, cotreatments with the highest doses of both CLZ and JNJ also seemed to protect the cell cultures from GLU-induced apoptosis, as reductions in caspase-3 activity were observed compared to cells exposed only to GLU (by 27% : p = 0.045; and 41 %: p = 0.007, respectively) (Figure 2C).

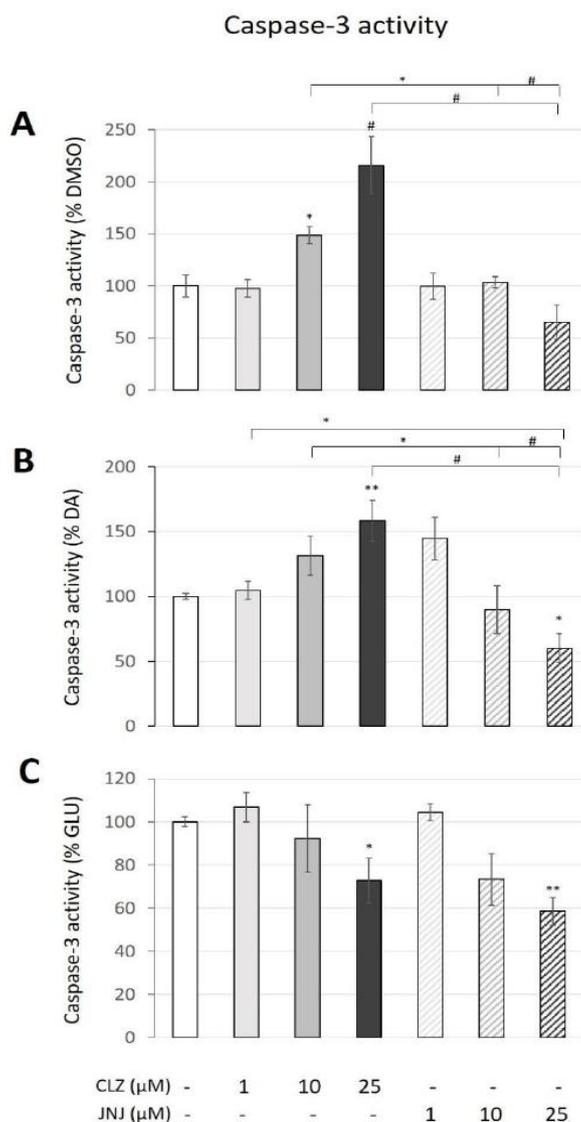


Figure 2. Effects of different concentrations (1, 10 and 25 μM) of clozapine (CLZ) and JNJ-46356479 (JNJ) alone (A), in combination with dopamine (DA) at 200 μM (B), or with glutamate (GLU) at 160 mM (C), on SK-N-SH caspase-3 activity after 24 h as measured by fluorimetric assays. The values represent percentages of the control (DMSO-treated), DA-treated or GLU-treated cells and are expressed as means ± S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, # $p \leq 0.001$ vs control and those included in square brackets always indicate comparisons between CLZ and JNJ.

2.3. Effects of CLZ and JNJ alone and in combination with DA or GLU on cell death

We used a flow cytometric assay to measure the externalization of PS using annexin-V/PI. A typical cytogram is shown in Figure 3, where live cells were negative for both annexin-V and PI (PS⁻/PI⁻) (lower left quadrant) and dead cells, mainly apoptotic cells, were positive for annexin-V (PS⁺, lower and upper right regions). Cells positive for annexin-V and negative for PI (PS⁺/PI⁻) were undergoing the early stages of apoptosis, in

which the plasma membrane is still intact, and exclude PI (lower right quadrant). In the late stages of apoptosis and necrosis, dying cells can no longer exclude PI, and the upper right region displays both annexin-V-positive and PI-positive (PS+/PI+) cells. Annexin-V-negative and PI-positive (PS-/PI+) cells, in the upper left region, are necrotic cells.

164
165
166
167

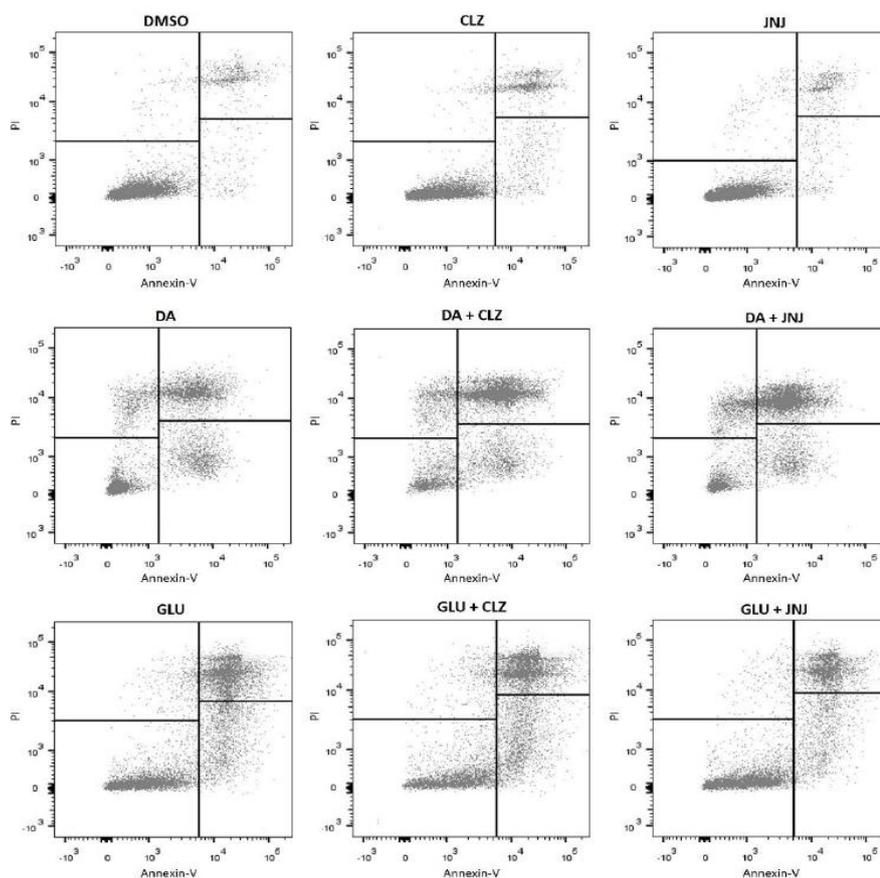


Figure 3. Flow cytogram showing cell death as assessed by cytometric analysis using annexin-V/PI. Dot plots represent typical results after SK-N-SH incubation with clozapine (CLZ) and JNJ-46356479 (JNJ) at the highest concentrations (25 μ M) alone or in combination with dopamine (DA) at 200 μ M or glutamate (GLU) at 160 mM. The intensity of the red fluorescence from PI-stained cells is indicated on the y-axis, while the intensity of the green fluorescence from cell-bound annexin-V-FITC is indicated on the x-axis. Live cells were negative for both annexin-V and PI (PS-/PI-) (lower left quadrant) and dead cells, mainly apoptotic cells, were positive for annexin-V (PS+, lower and upper right regions).

168
169
170
171
172
173
174
175
176

The effect of CLZ and JNJ at concentrations of 1, 10 and 25 μ M on the cell death of SK-N-SH cell-line after 24 hours of treatment are compared in Figure 4A. Similar percentages of viable and dead cells were observed for the treatments with CLZ or JNJ at the different concentrations. However, it should be noted that there was a trend for JNJ at 10 and 25 μ M to produce less cell death than the corresponding CLZ treatments.

177
178
179
180
181

Again, cell cultures were also exposed to high concentrations of DA (200 μ M) and GLU (160 mM) to induce similar marked increases in apoptosis and cell death. Specifically, both inductions produced a 3-fold increase in the number of cells with externalized

182
183
184

PS and showed a 50% reduction in live cell number. Similar effects on viable and dead cells were observed when the cultures exposed to DA were cotreated with CLZ or JNJ. Both the drugs enhanced the toxicity of DA in a dose-dependent way. Compared to cells exposed to DA alone, co-treatments with CLZ or JNJ showed reduced cell viability when medium and high doses were used: a reduction of at least 40% and 60%, respectively (CLZ at 10 μ M and 25 μ M: $p = 0.0002$ and $p = 1.3 \times 10^{-7}$; JNJ at 10 μ M and 25 μ M: $p = 3 \times 10^{-6}$ and $p = 2.4 \times 10^{-7}$, respectively). Accordingly, cotreatments with high doses (25 μ M) of CLZ or JNJ resulted in increased cell death (CLZ: $p = 0.001$ and JNJ: $p = 0.005$) compared to cells only exposed to DA (Figure 4B).

However, opposite effects were observed on viability and cell death when the cultures exposed to GLU were cotreated with CLZ or JNJ (Figure 4C). While the CLZ treatment enhanced the toxicity of GLU, decreasing viable cells and increasing cell death up to 20% (25 μ M: $p = 0.003$ and $p = 0.006$, respectively), JNJ seemed to protect against it by increasing the number of viable cells (by 21%: $p = 0.005$; and 25%: $p = 0.001$, at 10 and 25 μ M, respectively) and decreasing cell death by 15% (25 μ M: $p = 0.027$).

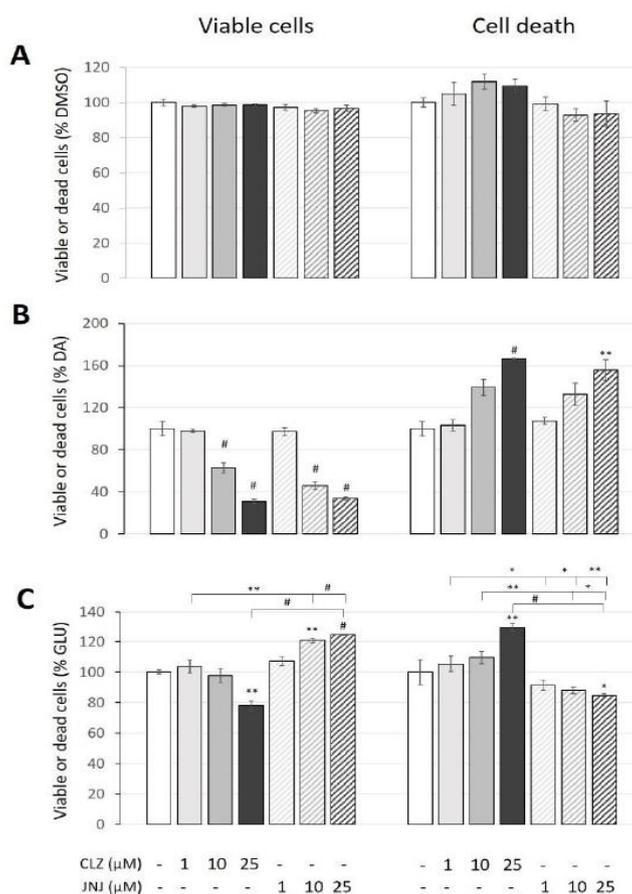


Figure 4. Effects of different concentrations (1, 10 and 25 μ M) of clozapine (CLZ) and JNJ-46356479 (JNJ) alone (A), in combination with dopamine (DA) at 200 μ M (B), or with glutamate (GLU) at 160 mM (C), on SK-N-SH cell death (PS+) and cell viability (PS-/PI-) after 24 h as assessed by flow cytometric analysis using annexin-V/PI. The values represent percentages of the control (DMSO)

treated), DA-treated or GLU-treated cells and are expressed as means \pm S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, # $p \leq 0.001$ vs control and those included in square brackets always indicate comparisons between CLZ and JNJ.

3. Discussion

The results of this study provide evidence of the drug safety of JNJ-46356479 in neuroblastoma cell cultures exposed to increasing doses of this molecule, and also of its potential neuroprotective effect against the apoptosis and cell death induced by exposure to DA and GLU. Moreover, JNJ-46356479 treatment showed enhanced safety and neuroprotective effects, compared with CLZ treatment.

In the last decade, intensive research has focused on the development of the mGluR2 PAM to treat neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia and particularly its negative and cognitive symptoms. Although schizophrenia clinical trials returned negative results with previous molecules, such as JNJ-40411813 or AZD8529, further preclinical and clinical studies may contribute to define the potential of these and other improved mGluR2 PAMs to become novel therapeutic agents as well as their optimal therapeutic uses [26]. In this study, we evaluated *in-vitro* the neuroprotective activity of JNJ-46356479, a new mGluR2 PAM with a more balanced profile and improved drug-like attributes than previously reported leads [17]. This current lead has shown, in a recent *in-vivo* study performed by our group, that it partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviour in a postnatal ketamine mouse model [19].

In the present study, JNJ at different concentrations and treatment times did not affect cell viability; only slight changes were observed when cells were treated with the highest dose for 48 h. Moreover, this pharmacological treatment did not induce apoptosis in the cell cultures, as caspase-3 activity and PS externalization were not affected. These results indicate that JNJ is not neurotoxic and could prove to have good tolerability in clinical practice, as previously observed with JNJ-40411813 [27]. Indeed, the drug safety of JNJ seemed to be superior to that of CLZ, which produced dose-dependent decreases in cell viability and increases in caspase-3 activity. Cytotoxic effects of CLZ *in-vitro* have also been reported. There is other evidence of CLZ treatment resulting in similar decreases in the viability of different types of cell cultures, including human neuroblastoma [28,29]. Meanwhile, Lundberg et al. [30] detected cytotoxic activity when primary mouse neural stem cells were exposed to ≥ 500 nM of CLZ; and a study by Park et al. [31] also showed neurotoxic activity when rat primary neurons were exposed to ≥ 10 μ M of CLZ *in-vitro*, which was associated with increased apoptosis and autophagy.

However, there is much evidence of the neuroprotective effects of second-generation APs [20, 32]. In fact, Lundberg and co-workers also reported that CLZ may have a protective/anti-apoptotic effect on neural stem cells when used at lower concentrations (10 nM), supporting their previous *in-vivo* observations which indicate that CLZ promotes neurogenesis [30]. This is in accordance with results obtained by Takaki et al. [34], which revealed an increased number of spines in cultured cortical rat neurons when they were treated with CLZ at 1 μ M, but a decreased un their number when they were treated with an inappropriate concentration of CLZ (10 μ M). This indicates that the selection of appropriate doses of APs may be important for the protection of dendritic spines in patients with schizophrenia [34]. Similarly, CLZ at 1 μ M also increased spine density in rat hippocampal neurons [35]. Our results are in line with this finding, as low CLZ concentrations did not affect neuroblastoma viability, apoptosis or cell death, but high CLZ doses were toxic and induced cell death. In contrast, high JNJ concentrations seemed to be more neuroprotective than lower concentrations of this drug.

It is important to note that most evidence of the neuroprotective effects of APs has been observed when cell cultures are exposed to different types of cell damage or stress [20,29,36]. In this study, we induced apoptosis and cell death with high doses of DA and GLU as reported in other studies with neuroblastoma cell lines [20, 37-39]. GLU and DA are essential neurotransmitters but in excess in the extracellular environment they may

induce neuronal damage and degeneration, which is involved in the pathophysiology of schizophrenia. Different mechanisms are involved in such neurotoxicity, including oxidative stress, mitochondrial damage and cellular apoptosis [37,39], which could be blocked in different ways by CLZ and JNJ treatments. JNJ showed a potential neuroprotective effect, as it reduced the activation of caspase-3 induced by DA. However, we observed an increase of cell death that was enhanced by cotreatment with JNJ when it was combined with DA, probably due to necrotic processes [20]. Again, compared with JNJ, CLZ showed more potent cytotoxic effects, as it induced a greater enhancement of DA toxicity producing higher decreases in cell viability and greater increases in caspase-3 activity. These differences could be due to the capacity of JNJ to prevent the caspase-3 activation induced by DA that we observed in our cultures. Along the same lines, when apoptosis was induced by GLU exposure, the JNJ treatment again showed a relative neuroprotective effect decreasing the activation of caspase-3 in parallel with an increase in cell viability and a reduction of cell death, as determined by cytometric analysis. Once more, JNJ was less neurotoxic than CLZ, which enhanced both the decrease in cell viability and the increase in cell death induced by GLU; despite the fact that the highest dose of CLZ also showed an apparent neuroprotective effect against the activation of caspase-3 induced by GLU.

In the present study, we selected a common range of CLZ concentrations based on our previous experience and previous studies that assessed CLZ in cell cultures [25,28,31,40]. To facilitate comparability, the same JNJ concentrations were also tested. It should be noted that although there is no clinical data for JNJ-46356479, the doses of JNJ-40411813 used in the exploratory phase 2a clinical trial were up to 150 mg/day [26], so they correspond to low clinical doses of CLZ. Even so, JNJ seems to be less neurotoxic and more neuroprotective than the same, or even lower, doses of CLZ.

One of the pathophysiological theories of schizophrenia and its negative and cognitive symptomatology is the existence of increased synaptic pruning during crucial stages of brain development, such as adolescence, which could be due to increased neuronal apoptosis resulting from excessive glutamatergic neurotransmission [8,33]. First-episode schizophrenia patients seem to have increased basal apoptotic mechanisms and to be more vulnerable to a pro-apoptotic environment [10]. It has therefore been suggested that future drugs should focus on aberrant neurodevelopment and disease progression [41]. One such approach would be to reduce the GLU storm and the excess of dendritic apoptosis [8]. The pharmacological effects of mGluR2 PAMs, such as JNJ-46356479, in reducing the presynaptic release of GLU and possibly preventing caspase-3 activation in both hyperdopaminergic and hyperglutamatergic states, as observed in this study, could be considered one of the main future pharmacological strategies. The use of this kind of GLU modulators in critical periods such as prodromes or the transition to psychosis, when there could be a neurotoxic storm of GLU [42], could be key in preventing the onset of negative and cognitive symptoms or in improving their control [8,41].

Neuroblastoma cell line displays neuronal properties and is a popular *in-vitro* model used in neuropsychiatric research including schizophrenia [21, 22]. It has the advantage of low cost, ease of culture, reproducibility and available literature, as it has been widely used to test pharmacological effects of drugs including antipsychotics [23-25]. However, it should be noted that working with this cell model has its limitations. It is difficult to obtain therapeutically meaningful results, as the effects induced by the different treatments evaluated *in-vitro* could vary at the brain level of patients with schizophrenia. Moreover, as previously discussed, changes in doses of drugs may induce different effects on cell cultures. Translational research using cell, animal and human models is needed in order to deepen our knowledge of the mechanisms of action of APs. This *in-vitro* study provides new evidence concerning the neurotoxic/neuroprotective mechanisms of CLZ and especially of the mGluR2 PAM JNJ-46356479.

4. Material and methods

4.1. Reagents

Minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, sodium pyruvate, penicillin, streptomycin, phosphate buffered saline (PBS) and trypsin were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). DA and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). CLZ was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Janssen-Cilag S.A. provided the compound JNJ-46356479 through a material transfer agreement.

4.2. Cell culture

The SK-N-SH human neuroblastoma cells were purchased from the American Type Cell Culture (ATCC, Manassas, VA, USA) and were cultured in MEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 500 μ M sodium pyruvate, 50 units/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. The cells were grown in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. The culture medium was changed every 2-3 days.

Based on our previous experience when assessing different APs in SK-N-SH cells [20] and previous studies testing CLZ in human neuroblastoma cell cultures [25,28,40] or primary murine neurons [31], a common range of CLZ concentrations including 1, 10 and 25 μ M were tested in our experiments. In order to facilitate comparability, the same JNJ concentrations were also tested.

Based on previous tests and other studies performed on neuroblastoma cell lines, apoptosis and cell death was induced with high doses of DA and GLU [20, 37-39]. Specifically, DA at 100 μ M and GLU at 80 mM were used to induce similar reductions in cell viability. Double these concentrations of DA (200 μ M) and GLU (160 mM) were used to similarly induce marked increases in apoptosis and cell death.

4.3. Cell viability

The SK-N-SH cells were seeded on 24-well plates at a density of 150,000 cells/well and treated with CLZ or JNJ at concentrations of 1, 10 and 25 μ M, either alone or in combination with DA 100 μ M or GLU 80 mM. Controls were treated with vehicle (0.25% DMSO, v/v) either alone or in combination with DA or GLU. Each condition was assessed at least in triplicate. Cell viability was determined by use of alamarBlue® (Sigma, St. Louis, MO, USA). Resazurin, a non-fluorescent indicator dye, is converted to bright red-fluorescent resorufin via the reduction reactions of metabolically active cells. The amount of fluorescence produced is proportional to the number of living cells. After 24 h and 48 h of incubation, 50 μ l of alamarBlue® was added to each well and incubated for 2 h. Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 540 nm and an emission wavelength of 590 nm using a Tecan Spark® 20M microplate fluorescence reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Each measurement was performed at least in duplicate. Cell viability is expressed as a percentage of the control (vehicle-treated), DA-treated or GLU-treated cells.

4.4. Caspase-3 activity, as apoptotic marker

Cells were cultured at a density of 120,000 cells/well on 12-well plates until 70%-80% confluence. Then, the normal culture medium was replaced by culture medium containing CLZ and JNJ at concentrations of 1, 10 and 25 μ M, either alone or in combination with DA at 200 μ M or GLU at 160 mM. The culture medium for the controls contained the vehicle (0.25% DMSO, v/v) either alone or in combination with DA or GLU. Each condition was assessed at least in triplicate. After 24h of drug exposure, caspase-3 activity was measured by the cleavage of Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp (Ac-DEVD) peptide-conjugated 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) using the Caspase-3 Fluorimetric Assay Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cell pellets were incubated with 20 μ l of ice-cold cell lysis buffer on ice for 20 min. The lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 14,000 x g. A total of 6 μ l of the supernatant was transferred to a 96-well plate, then 200 μ l of reaction buffer containing the caspase-3 substrate (DEVD-AMC) was added to each well. To verify that the signal

detected by the reaction was due to protease activity, an induced sample was incubated at 37°C with the caspase-3 inhibitor Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al (Ac-DEVD-CHO) before adding the substrate. The AMC fluorescence counts in the wells were measured with a 360 nm excitation filter and a 465 nm emission filter, at least in duplicate, using the Tecan Spark® 20M microplate fluorescence reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The fluorescence of the blanks was subtracted from each value and the resultant fluorescence values were converted to caspase-3 activity using a standard curve for AMC. Caspase-3 activity was normalized to the total protein content of the cell extracts, as measured by the DC Protein Assay Kit (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Results are expressed as percentage of control (vehicle-treated), DA-treated or GLU-treated cells.

4.5. Flow cytometry measurement of cell death using annexin-V/PI

We used the Annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) cell membrane labelling assay to detect the translocation of phosphatidylserine (PS) from the inner face of the cell membrane to the outer surface, as a marker of apoptosis and cell death. Propidium iodide (PI) was used to label the DNA in the cells where the cell membrane had been compromised. The assay was performed using the Annexin-V-Fluos Staining Kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany).

Cells were cultured at a density of 120,000 cells/well on 12-well plates until 70%-80% confluence. Then, the normal culture medium was replaced by culture medium containing CLZ and JNJ at concentrations of 1, 10 and 25 µM, either alone or in combination with DA at 200 µM or GLU at 160 mM. The culture medium for controls contained vehicle (0.25% DMSO, v/v) either alone or in combination with DA or GLU. Each condition was assessed at least in triplicate. After 24 h of drug exposure, the SK-N-SH cells were harvested by trypsinization and any floating cells were then added back to the trypsinized cells, and pelleted by centrifugation at 300 × g for 5 min. A total of 200,000 cells were resuspended twice in cold PBS and spun at 300 × g for 5 min. The pellet was resuspended in 100 µl of Annexin-V-Fluos labeling solution and incubated with 0.6 µl FITC-conjugated annexin-V and 1.2 µl of PI for 15 min at room temperature in the dark. The samples were kept on ice and analysed on a BD FACSCANTO flow cytometer equipped with two lasers (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Emission fluorescence was measured with a 525/50 filter for FITC and with a 610/20 filter for red PI. FITC and PI were excited with two different lasers of 488 nm for the first and 561 nm for the second, thus avoiding signal compensation. Data were analysed using the FlowJo software, version 10.1r5 (Ashland, OR, USA). A minimum of 10,000 events were collected for each sample. For each experimental situation, the quadrants were adjusted depending on the respective controls.

4.6. Statistical analysis

Data were analysed using IBM SPSS statistics 20 (IBM Corp., Chicago, IL, USA). Data were normally distributed (Shapiro–Wilks test). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and mean values for each experimental group were compared using Bonferroni's post-hoc tests. Two-tailed p-values <0.05 were considered significant.

5. Conclusions

For the first time, the results of the present study demonstrate that JNJ-46356479, a recently developed mGluR2 PAM, is not neurotoxic and attenuates the apoptosis, particularly the caspase-3 activation, induced by DA and GLU in neuroblastoma cell cultures. Its effects seem to be less neurotoxic and more neuroprotective than those observed with clozapine treatments. More studies are needed to determine the mechanisms of action of this glutamate modulator and its potential to become a novel therapeutic agent for schizophrenia.

Author Contributions: P.G. and A.M.P. participated designing and carrying out the experimental procedures, performing the statistical analyses and the interpretation of results, and writing the first

draft of the manuscript. N.R., A.G.S. and S.M. participated carrying out the experimental procedures and helped in the drafting of the manuscript. S.M. and M.G. helped in the statistical analyses. C.G.R. and C.M. helped in the interpretation of results. P.G. and E.P. participated in the coordination, conceiving and design of the study and acquired funding for the research. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This study was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, Carlos III Health Institute, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) – The European Regional Development Fund (FEDER – una manera de hacer Europa) (PI18/01005); the Catalan Pons Balmaes Grant (FCRB_PB_2018); and the Government of Catalonia, Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement (2017SGR1355; 2017SGR1562).

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this manuscript are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgments: The authors thank the Cytomics Unit of IDIBAPS for flow cytometric analysis assessment, the Language Advisory Service at the University of Barcelona for manuscript revision, as well as José María Cid from Janssen R&D Toledo, Spain; Marc Ceusters and Hilde Lavreysen from Janssen R&D Beerse, Belgium and their collaborators from Addex Therapeutics, for the pharmacological information and cession of the compound JNJ-46356479 through a Material Transfer Agreement.

Conflicts of Interest: The authors declared no potential conflicts of interest.

References

- Marder, S.R.; Cannon, T.D. Schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1753–1761. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1808803>.
- Coyle, J.T. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2006**, *26*, 365–84. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9062-8>.
- Moghaddam, B.; Javitt, D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37*, 4–15. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.181>.
- Uno, Y.; Coyle, J.T. Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **2019**, *73*, 204–215. <https://doi.org/10.1111/pcn.12823>.
- Lewis, D.A.; Moghaddam, B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 1372–1376. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1372>.
- Snyder, M.A.; Gao, W.J. NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia. *Front. Cell Neurosci.* **2013**, *7*, 31. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00031>.
- Glausier, J.R.; Lewis, D.A. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* **2013**, *251*, 90–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.044>.
- Parellada, E.; Gassó, P. Glutamate and microglia activation as a driver of dendritic apoptosis: a core pathophysiological mechanism to understand schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **2021**, *11*, 271. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01385-9>.
- Yuede, C.M.; Wozniak, D.F.; Creeley, C.E.; Taylor, G.T.; Olney, J.W.; Farber, N.B. Behavioral consequences of NMDA antagonist-induced neuroapoptosis in the infant mouse brain. *PLoS One* **2010**, *5*, e11374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011374>.
- Gassó, P.; Mas, S.; Molina, O.; Lafuente, A.; Bernardo, M.; Parellada, E. Increased susceptibility to apoptosis in cultured fibroblasts from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients. *J. Psychiatr. Res.* **2014**, *48*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.09.017>.
- Gassó, P.; Mas, S.; Rodríguez, N.; Boloc, D.; García-Cerro, S.; Bernardo, M.; Lafuente, A.; Parellada, E. Microarray gene-expression study in fibroblast and lymphoblastoid cell lines from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients. *J. Psychiatr. Res.* **2017**, *95*, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.08.003>.
- Batalla, A.; Bargalló, N.; Gassó, P.; Molina, O.; Pareto, D.; Mas, S.; Roca, J.M.; Bernardo, M.; Lafuente, A.; Parellada, E. Apoptotic markers in cultured fibroblasts correlate with brain metabolites and regional brain volume in antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia and healthy controls. *Transl. Psychiatry* **2015**, *5*, e626. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.122>.
- Goff, D.C. The Pharmacologic Treatment of Schizophrenia-2021. *JAMA* **2021**, *325*, 175–176. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.19048>.
- Khan, A.H.; Zaidi, S. Clozapine: Improvement of Negative Symptoms of Schizophrenia. *Cureus* **2017**, *9*, e1973. <https://doi.org/10.7759/cureus.1973>.
- Leucht, S.; Cipriani, A.; Spineli, L.; Mavridis, D.; Orey, D.; Richter, F.; Samara, M.; Barbui, C.; Engel, R.R.; Geddes, J.R.; Kissling, W.; Stapf, M.P.; Lässig, B.; Salanti, G.; Davis, J.M. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet* **2013**, *382*, 951–962. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60733-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60733-3).

16. Nucifora, F.C. Jr; Mihaljevic, M.; Lee, B.J.; Sawa, A. Clozapine as a Model for Antipsychotic Development. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 750–761. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0552-9>. 466
17. Cid, J.M.; Tresadern, G.; Vega, J.A.; de Lucas, A.I.; Del Cerro, A.; Matesanz, E.; Linares, M.L.; García, A.; Iturrino, L.; Pérez-Benito, L.; Macdonald, G.J.; Oehlich, D.; Lavreysen, H.; Peeters, L.; Ceusters, M.; Alnaou, A.; Drinkenburg, W.; Mackie, C.; Somers, M.; Trabanco, A.A. Discovery of 8-Trifluoromethyl-3-cyclopropylmethyl-7-[(4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl)methyl]-1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine (JNJ-46356479), a Selective and Orally Bioavailable mGlu2 Receptor Positive Allosteric Modulator (PAM). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8495–507. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00913>. 467
18. Li, M.L.; Hu, X.Q.; Li, F.; Gao, W.J. Perspectives on the mGluR2/3 agonists as a therapeutic target for schizophrenia: Still promising or a dead end? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2015**, *60*, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.02.012>. 468
19. Martínez-Pinteño, A.; García-Cerro, S.; Mas, S.; Torres, T.; Boloc, D.; Rodríguez, N.; Lafuente, A.; Gassó, P.; Arnaiz, J.A.; Parelada, E. The positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor JNJ-46356479 partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviors in a postnatal ketamine mice model. *J. Psychiatr. Res.* **2020**, *126*, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2020.04.005>. 469
20. Gassó, P.; Mas, S.; Molina, O.; Bernardo, M.; Lafuente, A.; Parelada, E. Neurotoxic/neuroprotective activity of haloperidol, risperidone and paliperidone in neuroblastoma cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2012**, *36*, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.08.010>. 470
21. Abashkin, D.A.; Kurishev, A.O.; Karpov, D.S.; Golimbet, V.E. Cellular Models in Schizophrenia Research. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8518. <https://doi.org/10.3390/ijms22168518>. 471
22. Bray, N.J.; Kapur, S.; Price, J. Investigating schizophrenia in a "dish": possibilities, potential and limitations. *World Psychiatry* **2012**, *11*, 153–155. <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2012.tb00116.x>. 472
23. Abe, C.; Nishimura, S.; Mori, A.; Niimi, Y.; Yang, Y.; Hane, M.; Kitajima, K.; Sato, C. Chlorpromazine Increases the Expression of Polysialic Acid (PolySia) in Human Neuroblastoma Cells and Mouse Prefrontal Cortex. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1123. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms18061123>. 473
24. Du, J.; Nakachi, Y.; Kiyono, T.; Fujii, S.; Kasai, K.; Bundo, M.; Iwamoto, K. Comprehensive DNA Methylation Analysis of Human Neuroblastoma Cells Treated With Haloperidol and Risperidone. *Front. Mol. Neurosci.* **2021**, *14*, 792874. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.792874>. 474
25. Jeon, S.; Kim, Y.; Chung, I.W.; Kim, Y.S. Clozapine induces chloride channel-4 expression through PKA activation and modulates CDK5 expression in SH-SY5Y and U87 cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2015**, *56*, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.09.002>. 475
26. Trabanco, A.A.; Bartolomé, J.M.; Cid, J.M. mGluR2 positive allosteric modulators: an updated patent review (2013–2018). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2019**, *29*, 497–507. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1637421>. 476
27. Kent, J.M.; Daly, E.; Kezic, I.; Lane, R.; Lim, P.; De Smedt, H.; De Boer, P.; Van Nueten, L.; Drevets, W.C.; Ceusters, M. Efficacy and safety of an adjunctive mGlu2 receptor positive allosteric modulator to a SSRI/SNRI in anxious depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *67*, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.01.009>. 477
28. Kang, U.G.; Seo, M.S.; Roh, M.S.; Kim, Y.; Yoon, S.C.; Kim, Y.S. The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signaling pathway. *FEBS Lett.* **2004**, *560*, 115–119. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00082-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00082-1). 478
29. Qing, H.; Xu, H.; Wei, Z.; Gibson, K.; Li, X.M. The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP+-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *17*, 1563–1570. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02590.x>. 479
30. Lundberg, M.; Curbo, S.; Bohman, H.; Agartz, I.; Ögren, S.O.; Patrone, C. Clozapine protects adult neural stem cells from ketamine-induced cell death in correlation with decreased apoptosis and autophagy. *Biosci. Rep.* **2020**, *40*, BSR20193156. <https://doi.org/10.1042/BSR20193156>. 480
31. Park, J.; Chung, S.; An, H.; Kim, J.; Seo, J.; Kim, D.H.; Yoon, S.Y. Haloperidol and clozapine block formation of autophagosomes in rat primary neurons. *Neuroscience* **2012**, *209*, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.02.035>. 481
32. Chen, A.T.; Nasrallah, H.A. Neuroprotective effects of the second generation antipsychotics. *Schizophr. Res.* **2019**, *208*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.04.009>. 482
33. Germann, M.; Brederoo, S.G.; Sommer, I.E.C. Abnormal synaptic pruning during adolescence underlying the development of psychotic disorders. *Curr. Opin. Psychiatry* **2021**, *34*, 222–227. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000696>. 483
34. Takaki, M.; Kodama, M.; Mizuki, Y.; Kawai, H.; Yoshimura, B.; Kishimoto, M.; Sakamoto, S.; Okahisa, Y.; Yamada, N. Effects of the antipsychotics haloperidol, clozapine, and aripiprazole on the dendritic spine. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2018**, *28*, 610–619. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.03.004>. 484
35. Critchlow, H.M.; Maycox, P.R.; Skepper, J.N.; Krylova, O. Clozapine and haloperidol differentially regulate dendritic spine formation and synaptogenesis in rat hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **2006**, *32*, 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.05.007>. 485
36. Bai, O.; Wei, Z.; Lu, W.; Bowen, R.; Keegan, D.; Li, X.M. Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *J. Neurosci. Res.* **2002**, *69*, 278–83. <https://doi.org/10.1002/jnr.10290>. 486
37. Ballesteros, M.A.; Marín, M.J.; Martín, M.S.; Rubio-Lopez, M.I.; López-Hoyos, M.; Miñambres, E. Effect of neuroprotective therapies (hypothermia and cyclosporine a) on dopamine-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Brain Inj.* **2013**, *27*, 354–60. <https://doi.org/10.3109/02699052.2012.743184>. 487

38. Nikolova, S.; Lee, Y.S.; Lee, Y.S.; Kim, J.A. Rac1-NADPH oxidase-regulated generation of reactive oxygen species mediates glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 1295-1304. <https://doi.org/10.1080/10715760500176866>. 524
525
526
39. Yuksel, T.N.; Yayla, M.; Halici, Z.; Cadirci, E.; Polat, B.; Kose, D. Protective effect of 5-HT7 receptor activation against glutamate-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells via antioxidative and antiapoptotic pathways. *Neurotoxicol. Teratol.* **2019**, *72*, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.01.002>. 527
528
529
40. Sharp, S.I.; Hu, Y.; Weymer, J.F.; Rizig, M.; McQuillin, A.; Hunt, S.P.; Gurling, H.M.D. The effect of clozapine on mRNA expression for genes encoding G protein-coupled receptors and the protein components of clathrin-mediated endocytosis. *Psychiatr. Genet.* **2013**, *23*, 153-162. <https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e32835fe51d>. 530
531
532
41. Millan, M.J.; Andrieux, A.; Bartzokis, G.; Cadenhead, K.; Dazzan, P.; Fusar-Poli, P.; Gallinat, J.; Giedd, J.; Grayson, D.R.; Heinrichs, M.; Kahn, R.; Krebs, M.O.; Leboyer, M.; Lewis, D.; Marin, O.; Marin, P.; Meyer-Lindenberg, A.; McGorry, P.; McGuire, P.; Owen, M.J.; Patterson, P.; Sawa, A.; Spedding, M.; Uhlhaas, P.; Vaccarino, F.; Wahlestedt, C.; Weinberger, D. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 485-515. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.28>. 533
534
535
536
42. Schobel, S.A.; Chaudhury, N.H.; Khan, U.A.; Paniagua, B.; Styner, M.A.; Asllani, I.; Inbar, B.P.; Corcoran, C.M.; Lieberman, J.A.; Moore, H.; Small, S.A. Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver. *Neuron* **2013**, *78*, 81-93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.011>. 537
538
539

4.2.2. *Estudio in vivo: modelo animal tratado en la adultez (Estudio 3)*

Martínez-Pinteño A*, García-Cerro S*, Mas S, Torres T, Boloc D, Rodríguez N, Lafuente A, Gassó P, Arnaiz JA, Parellada E. **The positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor JNJ-46356479 partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviors in a postnatal ketamine mice model.** *Journal of Psychiatric Research.* 2020; 126: 8-18.

En el presente estudio se evaluó la eficacia del tratamiento en la adultez con JNJ en revertir los efectos conductuales y neuropatológicos en un modelo animal de esquizofrenia utilizando ketamina postnatal. Para ello se analizaron 4 grupos experimentales: control, JNJ, ketamina y ketamina + JNJ.

Los resultados obtenidos en la evaluación motora mostraron que los cuatro grupos de tratamiento no difirieron ni en las habilidades analizadas con la batería de pruebas motoras ni en la coordinación motora medida con el rotarod. Sin embargo, en el test de campo abierto, la actividad de los ratones tratados con JNJ, ketamina o ambos fue significativamente menor que la del grupo control, por lo que respecta a la distancia total recorrida ($p < 0,05$), velocidad media ($p < 0,05$) y desplazamientos verticales ($p < 0,01$). Además, los ratones tratados únicamente con JNJ pasaron significativamente menos tiempo en el centro del campo abierto que los controles, con un aumento correspondiente en el tiempo transcurrido en la periferia ($p < 0,01$).

En la evaluación conductual en el laberinto en Y, los ratones expuestos a ketamina mostraron un comportamiento deteriorado, estando más tiempo en el brazo familiar, lo cual se vio revertido en los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ ($p = 0,036$). Además, en los ratones expuestos a ketamina, el porcentaje de alternancia se vio reducido significativamente en comparación con los ratones control ($p = 0,006$). Este comportamiento también fue revertido con el tratamiento con JNJ ya que estos animales mostraron puntuaciones similares a los del grupo control. En la prueba de las tres cámaras, los ratones expuestos a ketamina no demostraron una preferencia significativa por pasar más tiempo oliendo a un compañero de camada que a un ratón de juguete. En este caso, el tratamiento de los animales con JNJ no revirtió la conducta alterada. Cuando la elección fue entre

un ratón familiar y uno no familiar, los ratones expuestos a ketamina tampoco mostraron preferencia por la novedad social. Sin embargo, aquellos ratones expuestos a ketamina que fueron tratados con JNJ recuperaron el comportamiento habitual de preferencia por el ratón desconocido ($p = 0,048$). En la prueba de las cinco exposiciones, los ratones expuestos a ketamina dedicaron menos tiempo a interactuar con los ratones presentados en cada uno de los cinco ensayos. En particular, comparando este grupo con los ratones control hubo diferencias significativas en la mayoría de exposiciones (ensayo 1, $p = 0,007$; ensayo 2, $p = 0,002$; ensayo 3, $p = 0,045$; y ensayo 5, $p = 1 \times 10^{-4}$). Además, en el quinto ensayo, cuando se presentó un ratón novedoso, los ratones expuestos a ketamina fueron los únicos que no aumentaron el tiempo de interacción. Al tratar los ratones con JNJ, estos recuperaron el interés por el ratón desconocido ($p = 0,015$) y estuvieron más tiempo interactuando con él que los ratones expuestos solo a ketamina ($p = 0,024$). Finalmente, en la prueba de condicionamiento del miedo no se encontraron diferencias entre grupos.

El análisis inmunohistoquímico en la CPF medial mostró una pérdida significativa de inmunoreactividad de PV en los ratones expuestos a ketamina, en comparación con el grupo control ($p = 0,041$). Se observó que presentaron aproximadamente una reducción del 50% de los niveles de expresión de interneuronas PV+. Los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ recuperaron los niveles de PV y no mostraron diferencias significativas con el grupo control. El análisis de los valores de expresión de c-Fos en la CPF medial no mostró diferencias entre grupos. En el hipocampo, de las cuatro áreas que se analizaron, CA1, CA2, CA3 y GD, solo esta última presentó diferencias en la densidad de interneuronas PV+ entre grupos ($p = 0,05$). En concreto, los ratones expuestos a ketamina mostraron una reducción significativa de interneuronas PV+ en comparación con el grupo control ($p = 0,043$). El tratamiento con JNJ revirtió parcialmente los efectos de la ketamina al incrementar la densidad de interneuronas PV+, mostrando valores similares a los obtenidos en el grupo control. Además, los animales expuestos a ketamina mostraron mayor densidad de neuronas c-Fos en el GD en comparación con el grupo control ($p = 0,038$). Al tratar estos ratones con JNJ, las densidades de neuronas c-Fos positivas fueron similares a las obtenidas en el grupo control.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Psychiatric Research

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

The positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor JNJ-46356479 partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviors in a postnatal ketamine mice model



Albert Martínez-Pinteño^{a,1}, Susana García-Cerro^{a,1}, Sergi Mas^{a,b,c}, Teresa Torres^a, Daniel Boloc^d, Natalia Rodríguez^a, Amalia Lafuente^{a,b,c}, Patricia Gasso^{a,b}, Joan Albert Arnaiz^{a,b,e,**}, Eduard Parellada^{b,c,d,f,*}

^a Department of Basic Clinical Practice, Unit of Pharmacology, University of Barcelona, Spain

^b The August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

^d Department of Medicine, University of Barcelona, Spain

^e Clinical Pharmacology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Spain

^f Barcelona Clinic Schizophrenia Unit (BCSU), Institute of Neuroscience, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Spain

ABSTRACT

Current antipsychotics have limited efficacy in controlling cognitive and negative symptoms of schizophrenia (SZ). Glutamatergic dysregulation has been implicated in the pathophysiology of SZ, based on the capacity of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonists such as ketamine (KET) to induce SZ-like behaviors. This could be related to their putative neuropathological effect on gamma-aminobutyric (GABAergic) interneurons expressing parvalbumin (PV), which would lead to a hyperglutamatergic condition. Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2) negatively modulates glutamate release and has been considered a potential clinical target for novel antipsychotics drugs. Our aim was to evaluate the efficacy of JNJ-46356479 (JNJ), a positive allosteric modulator (PAM) of the mGluR2, in reversing neuropathological and behavioral deficits induced in a postnatal KET mice model of SZ. These animals presented impaired spontaneous alternation in the Y-maze test, suggesting deficits in spatial working memory, and a decrease in social motivation and memory, assessed in both the Three-Chamber and the Five Trial Social Memory tests. Interestingly, JNJ treatment of adult mice partially reversed these deficits. Mice treated with KET also showed a reduction in PV+ in the mPFC and dentate gyrus together with an increase in c-Fos expression in this hippocampal area. Compared to the control group, mice treated with KET + JNJ showed a similar PV density and c-Fos activity pattern. Our results suggest that pharmacological treatment with a PAM of the mGluR2 such as JNJ could help improve cognitive and negative symptoms related to SZ.

1. Introduction

Schizophrenia (SZ) is a chronic and debilitating mental disorder which manifests itself in late adolescence or early adulthood and, affects approximately 0.75% of the population worldwide (Moreno-Küstner et al., 2018). Patients often present positive symptoms, including hallucinations and delusions, cognitive deficits (e.g., impaired working memory), and negative symptoms (e.g., poverty of speech, blunted affect and reduced social motivation). At present, pharmacological treatment is based on the use of first and second generation antipsychotics (APs) (Lally and MacCabe, 2015). In most cases, AP treatment effectively reduces the positive symptoms mainly by blocking dopamine D2 receptors, consistent with the dopamine hypothesis of

schizophrenia. However, they have limited efficacy in controlling the cognitive and negative symptoms of the disease. A better knowledge of their molecular pathophysiology is required in order to identify promising novel drug targets for treatment (Insel, 2010; Owen et al., 2016).

Mounting evidence from pharmacological, post-mortem, brain imaging, and genetic studies supports the role of glutamatergic dysregulation in the pathophysiology of SZ (Uno and Coyle, 2019). This glutamatergic theory is based on the capacity of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonists to induce SZ-like behaviors, including cognitive and negative symptoms. Consequently, the administration of NMDA antagonists such as ketamine (KET), dizocilpine (MK-801) or phencyclidine (PCP) has been proposed as an animal experimental

* Corresponding author. Director of the Barcelona Clinic Schizophrenia Unit (BCSU), Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Casanova 143, E-08036, Barcelona, Spain.

** Corresponding author. specialist in clinical pharmacology, Head of Clinical Trials Unit in Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Spain.

E-mail addresses: jaarnaiz@clinic.cat (J.A. Arnaiz), eparella@clinic.cat (E. Parellada).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.04.005>

Received 8 January 2020; Received in revised form 10 April 2020; Accepted 18 April 2020
0022-3956/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

model of SZ. These induce core symptoms of the illness, including cognitive deficits, in healthy animals (Chatterjee et al., 2011; Coleman et al., 2009; Grayson et al., 2015; Jeevakumar et al., 2015; Jeevakumar and Kroener, 2016). Inhibitory neurotransmission shapes neuronal activity and thereby regulates information processing. In the central nervous system, inhibition is predominantly mediated by gamma-aminobutyric (GABAergic) interneurons, which express calcium-binding protein parvalbumin (PV), and are considered to be the main cellular elements that control hyperexcitability in the brain (Dichter and Ayala, 1987). The blockade of NMDAR in PV + interneurons generates a hyperglutamatergic condition as a consequence of decreased inhibitory control of excitatory pyramidal neurons leading to increased glutamate release and excessive stimulation of glutamatergic receptors (Moghaddam and Javitt, 2012). This results in excitotoxic damage and cognitive impairment (Snyder and Gao, 2013). An excess of glutamate would trigger neurotoxicity and synaptic apoptosis-pruning by local activation of caspase-3, leading to loss of density of dendritic spines in prefrontal cortex (PFC), hippocampus and nucleus accumbens neurons (Yuede et al., 2010), which could ultimately be at the basis of accelerated gray matter loss, as assessed by magnetic resonance imaging, primary negative symptoms and cognitive deficits of the disease (Glausier and Lewis, 2018; van Erp et al., 2016).

Glutamatergic regulation is also mediated by the metabotropic glutamate receptors (mGluR) and, to date, eight different subtypes have been identified and classified into three groups. These receptors are being investigated as novel drug targets for schizophrenia (Stansley and Conn, 2018). The group II mGluR, consisting of mGluR2 and mGluR3, is widely distributed in the brain and preferentially expressed on pre-synaptic nerve terminals, where it negatively modulates glutamate and GABA release (Cartmell and Schoepp, 2002; Ohishi et al., 1998; Wright et al., 2013). Recent research has suggested the clinical potential of utilizing group II mGluR as targets for novel non-dopaminergic antipsychotic drugs, given the low adverse effects and high tolerability profile (Li et al., 2015; Maksymetz et al., 2017; Muguruza et al., 2016; Wierońska et al., 2016). Mixed mGluR2/3 agonists proved to be effective preclinically in animal models of SZ. Although the agonist LY2140023 demonstrated efficacy in a phase 2 study in patients with SZ, this outcome could not be confirmed in phase 3 studies (Downing et al., 2014). Since then, efforts have focused on developing mGluR2 positive allosteric modulators (PAMs) and multiple molecules have been patented (Trabanco et al., 2019). To date, two mGluR2 PAM molecules, JNJ40411813 and AZD8529, have entered SZ phase 2 clinical trials but no positive results have been obtained. However, ongoing preclinical and clinical studies with other PAMs will contribute to define these compounds as potential novel therapeutic agents.

In the present study, we focused on 8-Trifluoromethyl-3-cyclopropylmethyl-7-[(4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl)methyl]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine (JNJ-46356479), a new selective and orally bioavailable mGluR2 positive allosteric modulator (PAM) (Cid et al., 2016). We evaluated the efficacy of this drug in reversing neuropathological and behavioral deficits induced in a postnatal KET mice model useful for the study of SZ. In particular, animals were exposed to KET on postnatal days (PND) 7, 9, and 11 (Powell et al., 2012) to transiently disrupt NMDAR function, and were subsequently treated with JNJ-46356479 in adulthood. A wide range of behavioral tests were performed to evaluate cognitive and negative behaviors related to SZ. Changes in PV + GABAergic interneurons were evaluated in the medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus (HPC). Given significant changes were observed in mPFC and Dentate Gyrus (DG), c-Fos expression, an indirect marker of neuronal activity (Dragunow and Faull, 1989), was also examined in these particular areas.

2. Material and methods

2.1. Animals and drug treatment

All experimental procedures involving animals were performed in accordance with European Union guidelines on the care and use of laboratory animals and were approved by the University of Barcelona Animal Care Committee and by the Department of the Environment of the Generalitat de Catalunya.

As detailed in the Supplemental Methods, saline or 30 mg/kg ketamine were administered at 10 mL/kg to pups on PND 7, 9, and 11 (Powell et al., 2012). Once they reached the age of 80 days, mice were treated subcutaneously with vehicle (10% hydroxypropyl-beta-68 cyclodextrin, HP β CD) or 10 mg/kg of JNJ-46356479 (Cid et al., 2016, Metcalf et al., 2018) daily for 2 weeks before performing the behavioral experiments. Throughout the course of behavioral testing (6 weeks), drug treatment was continued. Adult mice were chronically treated with JNJ-46356479 to better mimic the pharmacological treatment of patients with SZ.

Fifty-two C57BL/6J male and female mice were divided into four groups treated as follows: Control group, only treated with vehicle (Veh + Veh, N = 13); JNJ group, treated with vehicle and JNJ-46356479 (Veh + JNJ, N = 11); KET group, treated with ketamine and vehicle (Ket + Veh, N = 15), and the KET plus JNJ group, treated with ketamine and JNJ-46356479 (Ket + JNJ, N = 13). Similar numbers of males and females were included in each group.

2.2. Behavioral experiments

All behavioral experiments were performed using adult animals (PND + 90). All mice underwent the behavioral tests in the following order: motor test battery, rotarod test, open field test, Y-maze, Three-chamber sociability and novelty test, Five-trial social memory test, and fear conditioning. To minimize the possibility of behavioral responses being altered by prior test history, the most invasive procedures were performed last. See Supplemental Methods for details.

2.3. Tissue preparation for histology

Perfusion was performed 1 h after the last drug administration after completion of behavioral experiments. Half of the animals of each group were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and transcardially perfused with phosphate buffer saline 1X (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in PBS 1X. Brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4 °C, and then transferred into 30% sucrose and stored for 3 day at 4 °C. Next, the brains were frozen in dry ice and coronally sliced in a cryostat (30 μ m). From each animal, 5 series containing 7–9 prefrontal cortex sections and 8 series containing 8–10 hippocampal sections were obtained. Sections were stored at –20 °C in a solution containing 25% (v/v) ethylene glycol, 25% glycerol, and 50% (v/v) sodium phosphate buffer, until processing for histological procedures.

2.4. Immunohistochemistry

Free-floating medial prefrontal cortex and hippocampal sections were preincubated in PBTBSA (Phosphate Buffer 1X containing 0.5% Triton X-100 and 0.1% Bovine Serum Albumin) for 5 min before performing immunohistochemistry, as previously described (García Cerro et al., 2018). The primary antibodies used were a rabbit polyclonal anti-parvalbumin and a polyclonal guinea pig anti-c-Fos. Primary antibodies were detected using anti-rabbit Alexa Fluor-594-conjugated and anti-guinea pig Alexa Fluor-488-conjugated secondary antibodies. Additionally, total cellular nuclei in the medial cortex and hippocampus were stained with 496-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 12 min in 0.1 N phosphate buffer. Sections were mounted on SuperFrost Plus

slides and coverslipped with Fluoro Gel. See [Supplementary Table 1](#) for details.

One random series of mPFC sections was mounted, comprising the entire area of the prelimbic and infralimbic prefrontal cortex. DAPI was used to define the anatomical structures which were identified according to the Franklin and Paxinos atlas (Franklin and Paxinos, 2013). Six independent fields on the prelimbic and infralimbic mPFC were randomly selected and a dissector counting frame of (387.50 × 387.50 μm) was imaged in each. PV and c-Fos marked cells in the dissectors were determined using the thresholding method to estimate the average of mean gray values. Slices from mPFC were photographed using a Leica SP5 confocal microscope with a 20× objective. Image analysis was performed using the aid of NIH ImageJ software applying the same threshold to all pictures.

One random series of hippocampal sections was mounted, comprising the entire area of the DG, CA1, CA2, and CA3. Three random dissectors were imaged obtaining a mosaic image encompassing the entire hippocampal area. In program image J, the area of the zones was defined manually, delimiting the granule cell layer in the DG and the pyramidal cell layer in CA1, CA2, and CA3 and analysing an average area of 0.527 mm², 0.378 mm², 0.08 mm² and 0.373 mm², respectively. PV + cells in the DG, CA1, CA2, and CA3 in the hippocampus of one hemisphere were measured using a Zeiss Axioskop 2 plus microscope with a 40× objective, while c-Fos was measured in DG using a Leica AF6000 with a 63× objective. All analyses were conducted blind with regards to treatment groups.

2.5. Statistical analysis

Differences between groups were analysed using a one-way ANOVA. The mean values for each experimental group were compared using Bonferroni's post-hoc tests. If data presented a non-normal distribution, the nonparametric Kruskal-Wallis test was performed. For pairwise comparisons, adjusted significance levels obtained from the Mann-Whitney *U* test were used. In the three-chamber test, intragroup comparisons were performed using the Student's *t*-test. The significance level was set at $p \leq 0.05$. No significant differences were detected between males and females in any of the evaluations performed and no sex effect was found when it was included as a covariable in our analysis. Outliers were defined by being below 1.5x the interquartile range (IQR) from the lower quartile or above 1.5x IQR from the upper quartile and were excluded from the experimental data prior to statistical analysis. All analyses were performed using SPSS (version 25.0, Chicago, IL, USA) for Windows.

3. Results

3.1. Behavioral experiments

3.1.1. Motor assessment

Motor function, motor coordination, and general activity and anxiety were evaluated using a motor test battery, a rotarod test, and the open field test, respectively. The four groups of mice did not differ with respect to their motor coordination or the abilities assessed using the motor test battery. Only in the righting reflex test were differences significant ($H(3) = 8.20$, $p = 0.042$), but no differences were observed in pairwise comparisons. [Supplementary Data Table 2](#) shows the scores for the different sensorimotor tests.

Motor coordination was unaffected by KET or JNJ treatment assessed by the rotarod. All groups presented a similar latency to fall from the rotarod at different constant speeds ([Fig. 1a](#)) or at an accelerating rate ([Fig. 1b](#)). It should be noted that significant differences were observed at 10 r.p.m. ($H(3) = 10.27$, $p = 0.016$), but pairwise comparisons revealed that adjusted differences only occurred between the JNJ group and the KET + JNJ group ($p = 0.021$).

In the open field test, baseline activity differed across all treatment

groups. All groups traveled a shorter total distance (ANOVA: $F(3,43) = 10.64$, $p = 0.00002$) ([Fig. 2a](#)), and had a lower average speed (ANOVA: $F(3,43) = 10.64$, $p = 0.00002$) in comparison with the control group, indicating hypoactivity ([Fig. 2b](#)). Locomotion seemed to be more affected in the KET + JNJ group than in mice only treated with ketamine. Similarly, rearing activity, which measures vertical activity, was reduced in all treatments compared with vehicle (ANOVA: $F(3,43) = 11.25$, $p = 0.00001$; [Fig. 2c](#)). JNJ-treated mice spent less time in the center of the apparatus than controls, with a corresponding increase in the time spent on the periphery ($p < 0.01$) ([Fig. 2d](#)).

3.1.2. Y-maze test

In the spatial working memory Y-maze task, all groups spent more time in the novel arm than in the familiar arm during the 3 min trial after initial exploration. There were significant differences in time spent in the familiar arm between groups ($F(3,41) = 3.49$, $p = 0.024$). In particular, mice that spent more time in the familiar arm were those treated only with ketamine (Ket + Veh vs Ket + JNJ: $p = 0.036$, [Fig. 3a](#)). We also assessed these groups of mice in Y-maze spontaneous alternation and detected significance differences ($H(3) = 15.75$, $p = 0.001$; [Fig. 3b](#)). Again, the KET group showed impaired spontaneous alternation (Veh + Veh vs. Ket + Veh: $p = 0.006$).

3.1.3. Three-chamber sociability and social novelty test

In the three-chamber test, mice not treated with ketamine demonstrated a significant preference for spending time sniffing a familiar littermate rather than a toy mouse (Control group: $t = 2.92$, $p = 0.008$; JNJ group: $t = 3.17$, $p = 0.005$; [Fig. 4a](#)). When the choice was between the familiar littermate and an unfamiliar conspecific, only the KET group did not demonstrate a preference for social novelty (Control group: $t = -3.29$, $p = 0.004$; JNJ group: $t = -2.10$, $p = 0.049$; KET + JNJ: $t = -2.11$, $p = 0.048$; [Fig. 4b](#)).

3.1.4. Five-trial social memory test

Mice were evaluated for their social recognition abilities in the Five-Trial test ([Fig. 5](#)). Differences between groups were observed in most trials (Trial 1: $F(3,38) = 4.32$, $p = 0.01$; Trial 2: $F(3,38) = 5.39$, $p = 0.0034$; Trial 3: $F(3,38) = 3.52$, $p = 0.024$; Trial 5: $F(3,38) = 8.36$, $p = 0.0002$). In particular, compared with the control group, the KET group spent less time investigating the other mouse in the different trials (Trial 1: $p = 0.007$; Trial 2: $p = 0.002$; Trial 3: $p = 0.045$).

After four trials being exposed to the same mouse, the control group increased interaction time when a novel mouse was presented in the fifth trial ($t: -3.99$, $p = 0.0007$). This expected dishabituation was not shown in the KET group. However, when mice were treated with KET + JNJ, they recovered an interest in the novel animal ($t: -2.7$, $p = 0.015$). In the fifth trial, the KET group spent significantly less time interacting with the novel mouse compared with both the control and the KET + JNJ group ($p = 0.0001$; $p = 0.024$, respectively).

3.1.5. Contextual fear conditioning

There was no effect of treatment on post-shock freezing response during the conditioning trial, indicating that all groups acquired a similar contextual fear memory. During the extinction trials, there was no treatment effect on conditioned responses ([Fig. 6](#)).

3.2. Immunohistochemistry

3.2.1. Parvalbumin and c-Fos expression in medial prefrontal cortex

Mean gray values of PV and c-Fos corrected by DAPI levels in mPFC are shown in [Fig. 7](#). Significant differences in PV immunoreactivity were detected between the four groups (ANOVA, $F(3,24) = 3.12$, $p = 0.045$; [Fig. 7a](#)). Compared to the control group, an almost 50% reduction in PV + interneuron density was observed in the ketamine group ($p = 0.041$). Mice treated with JNJ-46356479 showed mean

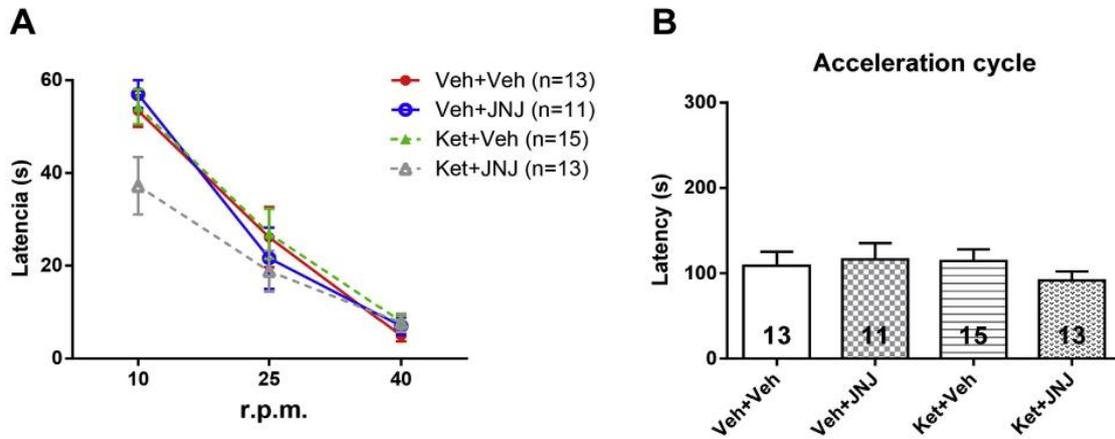


Fig. 1. Motor coordination in the rotarod test. Mean values \pm SEM of latency to fall from the rotarod at different constant speeds (A) and during the acceleration cycle (B). * $p < 0.05$ Kruskal Wallis.

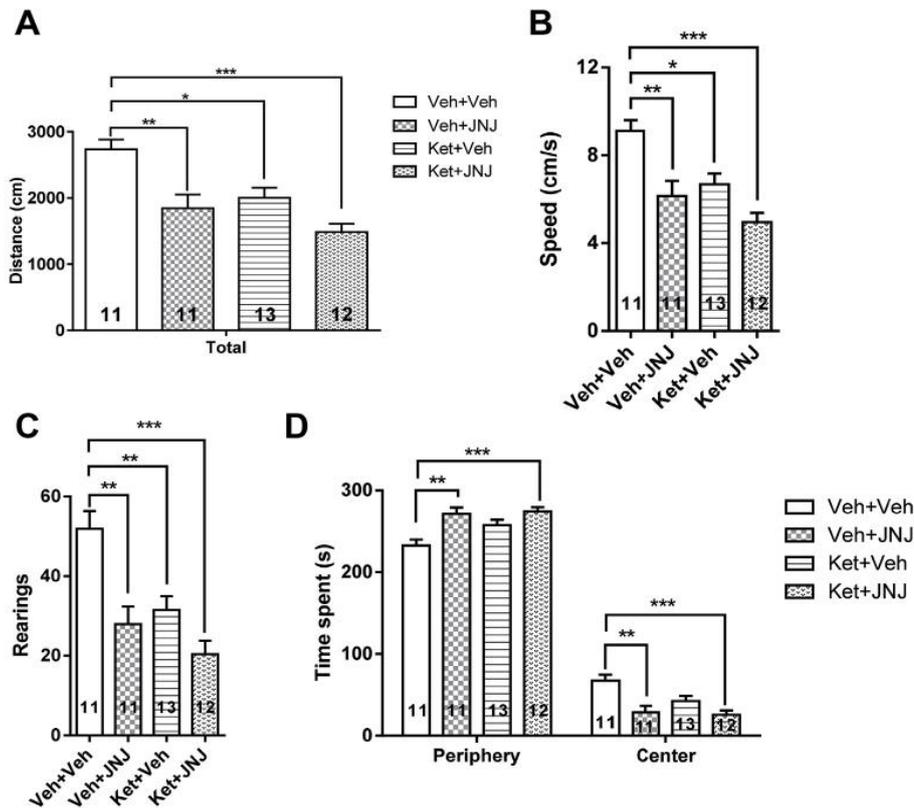


Fig. 2. Activity performed by the four groups of mice in the open field test. Data are presented as the mean values \pm SEM of the total activity. Significance indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

gray values for PV + neurons lower than the control group but differences were not significant. We also quantified c-Fos expression in mPFC as a marker of neural activity; differences were not significant (Fig. 7b). Representative confocal images of slices from the mPFC stained for DAPI, PV, and c-Fos are shown in Fig. 7c.

3.2.2. Parvalbumin and c-Fos expression in hippocampus

PV + neurons were abundant within or close to the pyramidal cell layer of CA1, CA2, and CA3 and the granule cell layer of the dentate

gyrus (Table 1; Fig. 8). Only DG presented, differences in PV + interneuron density between groups (ANOVA: $F(3,22) = 3.02$, $p = 0.05$; Fig. 8a). In particular, the KET group showed a significant reduction in PV + cells compared with control mice ($p = 0.043$). Although differences did not reach statistical significance, the number of PV + cells was reduced in the CA1. Administration of JNJ-46356479 partially reversed the effect of ketamine on PV + neurons, as densities found in the KET + JNJ group were similar to those obtained in the control group.

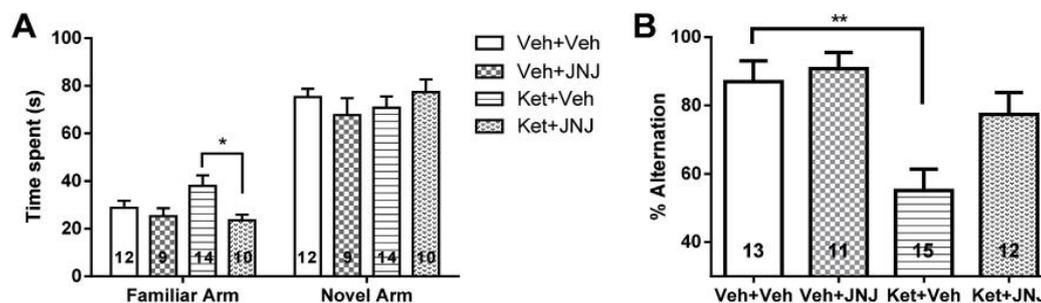


Fig. 3. Spatial working memory task in the Y-maze (A). Data are presented as the mean values \pm SEM of the time spent in the familiar or novel arm. Spontaneous alternation test with 3 trials (B). Alternation behavior was defined as consecutive entries into each of the two arms without repetition (that is, AB or BA) in the second run. The number of alternations/total number of possible alternations \times 100 was calculated. The number of animals in each experimental group is displayed within the bars. Significance indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Given significant changes in PV + interneurons were observed in DG, we reanalysed this particular hippocampal area incorporating immunostaining for c-Fos to quantify the amount of neurons expressing this protein (Table 1), and found significant differences between groups (ANOVA: $F(3,22) = 3.20$, $p = 0.043$; Fig. 8b). Increased levels of c-Fos were detected in the KET group compared with the control group ($p = 0.038$). Again, pharmacological treatment with JNJ-46356479 ameliorated the effect of ketamine on c-Fos + neurons.

4. Discussion

In the present study, we evaluated the efficacy of JNJ-46356479, a PAM of mGluR2, in reversing behavioral and neuropathological deficits related to cognitive and negative symptoms induced in a postnatal ketamine mice model of SZ.

To date, several rodent models for cognition in SZ have been developed using non-competitive NMDAR antagonists such as KET, PCP, and dizocilpine (MK-801) (Cadinu et al., 2018). There is considerable evidence that blocking NMDAR in animals induces cognitive and negative symptoms associated with SZ and produces associated pathological changes such as reduced calcium-binding protein parvalbumin (PV) interneurons in the PFC and HPC (Braun et al., 2007; Coleman et al., 2009; Jeevakumar et al., 2015; Neill et al., 2014, 2010). This is consistent with results from human postmortem studies that have shown a selective reduction in PV exclusively within the PFC (Beasley

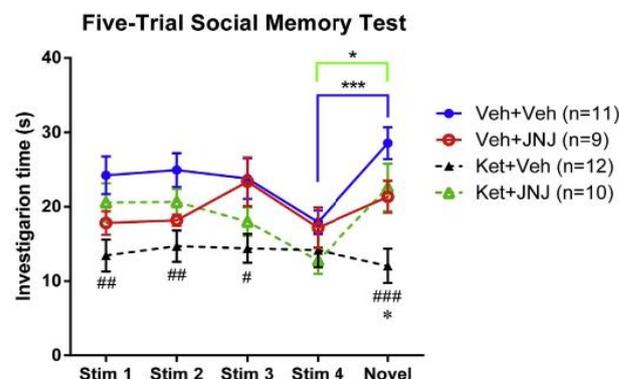


Fig. 5. Five trial Social Memory Test. Data are presented as the mean values \pm SEM of the total activity. Significance indicated as # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ for Veh + Veh vs. Ket + Veh, and * $p < 0.05$ for Ket + Veh vs. Ket + JNJ. Bonferroni test after significant two-way ANOVAs. For comparison within group Student t-tests were used * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$.

and Reynolds, 1997) and HPC (Zhang and Reynolds, 2002) from patients with SZ, suggesting a dysfunction of GABAergic interneurons in these brain areas involved in several cognitive processes.

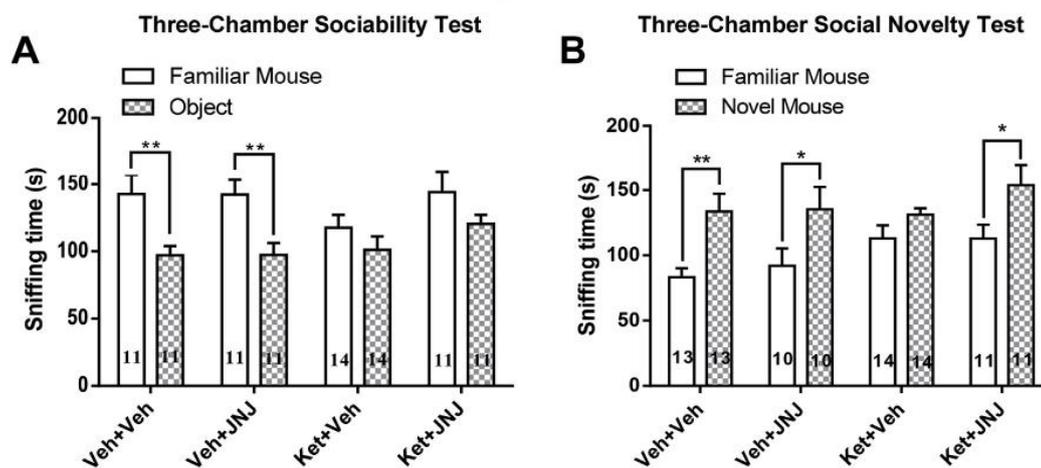


Fig. 4. Social behavior in the three-chamber test. Time duration was measured for (A) sociability, and (B) preference for a novel mouse. Data shown are mean \pm SEM for each group. The number of animals in each experimental group is shown within the bars. Student t-tests were used for within-group comparison * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

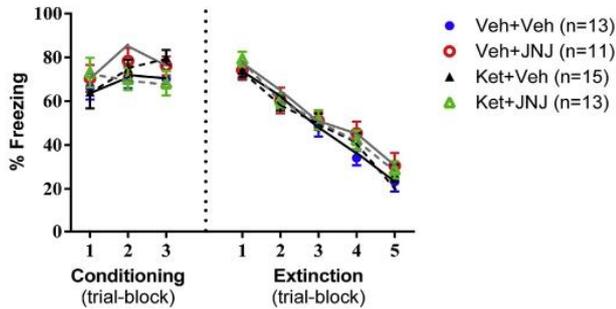


Fig. 6. The ability of mice to learn and remember an association between environmental cues and aversive experiences were similar in the different groups. No significant differences were observed between groups, either in the conditioning or extinction phase. Data are presented as the mean values \pm SEM of the total activity.

Given the disparate methodologies used with different animal models, conflicting results on PV changes have also been reported (Benneyworth et al., 2011), and the age of animals seems to be a relevant factor to take into account (Honeycutt and Chrobak, 2018). Most studies have used NMDAR antagonists in adulthood. However, as SZ is a neurodevelopmental disorder (Insel, 2010) in which insults during brain development can contribute to onset of the disease in early adulthood, treatment with NMDAR antagonists during a critical developmental period may better mimic the neuropathological and behavioral changes in the SZ animal model (Cadinu et al., 2018). Based on this, other studies have focused on evaluating the effects of neonatal NMDAR blockade (Coleman et al., 2009; Jeevakumar et al., 2015; Nakatani-Pawlak et al., 2009; Turner et al., 2010; Wang et al., 2008).

We used a recently reported mice model (Jeevakumar et al., 2015) in which animals were exposed to ketamine on PND 7, 9, and 11 to transiently disrupt NMDAR function, persistently induce changes in GABAergic interneurons, and produce SZ-like behavioral symptoms in adulthood. The first two postnatal weeks in rodents correspond to the second trimester of pregnancy in humans, in which transient epigenetic factors or exposure to environmental insults increase the probability of developing SZ as an adult (Nakatani-Pawlak et al., 2009).

In our study, results show that behavioral impairments related to cognitive and negative symptoms in the postnatal ketamine mice model were reversed or attenuated by JNJ-46356479 treatment. Mice exposed postnatally to ketamine spent more time in the familiar arm and showed impaired spontaneous alternation assessed using the Y-maze test. This indicates that their spatial working memory was impaired, consistent with previous studies demonstrating that KET alters rodent memory performance in the Y-maze test (Ben-Azu et al., 2018; Hou et al., 2013). Interestingly, normal spontaneous alternation performance was observed in the animals treated with ketamine and JNJ-46356479, suggesting the efficacy of this drug in improving certain cognitive deficits in psychotic patients.

Regarding the effect of treatments on traits related to negative symptoms, treated mice showed differential social behavior in both sociability tests evaluated. The results obtained for the three-chamber test indicate that postnatal ketamine exposure altered social motivation in adult mice as they spent a similar length of time sniffing an object and a mouse, and did not exhibit a preference for social novelty either, as they also spent a similar amount of time sniffing familiar and novel mice. Interestingly, the deficit in social novelty was reversed by JNJ treatment. Animals treated with KET plus JNJ presented social novelty behavior similar to that of the control group, spending significantly more time interacting with the novel than the familiar mouse. This is in line with the results obtained for the five-trial social memory test. Regardless of whether mice were familiar or not, animals treated with KET showed similar interaction times during the five trials, which were

significantly lower than those shown by the control mice, suggesting low social activity and social memory deficit. Jeevakumar et al. described similar results using the same model as postnatal ketamine treated animals also showed deficits in social novelty detection in adulthood (Jeevakumar et al., 2015). However, mice treated with KET plus JNJ exhibited an apparent habituation (decreased interaction time) after four trials with the same familiar mouse and a dishabituation (increased interaction time) in trial 5 with the novel mouse, indicating normalization of sociability and social memory function. Interestingly, neonatal phencyclidine treatment induced impairments in social novelty discrimination which were attenuated by stimulation of the mGlu2/3 receptor (Harich et al., 2007). Our results suggest that postnatal KET administration leads to persistent social deficits in adulthood, which could serve as an indicator of negative SZ-like symptoms; hence pharmacological treatment with JNJ may also be effective for controlling patients' negative symptom. Furthermore, KET treatment in adulthood has been shown to reduce social interaction.

The effect of ketamine and JNJ treatment on the consolidation and extinction of conditioned fear was also evaluated, but no differences between mice groups were observed in our experiments. Alterations in this behavioral tests have been related to both cognitive and negative schizophrenic symptoms as patients often present deficits in associative learning and motivational processing, in particular showing an inability to process fear adequately (Calzavara et al., 2009; Pietersen et al., 2007). However, there are also discrepancies between studies and, as in our study, other authors have also reported no significant effect of KET on contextual fear conditioning (Bolton et al., 2012; Clifton et al., 2018).

We performed a wide-ranging assessment to determine whether motor function and anxiety-related behavior were affected by pharmacological treatment with KET and JNJ. Compared to control mice, animals treated with ketamine and/or JNJ showed similar motor function and coordination assessed by the motor test battery and rotarod test. However, in the open field test, animals treated with KET, JNJ or a combination of the two showed a significant reduction in locomotor activity and exploratory behavior. Treated mice traveled less horizontal and vertical distance and did so at a lower speed. A reduction in locomotor activity and exploratory behavior has previously been described in postnatal murine animal models treated with NMDA antagonists (Lim et al., 2012; Pinar et al., 2015). In the same animal model that we used, Jeevakumar et al. (2015), reported that postnatal ketamine treatment did not lead to enhanced hyperlocomotion in adult mice in response to an acute amphetamine treatment. However, the reduction in the distance traveled in the open field could result from a significant increase in stereotypical behavior as shown by increased repetitive movement in these animals (Phensy et al., 2017). This would be in accordance with hyperlocomotion observed in adult animals treated with NMDA antagonists and show the usefulness of this pharmacological animal model to also mimic positive-SZ like symptoms. JNJ treatment also reduced spontaneous locomotion in the open field test. Other PAMs of mGluR2 have shown a capacity to reduce hyperlocomotion induced by treatment with amphetamine or other drugs (Higgins et al., 2017; Hiyoshi et al., 2014). There have been consistent reports of the efficacy of clozapine in attenuating induced hyperlocomotion (Scorza et al., 2010) and this antipsychotic can also diminish spontaneous exploratory behavior in mice (Pinar et al., 2015).

Regarding the possible side effects of the pharmacological treatment, it is important to note that JNJ may trigger certain anxiety-related behavior as mice spent less time in the center of the open field (Mutlu et al., 2012). However, chronic JNJ treatment did not affect animal weight, which is a very positive outcome given that AP-induced weight gain is one of the main side effect of second generation APs (Dayabandara et al., 2017; Musil et al., 2015). However, further studies are required to assess the safety of this mGlu2 PAM.

Using this model, Jeevakumar et al. observed a reduction in PV expression in the PFC. Our results replicate this finding, but we also

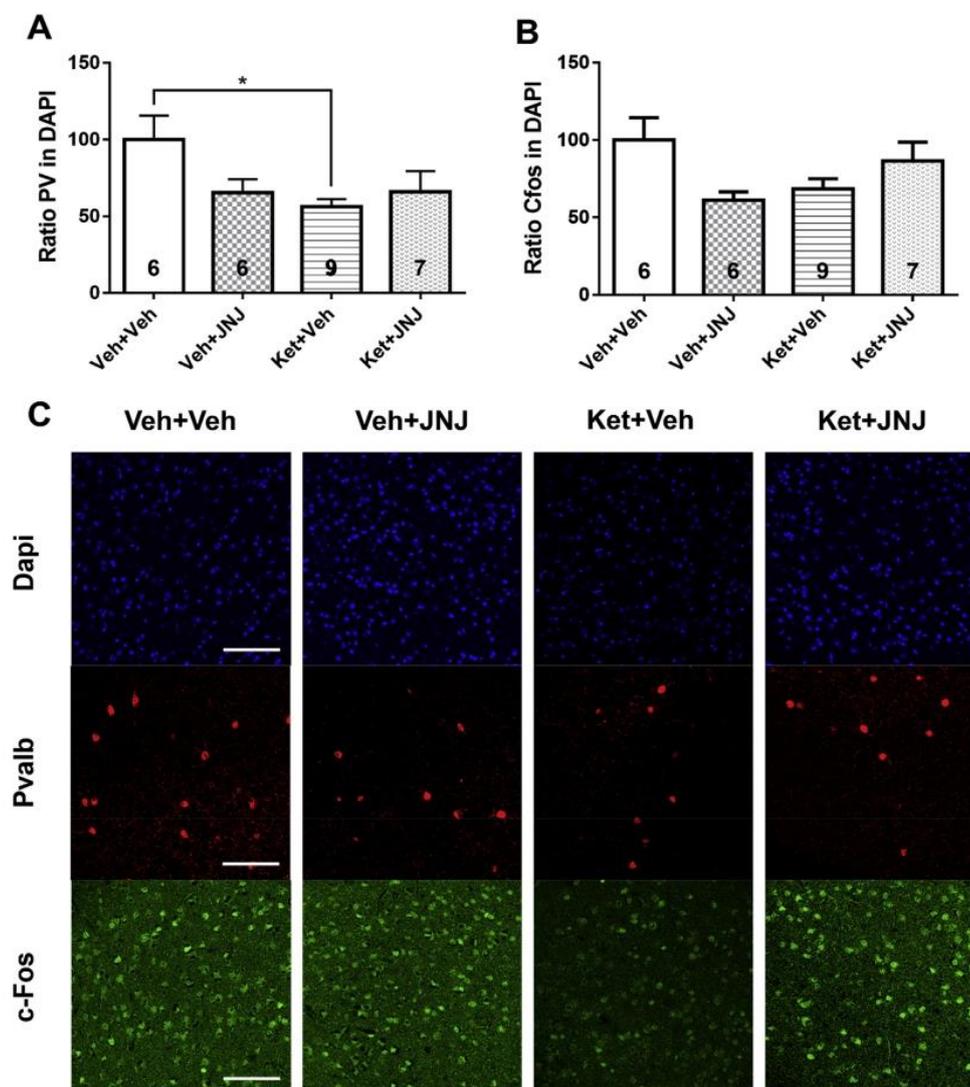


Fig. 7. Mean gray values of parvalbumin (PV) (A) and c-Fos (B) in the medial prefrontal cortex (mPFC). PV and c-Fos values were corrected by DAPI levels. Results are expressed as percentages of the control group. Bars represent means \pm SEM, with the number of each condition displayed within the bars. Significance indicated as * for $p < 0.05$ Bonferroni tests after significant ANOVAs. (C) Representative confocal images of slices from the mPFC stained for DAPI (blue), c-Fos (green) and PV (red) from all groups. Scale bars are 100 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1

Mean Values \pm SEM of the relative densities (somata/mm²) of PV and c-Fos positive neurons.

PV + Interneurons				
	Veh + Veh	Veh + JNJ	Ket + Veh	Ket + JNJ
DG	48.28 \pm 4.74	38.74 \pm 4.97	29.85 \pm 3.07	41.05 \pm 4.69
CA3	87.6 \pm 5.43	73.52 \pm 4.20	68.49 \pm 8.97	70.75 \pm 7.73
CA2	238.01 \pm 52.74	210.83 \pm 16.32	228.35 \pm 20.49	239.70 \pm 25.52
CA1	139.46 \pm 29.6	159.12 \pm 22.83	102.24 \pm 10.15	137.73 \pm 25.57
c-Fos + cells				
	Veh + Veh	Veh + JNJ	Ket + Veh	Ket + JNJ
DG	110.94 \pm 10.04	113.34 \pm 8.19	135.11 \pm 7.31	118.93 \pm 7.64

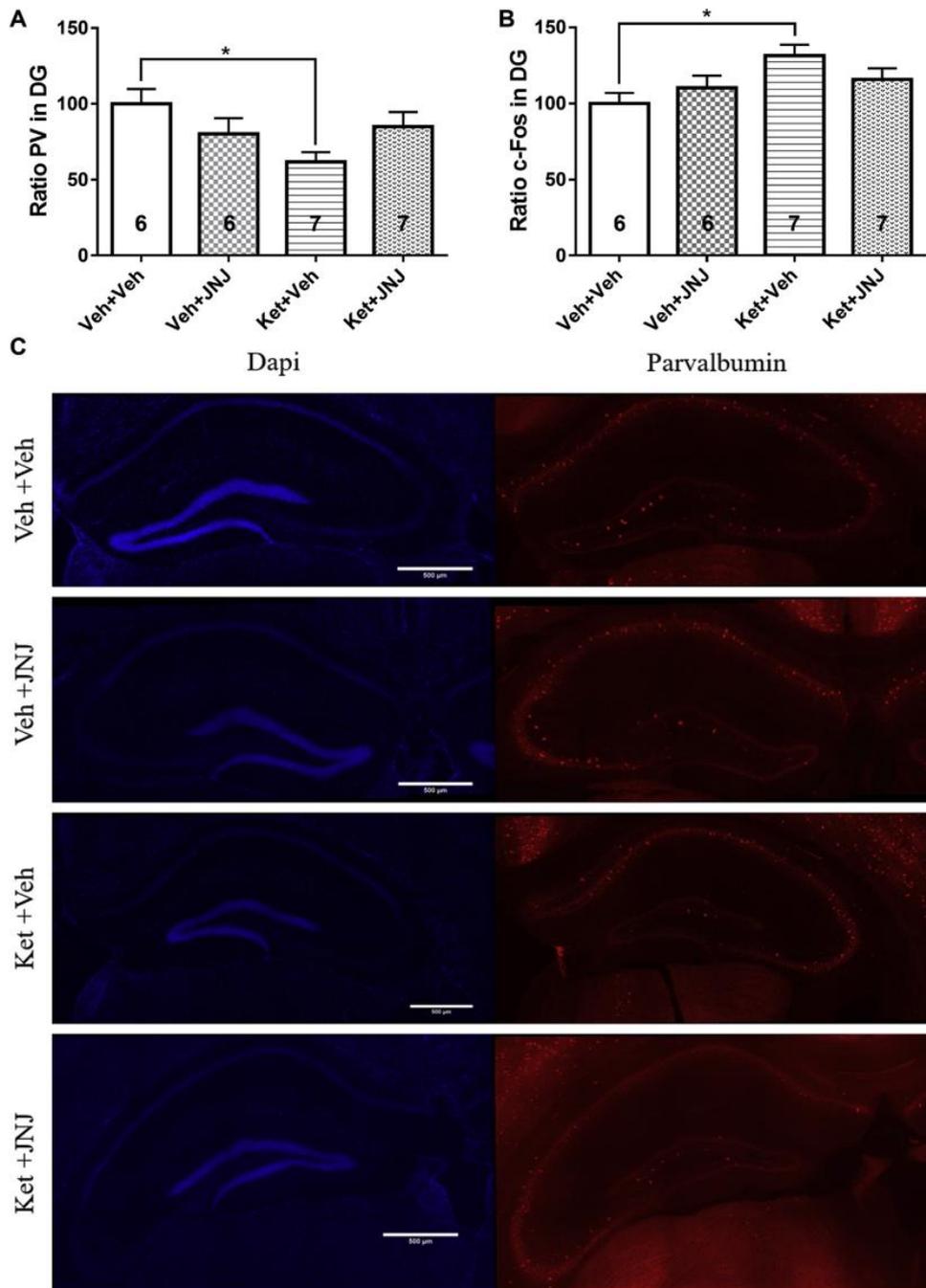


Fig. 8. Quantification of parvalbumin (PV) (A) and c-Fos (B) positive neurons in Dentate Gyrus (DG). Results are expressed as a percentage of normalized PV and c-Fos measured in Veh + Veh group respectively for A and B. Bars represent means \pm SEM, with the number of animals used per group displayed within the bars. Significance indicated as * for $p < 0.05$ Bonferroni tests after significant ANOVAs. (C) Distribution pattern of PV + interneurons in the mouse hippocampus. Representative hippocampal montage images acquired with LAS AF Power mosaic software from Leica. DAPI (blue), PV (red). Scale bars are 500 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

observed, for the first time in this animal model, a reduction in PV + interneurons in the hippocampus, particularly in the dentate gyrus (DG). The hippocampal formation comprises a group of cortical regions, including the dentate DG and hippocampus proper (CA1-CA2-CA3), and plays an important role in learning and memory. Reductions

in PV in this brain area have also been reported in KET treated adult mice (Koh et al., 2016; Schobel et al., 2013) and postnatal mice, but under a chronic treatment regime (Hauser et al., 2017). Our results are in line with these evidences and others that have also shown reductions in density of PV + interneurons induced by different NMDA antagonists

(Braun et al., 2007; Coleman et al., 2009). However, future studies with different methodological approaches in these animal models would be necessary to further analyse if interneurons are expressing lower PV levels. In fact, it has been recently reported that patients with SZ could have an altered PV protein levels despite showing a similar number of PV + cells (Enwrigh et al., 2018).

Interestingly, together with this reduction in PV + interneurons, we also observed a significant increase in c-Fos, an indirect marker of neuronal activity (Dragunow and Faull, 1989), in DG of mice treated with KET. There are discrepancies in c-Fos expression reported under different conditions. Although Hauser et al. (2017) reported similar values of c-Fos immunopositive cells under basal conditions in a ketamine mice model, they found a significant reduction of this marker after ketamine treatment in hippocampal areas. However, Nishizawa et al. (2000) reported increases in c-Fos expression in mice treated with different ketamine doses which is consistent with our results and those reported in murine models treated with other NMDAR antagonists such as PCP (Castañé et al., 2015; Hervig et al., 2016). This increased neuronal activity therefore seems to be related to a lack of inhibitory control given the reduction in PV + GABAergic interneurons.

The results of our study show, for the first time, that pharmacological treatment with a PAM of mGluR2 attenuates the neuropathological changes produced by postnatal ketamine treatment. Mice treated with KET + JNJ showed values for PV + interneuron density and c-Fos activity pattern in the PFC and HPC similar to those obtained in control mice. It should be noted that mean values for PV + interneuron density were lower in cells treated with JNJ-46356479, especially in mPFC; however, differences were not significant. Pharmacological treatment with this PAM of mGluR2 decreased presynaptic glutamate release in excitatory neurons, reversing the hyperglutamatergic condition induced by ketamine and preventing neuropathological alterations, which could be an important mechanism of action of this drug to treat the cognitive and negative symptoms associated with SZ. Similarly, it has recently been reported that clozapine and lurasidone can prevent a reduction in PV in the hippocampus (Filipović et al., 2018; Rossetti et al., 2018). Consequently, modulation of the hippocampal GABAergic system has been proposed as a key mechanism of these atypical antipsychotics for improving cognitive and negative symptoms of SZ.

It should be noted that both sexes were included in our experiments. Given sex differences in several features concerning schizophrenia have been reported in both humans and animals (Hill, 2016), it is important to include similar representation of both sexes in this kind of preclinical research in order to generalize to the entire population (McCarthy, 2015).

Our results show that postnatal KET administration treatment induced permanent neuropathological and behavioral deficits in adult animals that were reversed or attenuated by JNJ-46356479 treatment in adulthood. KET reduced PV expression in the PFC and HPC, particularly in the DG, where an increase in c-Fos expression was also detected. These neuropathological deficits may be responsible for the impairments in working memory and social behavior observed in these animals. A reduction in PV + GABAergic interneurons could lead to decreased inhibitory control of neurons in the PFC and HPC and consequently affect cognitive and social processes regulated by these brain areas. It has been reported that altering the function of PV + interneurons in the PFC produces deficits in the cognitive domain (Murray et al., 2015) abolishes social exploration, and disrupts social preference (Bicks et al., 2015). Interestingly, the selective activation of these interneurons in DG also seems to be critical regulating social interaction (Zou et al., 2016). Besides the efficacy of JNJ-46356479 in adulthood, it would also be interesting in the future to assess whether use of this drug in adolescence could better reverse the neuropathological and behavioral deficits induced by postnatal KET administration. This kind of studies could have relevant clinical translational applications since the early administration of modulating drugs of the mGluR2 that inhibit glutamate release at the beginning of critical phases of SZ

such as the prodromal stage or during the transition to psychosis could prevent or slow the deteriorating course of the disease. Thus, in clinical research, agonist of the mGluR2/3 that reduce presynaptic glutamate release such as LY2140023 (Downing et al., 2014) or the PAM JNJ-40411813 (Cid et al., 2014; Lavreysen et al., 2015) and AZD8529 (Litman et al., 2016) could have failed on the established SZ disease (Li et al., 2015). It would nevertheless be interesting to investigate other critical periods of the disease, such as the prodromal or transition to psychosis stage, during which a neurotoxic glutamate storm could exist (Schobel et al., 2013). For these patients, strategies to reduce glutamate release might prevent or slow down the progression of clinical and cognitive deterioration (Millan et al., 2016).

Currently, there are no drugs that effectively treat cognitive and negative symptoms in patients with SZ. Consequently, new molecular targets are required to treat these symptoms. Our results suggest that pharmacological treatment with a positive allosteric modulator of mGluR2 such as JNJ could help improve some of the cognitive and negative symptoms related to SZ by mitigating neuropathological alterations, including dysfunction of PV + GABAergic interneurons in the PFC and HPC.

Contributors

AM and SG participated designing and carrying out most of the experimental procedures, performing the statistical analyses and the interpretation of results, and writing the first draft of manuscript. SM helped in the statistical analysis. TT helped in mice treatment and in behavioral evaluation. DB provide the macros to automate image analysis. NR quantify the PV + cells and c-Fos marked cells in the Hippocampal zone. AL and EP participated in the coordination, conceiving and design of the study. PG, EP and JA helped in the drafting of the manuscript and acquired funding for the research. All authors read and approved the final manuscript.

Role of the funding source

This work was partially supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, Carlos III Health Institute, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) – The European Regional Development Fund (FEDER – una manera de hacer Europa) (P118/01005), the “Pons Balmes Grant” (FCRB_PB_2018), and the Government of Catalonia, Secretaria d’Universitats i Recerca del Departament d’Economia i Coneixement (2017SGR1562; 2017SGR1355). This work has not received any funds from the pharmaceutical industry.

CRedit authorship contribution statement

Albert Martínez-Pinteño: Formal analysis, Writing - original draft. **Susana García-Cerro:** Formal analysis, Writing - original draft. **Sergi Mas:** Formal analysis. **Teresa Torres:** Methodology. **Daniel Boloc:** Formal analysis. **Natalia Rodríguez:** Methodology. **Amalia Lafuente:** Supervision. **Patricia Gassó:** Funding acquisition, Writing - original draft. **Joan Albert Arnaiz:** Writing - original draft. **Eduard Parellada:** Funding acquisition, Writing - original draft.

Acknowledgements

The authors wish to thank José María Cid from Janssen R&D Toledo, Spain; Marc Ceusters and Hilde Lavreysen from Janssen R&D Beerse, Belgium and their collaborators from Addex Therapeutics, for the pharmacological information and cession of the compound JNJ-46356479 through a Material Transfer Agreement as well as for their helpful comments on the manuscript. The authors also thank the Language Advisory Service at the University of Barcelona, Spain, for manuscript revision.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.04.005>.

References

- Beasley, C.L., Reynolds, G.P., 1997. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophr. Res.* 24, 349–355.
- Ben-Azu, B., Aderibigbe, A.O., Eneni, A.-E.O., Ajayi, A.M., Umukoro, S., Iwalewa, E.O., 2018. Morin attenuates neurochemical changes and increased oxidative/Nitric stress in brains of mice exposed to ketamine: prevention and reversal of schizophrenia-like symptoms. *Neurochem. Res.* 43, 1745–1755. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2590-z>.
- Benneyworth, M.A., Roseman, A.S., Basu, A.C., Coyle, J.T., 2011. Failure of NMDA receptor hypofunction to induce a pathological reduction in PV-positive GABAergic cell markers. *Neurosci. Lett.* 488, 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.043>.
- Bicks, L.K., Koike, H., Akbarian, S., Morishita, H., 2015. Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. *Front. Psychol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>.
- Bolton, M.M., Heaney, C.F., Sabbagh, J.J., Murtishaw, A.S., Magcalas, C.M., Kinney, J.W., 2012. Deficits in emotional learning and memory in an animal model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 233, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.049>.
- Braun, I., Genius, J., Grunze, H., Bender, A., Möller, H.-J., Rujescu, D., 2007. Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophr. Res.* 97, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.05.005>.
- Cadinu, D., Grayson, B., Podda, G., Harte, M.K., Doostdar, N., Neill, J.C., 2018. NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. *Neuropharmacology* 142, 41–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.045>.
- Calzavara, M.B., Medrano, W.A., Levin, R., Kameda, S.R., Andersen, M.L., Tufik, S., Silva, R.H., Frussa-Filho, R., Abílio, V.C., 2009. Neuroleptic drugs revert the contextual fear conditioning deficit presented by spontaneously hypertensive rats: a potential animal model of emotional context processing in schizophrenia? *Schizophr. Bull.* 35, 748–759. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn006>.
- Cartmell, J., Schoepp, D.D., 2002. Regulation of Neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 75, 889–907. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750889.x>.
- Castañé, A., Santana, N., Artigas, F., 2015. PCP-based mice models of schizophrenia: differential behavioral, neurochemical and cellular effects of acute and subchronic treatments. *Psychopharmacology* 232, 4085–4097. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-3946-6>.
- Chatterjee, M., Ganguly, S., Srivastava, M., Palit, G., 2011. Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav. Brain Res.* 216, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.001>.
- Cid, J.M., Tresadern, G., Duvey, G., Lütjens, R., Finn, T., Rocher, J.-P., Poli, S., Vega, J.A., de Lucas, A.I., Matesanz, E., Linares, M.L., Andrés, J.I., Alcazar, J., Alonso, J.M., Macdonald, G.J., Oehrlrich, D., Lavreysen, H., Ahnaou, A., Drinkenburg, W., Mackie, C., Pype, S., Gallacher, D., Trabanco, A.A., 2014. Discovery of 1-Butyl-3-chloro-4-(4-phenyl-1-piperidinyl)-(1H)-pyridone (JNJ-40411813): a novel positive allosteric modulator of the metabotropic glutamate 2 receptor. *J. Med. Chem.* 57, 6495–6512. <https://doi.org/10.1021/jm500496m>.
- Cid, J.M., Tresadern, G., Vega, J.A., de Lucas, A.I., Del Cerro, A., Matesanz, E., Linares, M.L., García, A., Iturrino, L., Pérez-Benito, L., Macdonald, G.J., Oehrlrich, D., Lavreysen, H., Peeters, L., Ceusters, M., Ahnaou, A., Drinkenburg, W., Mackie, C., Somers, M., Trabanco, A.A., 2016. Discovery of 8-Trifluoromethyl-3-cyclopropylmethyl-7-[(4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl)methyl]-1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine (JNJ-46356479), a selective and orally bioavailable mGlu2 receptor positive allosteric modulator (PAM). *J. Med. Chem.* 59, 8495–8507. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00913>.
- Clifton, N.E., Thomas, K.L., Hall, J., 2018. The effect of ketamine on the consolidation and extinction of contextual fear memory. *J. Psychopharmacol.* 32, 156–162. <https://doi.org/10.1177/0269881117748903>.
- Coleman, L.G., Jarskog, L.F., Moy, S.S., Crews, F.T., 2009. Deficits in adult prefrontal cortex neurons and behavior following early post-natal NMDA antagonist treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93, 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.017>.
- Dayabandara, M., Hanwella, R., Ratnatunga, S., Seneviratne, S., Suraweera, C., de Silva, V.A., 2017. Antipsychotic-associated weight gain: management strategies and impact on treatment adherence. *Neuropsychiatric Dis. Treat.* 13, 2231–2241. <https://doi.org/10.2147/NDT.S113099>.
- Dichter, M.A., Ayala, G.F., 1987. Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science* 237, 157–164.
- Downing, A.M., Kinon, B.J., Millen, B.A., Zhang, L., Liu, L., Morozova, M.A., Brenner, R., Rayle, T.J., Nisenbaum, L., Zhao, F., Gomez, J.C., 2014. A double-blind, placebo-controlled comparator study of LY2140023 monohydrate in patients with schizophrenia. *BMC Psychiatr.* 14, 351. <https://doi.org/10.1186/s12888-014-0351-3>.
- Dragunow, M., Faull, R., 1989. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Methods* 29, 261–265.
- Enwrigh III, J.F., Huo, Z., Arion, D., Corradi, J.P., Tseng, G., Lewis, D.A., 2018. Transcriptome alterations of prefrontal cortical parvalbumin neurons in schizophrenia. *Mol. Psychiatr.* 23, 1606–1613. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.216>.
- Filipović, D., Stanisljević, A., Jasnčić, N., Bernardi, R.E., Inta, D., Perić, I., Gass, P., 2018. Chronic treatment with fluoxetine or clozapine of socially isolated rats prevents subsector-specific reduction of parvalbumin immunoreactive cells in the Hippocampus. *Neuroscience* 371, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.12.020>.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2013. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, fourth ed. Academic Press, an imprint of Elsevier, Amsterdam.
- García Cerro, S., Mas, S., Gortat, A., Sindreu, C., Pínteno, A.M., Marmol, F., Boloc, D., Rodríguez, N., Gasso, P., Lafuente, A., 2018. Different modulation of Rps6 phosphorylation by risperidone in striatal cells sub populations: involvement of the mTOR pathway in antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in mice. *Neuropsychiatry (London)* 1083–1093. <https://doi.org/10.4172/Neuropsychiatry.1000436>.
- Glausier, J.R., Lewis, D.A., 2018. Mapping pathologic circuitry in schizophrenia. *Handb. Clin. Neurol.* 150, 389–417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63639-3.00025-6>.
- Grayson, B., Barnes, S.A., Markou, A., Piercy, C., Podda, G., Neill, J.C., 2015. Postnatal phencyclidine (PCP) as a neurodevelopmental animal model of schizophrenia pathophysiology and symptomatology: a review. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-403-4_403.
- Harich, S., Gross, G., Bespalov, A., 2007. Stimulation of the metabotropic glutamate 2/3 receptor attenuates social novelty discrimination deficits induced by neonatal phencyclidine treatment. *Psychopharmacology (Berlin)* 192, 511–519. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0742-y>.
- Hauser, M.J., Isbrandt, D., Roeper, J., 2017. Disturbances of novel object exploration and recognition in a chronic ketamine mouse model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 332, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.013>.
- Hervig, M.E., Thomsen, M.S., Kalló, I., Mikkelsen, J.D., 2016. Acute phencyclidine administration induces c-Fos-immunoreactivity in interneurons in cortical and subcortical regions. *Neuroscience* 334, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.028>.
- Higgins, M.A., Marcin, L.R., Christopher Zusi, F., Gentles, R., Ding, M., Pearce, B.C., Easton, A., Kostich, W.A., Seager, M.A., Bourin, C., Bristol, L.J., Johnson, K.A., Miller, R., Hogan, J., Whiterock, V., Gulianello, M., Ferrante, M., Huang, Y., Hendricson, A., Alt, A., Macor, J.E., Bronson, J.J., 2017. Triazolopyridine ethers as potent, orally active mGlu2 positive allosteric modulators for treating schizophrenia. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 496–513. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.018>.
- Hill, R.A., 2016. Sex differences in animal models of schizophrenia shed light on the underlying pathophysiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 67, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.014>.
- Hiyoshi, T., Marumo, T., Hikichi, H., Tomishima, Y., Urabe, H., Tamita, T., Iida, I., Yasuhara, A., Karasawa, J., Chaki, S., 2014. Neurophysiological and antipsychotic profiles of TASP0433864, a novel positive allosteric modulator of metabotropic glutamate 2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 351, 642–653. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.218651>.
- Honeycutt, J.A., Chrobak, J.J., 2018. Parvalbumin loss following chronic sub-anesthetic NMDA antagonist treatment is age-dependent in the Hippocampus: implications for modeling NMDA hypofunction. *Neuroscience* 393, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.09.031>.
- Hou, Y., Zhang, H., Xie, G., Cao, X., Zhao, Y., Liu, Y., Mao, Z., Yang, J., Wu, C., 2013. Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 45, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2013.04.006>.
- Insel, T.R., 2010. Rethinking schizophrenia. *Nature* 468, 187–193. <https://doi.org/10.1038/nature09552>.
- Jeevakumar, V., Driskill, C., Paine, A., Sobhanian, M., Vakili, H., Morris, B., Ramos, J., Kroener, S., 2015. Ketamine administration during the second postnatal week induces enduring schizophrenia-like behavioral symptoms and reduces parvalbumin expression in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Behav. Brain Res.* 282, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.010>.
- Jeevakumar, V., Kroener, S., 2016. Ketamine administration during the second postnatal week alters synaptic properties of fast-spiking interneurons in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Cerebr. Cortex* 26, 1117–1129. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu293>.
- Koh, M.T., Shao, Y., Sherwood, A., Smith, D.R., 2016. Impaired hippocampal-dependent memory and reduced parvalbumin-positive interneurons in a ketamine mouse model of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 171, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.01.023>.
- Lally, J., MacCabe, J.H., 2015. Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br. Med. Bull.* 114, 169–179. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv017>.
- Lavreysen, H., Ahnaou, A., Drinkenburg, W., Langlois, X., Mackie, C., Pype, S., Lütjens, R., Le Poul, E., Trabanco, A.A., Nuñez, J.M.C., 2015. Pharmacological and pharmacokinetic properties of JNJ-40411813, a positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor. *Pharmacol. Res. Perspect.* 3, e00096. <https://doi.org/10.1002/prp2.96>.
- Li, M.L., Hu, X.Q., Li, F., Gao, W.J., 2015. Perspectives on the mGluR2/3 agonists as a therapeutic target for schizophrenia: still promising or a dead end? *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 60, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2015.02.012>.
- Lim, A.L., Taylor, D.A., Malone, D.T., 2012. Consequences of early life MK-801 administration: long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behav. Brain Res.* 227, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.052>.
- Litman, R.E., Smith, M.A., Doherty, J.J., Cross, A., Raines, S., Gertsik, L., Zukin, S.R., 2016. AZD8529, a positive allosteric modulator at the mGluR2 receptor, does not improve symptoms in schizophrenia: a proof of principle study. *Schizophr. Res.* 172, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.02.001>.

- McCarthy, M.M., 2015. Incorporating sex as a variable in preclinical Neuropsychiatric research. *Schizophr. Bull.* 41, 1016–1020. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv077>.
- Maksymetz, J., Moran, S.P., Conn, P.J., 2017. Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Mol. Brain* 10, 15. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0293-z>.
- Metcalfe, C.S., Klein, B.D., Smith, M.D., Ceusters, M., Lavreysen, H., Pype, S., Van Osselaer, N., Twyman, R., White, H.S., 2018. Potent and selective pharmacodynamic synergy between the metabotropic glutamate receptor subtype 2-positive allosteric modulator JNJ-46356479 and levitracetam in the mouse 6-Hz (44-mA) model. *Epilepsia* 59, 724–735. <https://doi.org/10.1111/epi.14005>.
- Millan, M.J., Andrieux, A., Bartzokis, G., Cadenhead, K., Dazzan, P., Fusar-Poli, P., Gallinat, J., Giedd, J., Grayson, D.R., Heinrichs, M., Kahn, R., Krebs, M.-O., Leboyer, M., Lewis, D., Marin, O., Marin, P., Meyer-Lindenberg, A., McGorry, P., McGuire, P., Owen, M.J., Patterson, P., Sawa, A., Spedding, M., Uhlhaas, P., Vaccarino, F., Wahlestedt, C., Weinberger, D., 2016. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 485–515. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.28>.
- Moghaddam, B., Javitt, D., 2012. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* 37, 4–15. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.181>.
- Moreno-Küstner, B., Martín, C., Pastor, L., 2018. Prevalence of psychotic disorders and its association with methodological issues. A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 13, e0195687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195687>.
- Muguruza, C., Meana, J.J., Callado, L.F., 2016. Group II metabotropic glutamate receptors as targets for novel antipsychotic drugs. *Front. Pharmacol.* 7, 130. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00130>.
- Murray, A.J., Woloszynowska-Fraser, M.U., Ansel-Bollepalli, L., Cole, K.L.H., Foggetti, A., Crouch, B., Riedel, G., Wulff, P., 2015. Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. *Sci. Rep.* 5, 16778. <https://doi.org/10.1038/srep16778>.
- Musil, R., Obermeier, M., Russ, P., Hamerle, M., 2015. Weight gain and antipsychotics: a drug safety review. *Expert Opin. Drug Saf.* 14, 73–96. <https://doi.org/10.1517/14740338.2015.974549>.
- Mutlu, O., Gumuslu, E., Ulak, G., Celikyurt, I.K., Kocurk, S., Kir, H.M., Akar, F., Erden, F., 2012. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. *Life Sci.* 91, 1252–1262. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.09.023>.
- Nakatani-Pawlak, A., Yamaguchi, K., Tatsumi, Y., Mizoguchi, H., Yoneda, Y., 2009. Neonatal phencyclidine treatment in mice induces behavioral, histological and neurochemical abnormalities in adulthood. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1576–1583.
- Neill, J.C., Barnes, S., Cook, S., Grayson, B., Idris, N.F., McLean, S.L., Snigdha, S., Rajagopal, L., Harte, M.K., 2010. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol. Ther.* 128, 419–432. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.07.004>.
- Neill, J.C., Harte, M.K., Haddad, P.M., Lydall, E.S., Dwyer, D.M., 2014. Acute and chronic effects of NMDA receptor antagonists in rodents, relevance to negative symptoms of schizophrenia: a translational link to humans. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24, 822–835. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.09.011>.
- Nishizawa, N., Nakao, S., Nagata, A., Hirose, T., Masuzawa, M., Shingu, K., 2000. The effect of ketamine isomers on both mice behavioral responses and c-Fos expression in the posterior cingulate and retrosplenial cortices. *Brain Res.* 857, 188–192.
- Ohishi, H., Neki, A., Mizuno, N., 1998. Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Res.* 30, 65–82.
- Owen, M.J., Sawa, A., Mortensen, P.B., 2016. Schizophrenia. *Lancet (London, England)* 388, 86–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01121-6).
- Phensy, A., Duzdabanian, H.E., Brewer, S., Panjabi, A., Driskill, C., Berz, A., Peng, G., Kroener, S., 2017. Antioxidant treatment with N-acetyl cysteine prevents the development of cognitive and social behavioral deficits that result from perinatal ketamine treatment. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 106. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00106>.
- Pietersen, C.Y., Bosker, F.J., Doorduyn, J., Jongasma, M.E., Postema, F., Haas, J.V., Johnson, M.P., Koch, T., Vladusich, T., den Boer, J.A., 2007. An animal model of emotional blunting in schizophrenia. *PLoS One* 2, e1360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001360>.
- Pinar, N., Akilloglu, K., Sefil, F., Alp, H., Sagir, M., Acet, A., 2015. Effect of clozapine on locomotor activity and anxiety-related behavior in the neonatal mice administered MK-801. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 15, 74–79. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2015.472>.
- Powell, S.B., Sejnowski, T.J., Behrens, M.M., 2012. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. *Neuropharmacology* 62, 1322–1331. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.049>.
- Rossetti, A.C., Paladini, M.S., Colombo, M., Gruca, P., Lason-Tyburkiewicz, M., Tota-Glowczyk, K., Papp, M., Riva, M.A., Molteni, R., 2018. Chronic stress exposure reduces parvalbumin expression in the rat Hippocampus through an imbalance of redox mechanisms: restorative effect of the antipsychotic lurasidone. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 883–893. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy046>.
- Schobel, S.A., Chaudhury, N.H., Khan, U.A., Paniagua, B., Styner, M.A., Asllani, I., Inbar, B.P., Corcoran, C.M., Lieberman, J.A., Moore, H., Small, S.A., 2013. Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver. *Neuron* 78, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.011>.
- Scorza, M.C., Castañé, A., Bortolozzi, A., Artigas, F., 2010. Clozapine does not require 5-HT1A receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801; clz and MK-801 in KO1A mice. *Neuropharmacology* 59, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.012>.
- Snyder, M.A., Gao, W.-J., 2013. NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 31. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00031>.
- Stansley, B.J., Conn, P.J., 2018. The therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulation for schizophrenia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 38, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.02.003>.
- Trabanco, A.A., Bartolomé, J.M., Cid, J.M., 2019. mGluR2 positive allosteric modulators: an updated patent review (2013–2018). *Expert Opin. Ther. Pat.* 29, 497–507. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1637421>.
- Turner, C.P., DeBenedetto, D., Ware, E., Stowe, R., Lee, A., Swanson, J., Walburg, C., Lambert, A., Lyle, M., Desai, P., Liu, C., 2010. Postnatal exposure to MK801 induces selective changes in GAD67 or parvalbumin. *Exp. Brain Res.* 201, 479–488. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-2059-z>.
- Uno, Y., Coyle, J.T., 2019. Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatr. Clin. Neurosci.* 73, 204–215. <https://doi.org/10.1111/pcn.12823>.
- van Erp, T.G.M., Hibar, D.P., Rasmussen, J.M., Glahn, D.C., Pearlson, G.D., Andreassen, O.A., Agartz, I., Westlye, L.T., Haukvik, U.K., Dale, A.M., Melle, I., Hartberg, C.B., Gruber, O., Kraemer, B., Zilles, D., Donohoe, G., Kelly, S., McDonald, C., Morris, D.W., Cannon, D.M., Corvin, A., Machielsen, M.W.J., Koenders, L., de Haan, L., Veltman, D.J., Satterthwaite, T.D., Wolf, D.H., Gur, R.C., Gur, R.E., Potkin, S.G., Mathalon, D.H., Mueller, B.A., Preda, A., Macciardi, F., Ehrlich, S., Walton, E., Hass, J., Calhoun, V.D., Bockholt, H.J., Sponheim, S.R., Shoemaker, J.M., van Haren, N.E.M., Hulshoff Pol, H.E., Pol, H.E.H., Ophoff, R.A., Kahn, R.S., Roiz-Santiañez, R., Crespo-Facorro, B., Wang, L., Alpert, K.I., Jönsson, E.G., Dimitrova, R., Bois, C., Whalley, H.C., McIntosh, A.M., Lawrie, S.M., Hashimoto, R., Thompson, P.M., Turner, J.A., 2016. Subcortical brain volume abnormalities in 2028 individuals with schizophrenia and 2540 healthy controls via the ENIGMA consortium. *Mol. Psychiatry* 21, 547–553. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.63>.
- Wang, C.Z., Yang, S.F., Xia, Y., Johnson, K.M., 2008. Postnatal phencyclidine administration selectively reduces adult cortical parvalbumin-containing interneurons. *Neuropsychopharmacology* 33, 2442–2455. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301647>.
- Wierońska, J.M., Zorn, S.H., Doller, D., Pilc, A., 2016. Metabotropic glutamate receptors as targets for new antipsychotic drugs: historical perspective and critical comparative assessment. *Pharmacol. Ther.* 157, 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.10.007>.
- Wright, R.A., Johnson, B.G., Zhang, C., Salhoff, C., Kingston, A.E., Calligaro, D.O., Monn, J.A., Schoepp, D.D., Marek, G.J., 2013. CNS distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors: transgenic mice and [³H]LY459477 autoradiography. *Neuropharmacology* 66, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.019>.
- Yuede, C.M., Wozniak, D.F., Creeley, C.E., Taylor, G.T., Olney, J.W., Farber, N.B., 2010. Behavioral consequences of NMDA antagonist-induced Neuroapoptosis in the infant mouse brain. *PLoS One* 5, e11374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011374>.
- Zhang, Z.J., Reynolds, G.P., 2002. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 55, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(01\)00188-8](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(01)00188-8).
- Zou, D., Chen, L., Deng, D., Jiang, D., Dong, F., McSweeney, C., Zhou, Y., Liu, L., Chen, G., Wu, Y., Mao, Y., 2016. DREADD in parvalbumin interneurons of the dentate gyrus modulates anxiety, social interaction and memory extinction. *Curr. Mol. Med.* 16, 91–102.

Supplemental Methods

Animals and drug treatment

Four C57BL/6J male and female mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) at 6 weeks of age. They were acclimated for at least ten days in the animal house of the Faculty of Medicine at the University of Barcelona and were later put to breed in pairs. Mice were housed at 22°C with ad libitum access to food and drink in an alternating 12-hour light and dark cycle.

In the present study, pups of both sexes were exposed on PND 7, 9, and 11 with subcutaneous (≈ 0.1 mL, 25G needle) injections of vehicle (saline) or ketamine (30 mg/kg) (Powell et al., 2012). Ketamine (Ketamidor 100 mg/ml, Karizoo, Barcelona, Spain) was suspended in saline. After weaning, they were housed in groups of three and identified by ear punching. Once they reached the age of 80 days, they were treated subcutaneously (≈ 0.25 mL, 25G needle) with vehicle (10% hydroxypropyl-beta- cyclodextrin, HP β CD) or the drug JNJ-46356479 (10 mg/kg/day) (Janssen Research and Development, Spain) daily for 8 weeks. A 40% HP β CD preparation was used to prepare the JNJ-46356479 stock solution. The compound was stirred on a heated plate (~ 70 °C) until dissolution and pH was adjusted to 4. Sterile water was added to the final solution so that the final concentration of the dosing solution also contained 10% HP β CD. Typically, dosing solutions were freshly prepared on the day of testing. In order to calculate the dosage to administer, all animals were weighed once a week during the treatment in adulthood. No weight differences between groups were observed (see Supplementary Figure S1).

Behavioral Experiments

Motor assessment

The motor test battery was performed following the procedure described by García-Cerro et al. (García-Cerro et al., 2014) and included the subsequent tests:

- a) The visual placing reflex test was used to evaluate cerebellar and vestibular functions. In three consecutive trials, mice were gently lowered by the tail toward a flat surface from a height of 15 cm. The forepaw extension response was scored on a scale of 0–4 (4: animal extends the forepaws when placed at the highest height; 3: forepaws extended before touching the surface with vibrissae; 2: forepaws extended after vibrissae touched the surface; 1: forepaws extended after the nose touched the surface; and 0: no extension).
- b) To evaluate auditory sensitivity, we measured the startle response to a sudden auditory stimulus. Mice were placed facing the wall of an unfamiliar cage and the auditory stimulus was generated by clapping two stainless steel forceps together (7 cm long). A score (0–3 points) was assigned based on the magnitude of the startle response: jumping more than 1 cm (3 points); jumping <1 cm (2 points); retracting the ears (Preyer reflex, 1 point); or no response (0 points).
- c) For the righting reflex test, mice were held supine and dropped from a height of 10 cm onto a foam cushion. This was scored on a scale of 0–3 (3: animal lands on its feet; 2: animal lands on its side; 1: animal lands on its back; 0 animal lands on its back and stays there).
- d) Grip strength was assessed by quantifying resistance to separation from a lid of aluminum bars (2 mm) when pulled by the tail (0: no resistance; 1: slight; 2: moderate; 3: active; and 4: extremely active resistance).

-
- e) To evaluate equilibrium, four 20 s trials of balance were performed on an elevated (40 cm high), horizontal (50 cm long) rod. Trials 1 and 2 were performed on a flat wooden rod (9 mm wide); trials 3 and 4 were performed on a cylindrical aluminum rod (1 cm diameter). In each trial, the animals were placed in a marked central zone (10 cm) on the elevated rod. The latency to fall from the rod was measured in four 20 s trials. A score of 0 was assigned if the animal fell within 20 s; 1 if it remained within the central zone for 20 s; 2 if it left the central zone; and 3 if it reached one of the ends of the bar.
- f) Prehensile reflex (three 5 s trials) was measured as the animal's ability to remain suspended by the forepaws by grasping an elevated horizontal wire (2 mm in diameter). The maximum possible score was achieved when the animal remained suspended by the forepaws in all three trials (one point per trial). Traction capacity was simultaneously scored by assessing the number of hind limbs that the animal raised to reach the wire (0: none; 1: one limb; and 2: two limbs).
- g) Motor coordination was also assayed with the coat hanger test. The mice were placed in the middle of the wire in an upside-down position. Latency to fall, latency to reach the end of the coat hanger and the activity performed on the wire (learning as the number of crossings) were measured in a single trial lasting 60 s.

Motor coordinator was evaluated using a rotarod device (Ugo Basile, Comerio, Italy), consisting of a 37 cm long, 3 cm diameter plastic rod that rotates at different speeds. In a single session, 4 trials with a maximum duration of 60 s each were performed. In the first three tests, the rod was rotated at constant speeds of 10, 25, and 40 rpm, respectively. The last trial consisted of an acceleration cycle in which the rod rotated progressively faster, and the animal had to adapt to the growing demands of the test. The length of time that each animal remained on the rotarod during the acceleration cycle was recorded.

The open field test was performed to assess locomotor activity, exploratory behavior, and anxiety using a square-shaped open field (55 × 55 cm, surrounded by a 25 cm-tall fence). Animals were placed in the center of the field and allowed to explore it freely during a single 5 min trial. The number of vertical (rearing), and grooming (a typical behavior related to stress) activities and the distance traveled (from square to square, subdivided into center vs periphery) was measured using Smart 3.0 video tracking software (Panlab, Barcelona, Spain) to record each parameter automatically.

Y-maze test

A Y-shaped maze with three identical white plexiglass arms (30 × 10 × 12 cm) positioned at a 120° angle from each other was placed in the center of a dimly illuminated room (30 lm) with cues located on the walls of the room to allow visual orientation. The spatial working memory task was assayed modifying the methods previously described by Rompala et al. (Rompala et al., 2013). In a 10 min exploration trial, one arm was blocked with plexiglass. After an interval of 15 s, while the animal remained in its home cage, the plexiglass divider was removed and the animal was then allowed to explore the three arms for 3 min. The time spent inside the new and familiar arms was recorded. For the test phase, a ratio index, (time in novel arm – time in familiar arm)/180 seconds, was estimated to measure spatial working memory. Y-maze tasks were recorded using a webcam mounted above the maze and evaluated by Smart 3.0 video tracking.

To evaluate the spontaneous alternation task, mice were previously habituated to being placed at the start site (a camera sited at first of one of the three arms) for 20 s. Next, mice were allowed to choose one arm freely. After the arm decision, the selected arm was blocked and mice were allowed to explore this arm for 25 s. Then, mice were again placed at the start site, the blocked arm was opened and selection of the new arm was assayed. This procedure was repeated 3 times with an inter-trial time of 5 min. Arm choices were manually recorded. The percentage of alternation was determined by dividing the total number of alternations by

the total number of choices. The memory component in this task is that the mouse must remember which arm it has visited most recently in order to alternate.

Three-Chamber sociability and social novelty test

The social recognition paradigm was adapted from (Moy et al., 2004). The social testing apparatus was a rectangular, three-chambered box. Each chamber measured 40 cm long x 20 cm wide x 20 cm high, and each compartment had a door to open or close the area depending on the part of the experiment. The animals were habituated for 10 min by allowing them to move freely in all empty areas (with cages) for 2 sessions (one per day) before starting experiment.

In the sociability test phase, mice were first placed in the middle chamber and allowed to explore for 5 min. The doorways into the two side chambers were obstructed by plastic boxes during this habituation phase. After the habituation period, the doors of the center area were opened and the animal was exposed for 10 min to one compartment containing a familiar littermate inside a cage (social side) and to another compartment with a toy mouse also placed inside a cage (non-social side). Social investigation was measured for 10 min while the animal sniffed each cage (i.e., when the animal's nose was facing the compartment at no more than 2 cm distance). Animals expressing normal sociability would be expected to spend a greater amount of time sniffing the cage containing the familiar littermate than the compartment containing the object.

The mice were removed from the three-chamber apparatus and placed in their home cage for 10 min before conducting the next test. In the social novelty test, the mice were assessed on their preference for social novelty. A stimulus animal from a different litter was placed into one compartment and a littermate (different from the animal used in the sociability test) was placed into the other compartment. As in the test for sociability, investigation of each compartment was defined as time spent sniffing each cage. An animal expressing a normal preference for social novelty would spend a greater amount of time sniffing the compartment containing the animal from a different litter (novel) than the compartment

containing the littermate (familiar). The score for social novelty was calculated as the difference between the time spent investigating the compartment containing the novel animal and that spent investigating the familiar littermate.

In both sociability and novelty recognition assays, the stimulus animal was placed in alternating compartments, counterbalancing left and right placement to avoid spontaneous preferences. In addition, the apparatus was cleaned with 70% ethanol after each test. All tests were recorded with a webcam and the interaction time was measured both manually and with Smart 3.0 automatic video tracking.

Five Trial Social Memory Test

Experimental mice and two stimulus mice per group (to avoid sexual preferences, naïve individuals were used, aged about 2-3 weeks old) were housed individually in their home cages for at least 24 h prior to experimentation. On the day of testing, a stimulus mouse (intruder) was placed inside a cage and then introduced into the experimental animal's home cage 4 consecutive times, with each exposure lasting 1 min. Between exposures, the intruder was returned to its home cage for 10 min. Ten minutes after the fourth exposure, a novel stimulus mouse was introduced into the experimental animal's home cage for 1 min. All sessions were video-recorded and interaction times (defined as sniffing and investigating at close proximity) were scored offline.

Contextual Fear Conditioning and extinction

Mice were single-caged for three consecutive days before fear conditioning. On the training day, mice were placed into the chamber (Coulbourn Instruments) with cues and allowed to freely explore for a 3 min acclimation period. Then, each mouse received three paired trials (context-shock) with a 25–40 min inter-trial interval. Each trial took 80 s (footshock at 38 s; 2 s, 0.6mA). After each trial, mice were returned to the home cage. Freezing was measured manually and scored as the percentage of total possible observations

(sampled once every 5 s during conditioning) in which the animal was motionless except for respiration for at least 1 s. Twenty-four hours later, contextual learning was evaluated. The mice were re-exposed to the chamber in a similar context to the previous day in the absence of a shock for 10 min. Freezing was scored manually every 30 s by an observer blind to condition and converted to a percentage. On the following four days, extinction learning was measured. In this case, mice were re-exposed to the context in the same context as the training day without any shock for 10 min in four independent sessions (once per consecutive days). Freezing was scored manually every 30 s and also converted to a percentage. The chamber was cleaned with 1% acetic acid between mice.

Supplementary References:

- García-Cerro, S., Martínez, P., Vidal, V., Corrales, A., Flórez, J., Vidal, R., Rueda, N., Arbonés, M.L., Martínez-Cué, C., 2014. Overexpression of Dyrk1A Is Implicated in Several Cognitive, Electrophysiological and Neuromorphological Alterations Found in a Mouse Model of Down Syndrome. *PLoS One* 9, e106572.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106572>
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., Crawley, J.N., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav.* 3, 287–302.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Powell, S.B., Sejnowski, T.J., Behrens, M.M., 2012. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. *Neuropharmacology* 62, 1322–1331.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.049>
- Rompala, G.R., Zsiros, V., Zhang, S., Kolata, S.M., Nakazawa, K., 2013. Contribution of NMDA receptor hypofunction in prefrontal and cortical excitatory neurons to schizophrenia-like phenotypes. *PLoS One* 8, e61278.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061278>

Supplementary Data

Supplementary Table 1. List of antibodies used for immunohistochemistry

Primary Antibody	Dilution	Source
Rabbit polyclonal anti-parvalbumin	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Guinea pig polyclonal anti-c-Fos	1:500	Synaptic Systems, Göttingen, Germany
Secondary Antibody		
Anti-rabbit Alexa Fluor-594-conjugated	1:1.000	Life Technologies, Eugene, OR, USA
Anti-guinea pig Alexa Fluor-488-conjugated	1:1.000	Life Technologies, Eugene, OR, USA
Nuclei detection		
496-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	1:1000	Calbiochem, Billerica, MA, USA

Supplementary Table 2. Motor test battery (mean scores \pm SEM)

	Veh + Veh	Veh + JNJ	Ket + Veh	Ket + JNJ	Hypothesis Contrast
Visual placing reflex	2.23 \pm 0.34	2.27 \pm 0.38	2.00 \pm 0.26	2.46 \pm 0.33	p=0.744
Auditory startle	1.38 \pm 0.14	1.45 \pm 0.16	0.93 \pm 0.21	1.15 \pm 0.19	p=0.237
Righting reflex	2.85 \pm 0.15	2.36 \pm 0.36	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	p=0.042
Grip strength	2.46 \pm 0.27	2.18 \pm 0.40	2.20 \pm 0.31	2.31 \pm 0.26	p=0.843
Equilibrium wooden bar	2.50 \pm 0.19	2.50 \pm 0.17	2.36 \pm 0.13	2.57 \pm 0.17	p=0.603
Latency to fall wooden bar	40.00 \pm 0.00	40.00 \pm 0.00	40.00 \pm 0.00	40.00 \pm 0.00	p=1.000
Equilibrium aluminium bar	1.96 \pm 0.28	2.1 \pm 0.22	2.26 \pm 0.17	2.23 \pm 0.20	p=0.891
Latency to fall aluminium bar	29.77 \pm 3.33	33.81 \pm 2.49	35.80 \pm 1.43	35.07 \pm 1.88	p=0,500
Prehensile reflex	2.6 \pm 0.21	1.90 \pm 0.34	2.73 \pm 0.11	2.53 \pm 0.24	p=0.186
Traction capacity	4.77 \pm 0.80	3.27 \pm 0.71	6.13 \pm 0.69	4.00 \pm 0.72	p=0.104
Latency to fall coat hanger	56.69 \pm 2.27	41.36 \pm 7.91	43.00 \pm 6.55	50.23 \pm 5.23	p=0.398
Number of crossings coat hanger	3.07 \pm 0,44	2.00 \pm 0.17	2.80 \pm 0.59	2.53 \pm 0.40	p=0.170
Latency of arrival coat hanger	16.61 \pm 2.92	17.72 \pm 4.48	16.66 \pm 3.46	15.46 \pm 3.52	p=0.876

Supplementary Figure

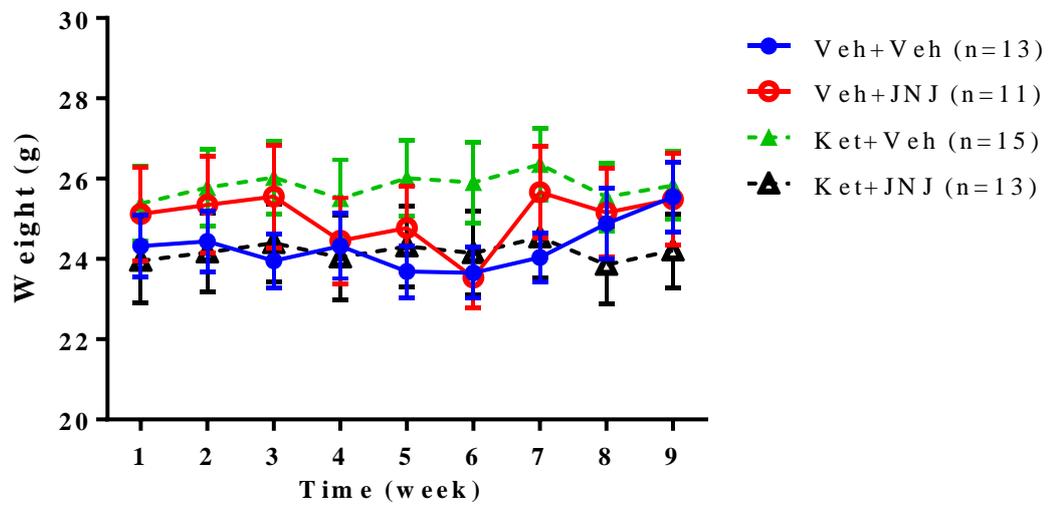


Figure S1: Body weight. Results are shown as mean \pm SEM

4.2.3. Estudio in vivo: modelo animal tratado en una etapa precoz (Estudio 4)

Martínez-Pinteño A*, Rodríguez N*, Madero S, Gómez M, Prohens L, García-Rizo C, Mas S, Consanza M, Parellada E, Gassó P. **Early treatment with JNJ-46356479, a mGluR2 modulator, improves social and cognitive deficits in a postnatal ketamine mice model of schizophrenia.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* (En revisión).

En el presente estudio se evaluó la eficacia del tratamiento precoz con JNJ, en comparación con clozapina, en revertir los efectos conductuales en un modelo animal de esquizofrenia utilizando ketamina postnatal. Para ello se analizaron 6 grupos experimentales: control, JNJ, clozapina, ketamina, ketamina + JNJ y ketamina + clozapina.

La evaluación motora en la adultez no mostró diferencias significativas entre los grupos para la mayoría de las pruebas realizadas. No obstante, los ratones tratados con clozapina mostraron una menor resistencia en la fuerza de agarre en comparación con el grupo control ($p = 0,002$). Del mismo modo, en la prueba del reflejo prensil y capacidad de tracción, los ratones expuestos a ketamina, mostraron una menor capacidad para permanecer agarrados a una varilla en comparación con el grupo control ($p = 0,002$ y $p = 0,025$, respectivamente). Los resultados de coordinación motora y equilibrio medidos con el rotarod mostraron que los seis grupos de tratamiento tuvieron latencias en la caída similares a las diferentes velocidades (10, 25 y 40 rpm). Sin embargo, en el ensayo con aceleración progresiva continua, los ratones tratados con JNJ mostraron una reducción significativa de la latencia a la caída en comparación con el grupo control ($p = 0,004$). En el test del campo abierto, la actividad general fue parecida en todos los grupos. Los ratones recorrieron una distancia total similar y pasaron mayor tiempo en la periferia que en el centro del campo abierto, sin mostrar diferencias entre los grupos de tratamiento.

En la evaluación conductual, no se encontraron diferencias significativas en las tareas del laberinto en Y. En la tarea de reconocimiento de objeto nuevo, los ratones

pasaron el doble de tiempo investigando el objeto nuevo en comparación con el familiar ($8,3 \pm 0,6$ vs. $16,3 \pm 1,5$ segundos, $p = 8,6 \times 10^{-9}$). El análisis de los resultados por grupo de tratamiento mostró que los ratones del grupo control, JNJ y clozapina estuvieron significativamente más tiempo investigando el objeto nuevo que el viejo ($p = 0,042$; $p = 6,6 \times 10^{-4}$; $p = 4,3 \times 10^{-4}$, respectivamente). Sin embargo, los ratones expuestos a ketamina no mostraron esta preferencia por el objeto nuevo. Esta preferencia se vio recuperada en los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ ($p = 0,013$), pero no en el grupo expuesto a ketamina y tratado con clozapina.

En la prueba de las tres cámaras, todos los ratones demostraron una preferencia significativa por pasar el tiempo oliendo a un compañero de camada en lugar de un ratón de juguete (control, $p = 0,002$; JNJ, $p = 0,009$, clozapina, $p = 1 \times 10^{-4}$; ketamina, $p = 7 \times 10^{-4}$; ketamina + JNJ, $p = 3 \times 10^{-4}$ y ketamina + clozapina, $p = 1 \times 10^{-4}$, respectivamente). Cuando la elección fue entre un ratón familiar o un ratón no familiar, los ratones expuestos a ketamina no mostraron preferencia significativa por la novedad social. Esta preferencia se vio recuperada en los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ ($p = 6 \times 10^{-4}$), pero no en los ratones expuestos a ketamina y tratados con clozapina. En la prueba de las cinco exposiciones, en el quinto ensayo, cuando se presentó un ratón novedoso, el grupo ketamina fue el único que no aumentó significativamente el tiempo de interacción, por lo que el tratamiento de estos animales tanto con JNJ como con clozapina permitió recuperar el interés por el ratón desconocido.

Early treatment with JNJ-46356479, a mGluR2 modulator, improves social and cognitive deficits in a postnatal ketamine mice model of schizophrenia.

Martínez-Pinteño, A^{1†}, Rodríguez, N^{1,3†}, Madero, S², Gómez, M^{2,4}, Prohens, L¹, García-Rizo, C^{2,3,4}, Mas, S^{1,3,4}, Constanza, M^{2,5}, Parellada, E^{2,3,4*}, Gassó, P^{1,3,4*}.

¹Dept. of Basic Clinical Practice, University of Barcelona, Spain.

²Barcelona Clínic Schizophrenia Unit (BCSU), Dpt. of Psychiatry, Institute of Neuroscience, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Spain.

³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain.

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain.

†These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

***Corresponding author:** Patricia Gassó

Dept. Basic Clinical Practice, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERSAM.

Casanova 143, E-08036 Barcelona (Spain).

E-mail: pgasso@ub.edu

***Corresponding author:** Eduard Parellada

Barcelona Clínic Schizophrenia Unit (BCSU). Institute of Neuroscience, Hospital

Clínic of Barcelona, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERSAM.

Villarroel 170, E-08036 Barcelona (Spain).

E-mail: eparella@clinic.cat

ABSTRACT

Glutamatergic dysregulation is one of the main pathophysiological theories of schizophrenia (SZ). Given this, positive allosteric modulators of the presynaptic metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2), such as JNJ-46356479 (JNJ), could theoretically mitigate the hypothetical glutamate storm during the early stages of SZ. This could be especially effective in treating cognitive and negative symptoms, which are not improved by current antipsychotics. We evaluated the efficacy of early treatment with JNJ or clozapine (CLZ) in reversing behavioral deficits induced in a postnatal ketamine (KET) mice model of SZ. Mice exposed to KET on postnatal days (PND) 7, 9, and 11 received JNJ or CLZ daily in the adolescent period (PND 35-60). A wide range of behavioral tests were performed in adult animals (PND >90) to evaluate their cognition and sociability as well as their locomotor activity and anxiety-related behavior. Mice exposed to KET showed the expected preference for a novel object, which they recovered with JNJ treatment. Similarly, the KET group showed no preference for social novelty when choosing between familiar and unfamiliar conspecific littermates, which was recovered in the KET+JNJ group. After four trials of exposure to the same mouse, control mice showed increased interaction time when presented with a novel mouse in the fifth trial, but the KET group did not show this expected dishabituation. Interestingly, mice exposed to KET and treated with JNJ or CLZ recovered an interest in the novel animal. Our results provide evidence that pharmacological treatment with JNJ-46356479 in early stages could help improve the cognitive and negative symptoms related to SZ, even producing a superior response to CLZ treatment. This could have relevant clinical translational applications since early treatment with mGluR2 modulators that inhibit glutamate release at the onset of critical phases of SZ could prevent or slow clinical deterioration of the disease.

1. INTRODUCTION

Schizophrenia (SZ) is a common and heterogeneous psychiatric disorder that affects approximately 1% of the population worldwide and whose etiopathogenesis remains poorly understood (Marder and Cannon, 2019; Owen et al., 2016). Pharmacological treatment for SZ relies on the use of antipsychotics, which have proven effectiveness for the control of positive symptoms through complex mechanisms that include the blockade of dopamine and serotonin receptors, among others. However, these antipsychotics show a lack of efficacy in treating the associated negative symptoms and cognitive deficits, a limitation that strongly hampers the prognosis and quality of life of patients (Goff, 2021). Only clozapine (CLZ) has demonstrated superior antipsychotic efficacy, though despite showing an apparently greater improvement for negative symptoms, it has no clear benefits for cognitive performance (Keefe et al., 2007; Nucifora et al., 2017). Moreover, the ability of CLZ to induce agranulocytosis, a potentially fatal side effect, limits its use of this antipsychotic in many cases. Therefore, it is necessary to investigate other molecules with different mechanisms of action in order to improve the pharmacological treatment of this disorder.

Glutamatergic dysregulation is one of the main pathophysiological theories of SZ. This theory arose from observations that N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor antagonists, such as ketamine (KET), phencyclidine (PCP), or dizocilpine (MK-801), can not only mimic the positive, negative, and cognitive symptoms of SZ in healthy individuals but also exacerbate the psychotic symptoms and cognitive decline in patients with the disease (Lewis and Moghaddam, 2006; Uno and Coyle, 2019). The blockade of NMDA receptors in gamma-aminobutyric (GABA)ergic interneurons may generate a hyperglutamatergic condition because of decreased inhibitory control of excitatory pyramidal neurons, leading to neurotoxicity, apoptosis, and synaptic pruning in critical brain areas (Parellada and Gassó, 2021; Yuede et al., 2010).

In this scenario, glutamate inhibitors could offer a pharmacological strategy to treat negative and cognitive symptoms that need to be investigated. Positive allosteric modulators (PAMs) of metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2) inhibit the presynaptic release of glutamate. We have particular interest in assessing 8-trifluoromethyl-3-cyclopropylmethyl-7-[(4-(4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl)methyl)-1,2,4-triazolo [4,3- α]pyridine (JNJ-46356479; henceforth JNJ), a new selective and orally bioavailable PAM of mGluR2 (Cid et al., 2016; Li et al., 2015). *In vitro*, JNJ has a neuroprotective effect in human neuroblastoma cultures (Gassó et al., 2022), while *in vivo*, JNJ pharmacological treatment in adult postnatal KET mice partially improves neuropathological deficits and SZ-like behavior (Martínez-Pinteño et al., 2020). However, other mGluR2 PAMs, such as LY2140023 (Gruber et al., 2014) or JNJ40411813 (Cid et al., 2014; Lavreysen et al., 2015a, 2015b) have failed to treat cases of established SZ (Li et al., 2015). Based on this, it could be helpful to investigate their possible benefits when used during early critical periods, such as the prodromal stage or during the transition to psychosis. Indeed, dealing with the hypothetical glutamate storm during early stages of SZ may help to prevent disease onset or slow psychosis progression and clinical deterioration of patients (Millan et al., 2016; Schobel et al., 2013).

We aimed to evaluate the efficacy of early treatment with JNJ-46356479 in reversing behavioral deficits induced in a postnatal KET mice model of SZ. Animals were exposed to KET on postnatal days (PND) 7, 9, and 11 (Jeevakumar et al., 2015; Martínez-Pinteño et al., 2020; Powell et al., 2012) to transiently disrupt NMDA receptor function, and were subsequently treated with JNJ or CLZ in the adolescent period (PND 35-60). A wide range of behavioral tests were performed in adult animals (PND >90) to evaluate the cognitive and negative symptoms related to SZ and to assess the locomotor activity and anxiety-related behavior of these animals.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals and drug treatment

All experimental procedures involving animals were performed according to European Union guidelines on the care and use of laboratory animals and were approved by the University of Barcelona Animal Care Committee and by the Department of the Environment of the Generalitat de Catalunya.

Male and female C57BL/6J mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) were acclimated in the animal house of the Faculty of Medicine, University of Barcelona, and later put to breed in pairs. Mice were housed at 22°C with ad libitum access to food and drink in an alternating 12-hour light and dark cycle. A total of 73 male and female pups were exposed on PND 7, 9, and 11 with subcutaneous injections of saline vehicle (Veh: approximately 0.1 mL, 25 gage needle) (N = 37) or ketamine (30 mg/kg, Ketamidol 100 mg/ml, Karizoo, Barcelona, Spain) (N = 36), as previously described (Martínez-Pinteño et al., 2020). Then, adolescent mice (PND 35-60) received daily subcutaneous injections (approximately 0.25 mL, 25 gage needle) of vehicle (10% hydroxypropyl-beta- cyclodextrin, HP β CD, and 5% DMSO; N = 24), JNJ (10 mg/kg; N = 24), or CLZ (N = 25). In adulthood (PND >90), mice in each experimental group underwent a wide range of tests to evaluate cognitive and negative behaviors related to SZ and to assess locomotor activity and anxiety-related behavior. Mice were sex-matched in each of the following groups: Control (Veh+Veh, N = 12); JNJ (Veh+JNJ, N = 12); CLZ (Veh+CLZ, N = 13); KET (KET+Veh, N = 12); KET+JNJ (N = 12) and KET+CLZ (N = 12).

2.2. Behavioral experiments

Adult mice (PND >90) underwent behavioral tests in the following order: motor test battery, rotarod test, open field test, Y-maze, Novel Object Recognition test, Three-

chamber sociability and novelty test, and Five-trial social memory test. To minimize potential altered behavioral responses due to prior test history, the most invasive procedures were performed last. Most experimental details have been previously described by our group (Martínez-Pinteño et al., 2020).

2.2.1 Motor assessment

Motor function, motor coordination, and general activity and anxiety were evaluated using a motor test battery, a rotarod test, and the open field test, respectively.

The motor test battery included the following: (1) visual placing reflex to evaluate cerebellar and vestibular functions by evaluating forepaw extension response after gently lowering mice by the tail toward a flat surface; (2) startle response to a sudden auditory stimulus to evaluate auditory sensitivity; (3) righting reflex after dropping mice from a height and assessing how they land; (4) grip strength by quantifying resistance to separation from a lid of aluminum bars when pulled by the tail; (5) equilibrium by quantifying the capacity of the animal placed on the center of a rod (flat wooden and cylindrical aluminum rod) to reach one of its ends, as well as by measuring the latency to fall from these bars; (6) prehensile reflex and traction capacity by assessing their ability to remain suspended by the forepaws when grasping an elevated horizontal wire and assessing the number of hind limbs that the animal raised to reach the wire; and (7) motor coordination with the coat hanger test, placing mice in the middle of a wire in an upside-down position and measuring their activity on the wire and the latency to reach the end of the coat hanger.

Motor coordination was evaluated using a rotarod device (Ugo Basile, Comerio, Italy). In the first three tests, the rod was rotated at constant speeds of 10, 25, and 40 revolutions per minute (rpm), respectively. The last trial consisted of an acceleration cycle

in which the rod rotated progressively faster, requiring that the animal adapted to the growing demands of the test.

Finally, the open field test was performed to assess locomotor activity, exploratory behavior, and anxiety using a square-shaped open field. Animals were placed in the center of the field and allowed to explore it freely during a single 5 min trial. We measured (1) total distance traveled, (2) time spent at the periphery and center of the apparatus, (3) mean walking speed, and (4) the number of rearings (vertical activity), using Smart 3.0 video tracking software (Panlab, Barcelona, Spain) to record each parameter automatically.

2.2.2 *Y-maze*

The spatial working memory task was conducted in a Y-shaped maze. First, mice were allowed 10 min exploration with one arm blocked, and after an interval of 15 s, they were allowed to explore all three arms for 3 min without a plexiglass divider. The times spent inside the novel and familiar arms were recorded.

To evaluate spontaneous alternation, mice were first placed at the start site for 20 s and then freely allowed to choose one arm that was blocked allowing exploration for 25 s. Then, mice were placed at the start site again, the blocked arm was opened, and selection of the new arm was recorded. This procedure was repeated three times with an inter-trial time of 5 min.

2.2.3 *Novel Object Recognition test*

The novel object recognition test was also used to assess the working memory. We used procedures modified of Korotkova et al. (2010). Briefly, mice were individually habituated to an open field box (45 x 45 x 50 cm) with white walls for 2 days (5 min every day). During the training session on the third day, a couple of identical objects were

placed in the open field and the mouse was allowed to explore for two trials of 5 min each and the time spent exploring each object was recorded. After a 5 min delay, the mouse was placed back into the same box where one of the familiar objects was replaced by a novel object, and the mouse was allowed to explore freely for 5 min. To avoid spontaneous object preference, objects were presented in a counterbalanced order and cleaned with ethanol between every trial to prevent odor cues. All presented objects were of similar surface structure and size (approximately 10 cm) but had distinctive shapes and colors. All sessions were video recorded and interaction times (defined as sniffing and investigating at close proximity) were scored offline.

2.2.4 Three-chamber sociability and social novelty test

The social recognition paradigm was conducted in a three-chambered box with a door connecting each compartment. The animals were habituated for 10 min by allowing them to move freely in all empty areas for two sessions (one per day) before starting experiment.

In the sociability test phase, after a habituation period, animals were exposed for 10 min to one compartment containing a familiar littermate inside a cage (social side) and to another compartment with a toy mouse placed inside a cage (non-social side). Social investigation was assessed by measuring how long the animal sniffed each cage. Then, after placing mice in their home cage for 10 min, preference for social novelty was tested. Next, a stimulus animal from a different litter was placed into one compartment and a littermate was placed into the other compartment, and again, we measured how long the mice spent sniffing each cage. In both the sociability and the novelty recognition tests, the stimulus animal was placed in alternating compartments, counterbalancing left and right placement to avoid spontaneous preference. The apparatus was cleaned with 70%

ethanol after each test and all sessions were video recorded for offline scoring of interaction times (defined as sniffing and investigating at close proximity).

2.2.5 Five-trial social memory test

Experimental mice and two stimulus mice per group (naïve, aged about 2-3 weeks old, to avoid sexual preferences) were housed individually in home cages for at least 24 h prior to experimentation. On the day of testing, a stimulus mouse (intruder) was placed inside a cage and introduced into the experimental animal's home cage four consecutive times for 1 min each. Between exposures, the intruder was returned to its home cage for 10 min. A novel stimulus mouse was then introduced for 1 min into the experimental animal's home cage 10 min after the fourth exposure. All sessions were video recorded and interaction times (defined as sniffing and investigating at close proximity) were scored offline.

2.3 Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to analyze the normality of data. Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test according to the data distribution. The mean values for each experimental group were compared using Bonferroni post-hoc tests. We performed intragroup comparisons for the novel object recognition, three-chamber, and five-trial tests using paired Student *t*-test. Mice were sex-matched in each group and no significant sex effect was detected in any evaluation neither including sex as a covariable in the analysis. All analyses were performed using IBM SPSS Version 25.0 for Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA) with a significance level of $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Motor assessment

Regarding the motor test battery, no significant differences were observed between groups for most trials (Supplementary Table 1). Differences were observed in grip strength ($F(5,72) = 5.20$, $p = 0.00043$), with the CLZ group showing less resistance to separation from the lid of bars when pulled by the tail (Bonferroni post-hoc: $p = 0.002$ vs control group). Differences were also observed for the prehensile reflex ($F(5,72) = 4.39$, $p = 0.0016$) and traction capacity ($F(5,72) = 3.81$, $p = 0.0042$) with the KET group being less able to remain suspended on the wire (Bonferroni post-hoc: $p = 0.025$ vs control group) and raising fewer hind limbs to reach the wire after the three trials (Bonferroni post-hoc: $p = 0.006$) (Supplementary Table 1). Animals exposed to KET and treated with JNJ or CLZ recovered the prehensile reflex and traction capacity to that of the control group.

Animals showed similar latency to fall from the rotarod at different constant speeds. Although differences between groups were observed at the maximum speed (40 rpm: $H(5) = 11.53$, $p = 0.042$), pairwise comparisons revealed no significant differences (Figure 1A). During the acceleration cycle, groups presented significant differences ($H(5) = 14.19$, $p = 0.014$). In particular, mice treated with JNJ showed a lower latency to fall (post-hoc comparison: $p = 0.004$ vs control group) (Figure 1B).

All groups displayed similar general activity and anxiety levels in the open field. Mice traveled similar total distances (Figure 2A), spending more time at the apparatus periphery (236.2 ± 5.0 s) than the center (63.8 ± 5.0 s) ($t = 17.31$, $p = 2.3 \times 10^{-27}$) without differences between treatment groups (Figure 2B). Although differences appeared in the average speed ($F(5,72) = 3.21$, $p = 0.012$) and rearing activity ($F(5,72) = 2.41$, $p = 0.046$), significance disappeared after Bonferroni correction (Figure 2C, D).

3.2. Spatial working memory Y-maze test

Animals spent almost three times longer in the novel arm (72.0 ± 2.4 s) than in the familiar arm (26.8 ± 1.5 s) during the 3 min trial after initial exploration ($t = -14.4$, $p = 5.8 \times 10^{-23}$). No differences were found in time spent in the familiar and novel arms between groups (Figure 3A). All treatment groups also showed similar spontaneous alternations of around 80% (Figure 3B).

3.3. Novel Object Recognition (NOR) memory test

Animals spent twice as long exploring the novel object compared to the familiar object (8.3 ± 0.6 vs 16.3 ± 1.5 s; $t = -6.51$, $p = 8.6 \times 10^{-9}$). While controls and mice treated with JNJ or CLZ spent significantly more time exploring the novel object ($t = -2.31$, $p = 0.042$; $t = -4.69$, $p = 0.00066$, $t = -4.80$, $p = 0.00043$; respectively), mice exposed to KET did not show a preference for the novel object, which was recovered by treatment with JNJ ($t = -2.97$, $p = 0.013$) but not CLZ (Figure 4).

3.4. Three-chamber sociability and social novelty test

In the three-chamber test, animals from all groups demonstrated a significant preference for spending time sniffing a familiar littermate rather than a toy mouse (controls: $t = 4.06$, $p = 0.002$; JNJ: $t = 3.18$, $p = 0.009$; CLZ: $t = 5.45$, $p = 0.0001$; KET: $t = 4.62$, $p = 0.0007$; KET+JNJ: $t = 5.18$, $p = 0.0003$; KET+CLZ: $t = 5.89$, $p = 0.0001$; Figure 5A). However, when the choice was between the familiar littermate and an unfamiliar conspecific mouse (Figure 5B), the KET group did not demonstrate a preference for social novelty, which animals exposed to KET and treated with JNJ recovered ($t = -4.71$, $p = 0.0006$), similar to controls ($t = -3.89$, $p = 0.002$) and mice treated with JNJ ($t = -5.75$, $p = 0.00013$) or CLZ ($t = -3.79$, $p = 0.0025$). Mice exposed to KET and treated with CLZ did not show this recovery.

3.5. Five-trial social memory test

Mice were evaluated for their social recognition abilities in the five-trial test (Figure 6). Differences between groups were observed in some trials (Trial 1: $F_{(5,72)} = 7.69$, $p = 9 \times 10^{-6}$; Trial 3: $F_{(5,72)} = 2.70$, $p = 0.028$; Trial 5: $F_{(5,72)} = 3.90$, $p = 0.004$). However, after Bonferroni post-hoc correction, only mice treated with CLZ in trial 1 (CLZ: $p = 0.015$) and trial 5 (CLZ and KET+CLZ: $p = 0.005$) showed significant differences, spending significantly less time investigating the mouse compared with controls.

Animals from the same treatment group spent similar or reduced times in the four first trials, when exposed to the same mouse. Even the JNJ group showed a proportional reduction ($r^2 = 0.99$) in time exploring the animal (18.0 ± 1.2 s, 13.8 ± 1.6 s, 10.2 ± 1.3 s and 7.5 ± 1.3 s in the trials 1, 2, 3, and 4, respectively; $F_{(3,47)} = 11.35$, $p = 1.2 \times 10^{-5}$; Bonferroni post-hoc correction: Trial 1 vs 3: $p = 0.001$, trial 1 vs 4: $p = 1 \times 10^{-5}$; trial 2 vs 4: $p = 0.013$).

After four trials of exposure to the same mouse, the control group as well as those animals treated with JNJ or CLZ showed increased interaction times when presented with the novel mouse in the fifth trial ($t = -3.65$, $p = 0.001$; $t = -5.86$, $p = 7 \times 10^{-7}$; $t = -2.47$, $p = 0.023$; respectively). This expected dishabituation was not shown in the KET group. Interestingly, when mice were exposed to KET and treated with JNJ or CLZ, they recovered an interest in the novel animal ($t = -2.66$, $p = 0.014$; $t = -2.48$, $p = 0.021$; respectively).

4. DISCUSSION

In this study, we explored the effect of pharmacological treatment with JNJ or CLZ during adolescence in reversing the behavioral deficits induced in a postnatal KET mice model of SZ. The results showed that both cognitive and social impairments experienced by the adult animals can be mitigated by the JNJ treatment, more so than CLZ treatment, performed during early stages of development.

Animal exposure to NMDA receptor antagonists, such as KET, PCP, and MK-801, has been used to induce different models of SZ in rodents (Cadinu et al., 2018; Powell et al., 2012). Neonatal mice exposure to NMDA receptor antagonism can induce differential cognitive impairments during adulthood depending on the temporal window of drug exposure. Disturbing brain development during the early postnatal period (PND 7–11), compared to later, seems to affect the function of both the prefrontal cortex and hippocampus during adulthood, resulting in altered cognitive and social performance across a range of behavioral tasks (Plataki et al., 2021). The postnatal mice model used exposures animals to KET on PND 7, 9, and 11 (Jeevakumar et al., 2015) to transiently disrupt NMDA receptor function, which shows persistent changes in parvalbumin GABAergic interneurons and induced SZ-like behavioral symptoms in adulthood, as we have recently reported (Martínez-Pinteño et al., 2020). In the present study, animals exposed to postnatal KET also showed impaired memory and social performance in the NOR, three-chamber social novelty, and the five-trial social memory tests, during adulthood. This result increases the body of evidence favoring this animal model for preclinical investigation in SZ.

The main objective of this study was to evaluate if pharmacological treatment during a critical period of neurodevelopment, such as adolescence, could reverse the memory and social deficits induced by our mice model in adult animals. Notably, JNJ

treatment mitigated these deficits, with treated mice recovering the preference for exploring the novel object in the NOR test, for sniffing a familiar littermate rather than a toy in the three-chamber social novelty test, and for exploring an unfamiliar conspecific mouse rather than a familiar littermate in the five-trial test. These results are consistent with previous results of our group showing that JNJ treatment during adulthood can also reverse SZ-like behaviors (Martínez-Pinteño et al., 2020), thereby reinforcing the plausibility of mGluR2 PAMs having efficacy for the treatment of cognitive deficits and negative symptoms in patients with SZ.

Extensive evidence implicates all mGluRs as viable therapeutic targets for SZ, their agonists and subtype-selective PAMs showing efficacy in dopaminergic, serotonergic, and glutamatergic models of positive, negative and cognitive symptoms (Maksymetz et al., 2017). Regarding mGluR2, there are several PAMs in development (Trabanco et al., 2019) given their promising preclinical findings, and even some of them have been recently tested in humans. Although negative results were shown in clinical trials, it should be noted that this could be explained by patient selection issues. Future trials with patients selected by disease stage and prior antipsychotic usage may yield different outcomes (Li et al., 2015; Maksymetz et al., 2017). The use of these molecules in critical periods of the disease, such as the prodrome or transition to psychosis, rather than in patients with the established disease, could improve their effectiveness in preventing or slowing down the progression of clinical and cognitive deterioration (Millan et al., 2016). Our present results are in line with this, showing that JNJ treatment during adolescence reversed the memory and social deficits that otherwise occurred in adulthood, perhaps by limiting the neurotoxic glutamate storm at this critical juncture (Schobel et al., 2013).

An excess of glutamate would trigger neurotoxicity and synaptic apoptosis-pruning by local activation of caspase-3, leading to loss of dendritic spine density in

critical brain areas (Parellada and Gassó, 2021; Yuede et al., 2010). Our group previously demonstrated the importance of apoptosis in antipsychotic-naïve patients with a first-psychotic episode (Batalla et al., 2015; Gassó et al., 2014; 2017). JNJ treatment during early stages could reduce the excessive apoptosis in this critical neurodevelopmental period, which could help preventing deleterious synaptic pruning and therefore mitigating SZ-related symptoms. In fact, we have recently observed that JNJ-46356479 seems to attenuate the apoptosis *in vitro*, particularly the caspase-3 activation induced by dopamine and glutamate (Gassó et al., 2022).

This is the first time that pharmacological treatment in adolescence has been assessed in a postnatal KET mice model is assessed. However, juvenile treatment with a mGluR2/3 agonist has previously been shown to restore dendritic spine loss and learning and memory deficits generated in a neurodevelopmental animal model of SZ (Xing et al., 2018). Interestingly, early treatment with a mGluR5 PAM drug in a neonatal NMDAR antagonist animal model also reversed neurodevelopmental progression of some SZ-like behaviors, which was not observed when drug was administered in adults (Clifton et al., 2013; Miller-Rhodes et al., 2022). Moreover, other experimental treatments administered during development in animal models of SZ have reported beneficial outcomes, including improved cognitive function (Marín, 2016). The presentation of psychosis does not represent the disorder's onset, but rather a prominent consequence of developmental alterations that could be prevented by early intervention before they becomes irreversible (Insel et al., 2010). It is clear that core features of SZ, such as disruption of parvalbumin GABAergic interneurons (Lewis et al., 2012 45), are already present in individual at high risk for psychosis. Early pharmacological treatments that can effectively reverse these initial alterations could be the key to preventing or ameliorating the disorder.

We also evaluated, for the first time, the efficacy of early CLZ treatment in the postnatal KET mice model. CLZ did revert certain social deficits, particularly those observed in the five-trial test, but had no effect on the memory deficits observed in these animals. This is consistent with the results from a dual-hit SZ model in which CLZ treatment normalized the resulting social impairments but not the cognitive deficits (Hamieh et al., 2021). In patients, while CLZ has no clear beneficial effects on cognitive performance (Keefe et al., 2007), it is the only medication indicated for refractory SZ, due to its superior efficacy among all antipsychotic agents, also resulting in a greater improvement in negative symptoms (Nucifora et al., 2017). However, CLZ treatment has also demonstrated to ameliorate PCP-induced emotional memory impairments in mice, suggesting its capacity to modulate glutamatergic memory dysfunction (Adem et al., 2019). The putative efficacy of CLZ on both negative and cognitive symptoms of SZ could be due to its slight activation of the NMDA receptor. Interestingly, combining CLZ and a powerful neuroprotectant that specifically binds NMDA receptors, has been shown to improve MK801-induced SZ behavior, including cognitive impairment (Zhou et al., 2020).

Motor assessment was also performed to evaluate the impact of drug treatment. Exceptionally, animals treated with JNJ showed lower latency to fall in the rotarod. Of note, however, this effect was not observed when JNJ treatment was given in adult animals (Martínez-Pinteño et al., 2021). Moreover, JNJ also induced no other impairments in motor function, coordination, general activity, anxiety, memory, or sociability, which is consistent with its observed lack of neurotoxicity in neuroblastoma cell culture (Gassó et al., 2022). Nevertheless, further studies are required to assess the safety of this mGluR2 PAM.

Among the limitations of this work, it should be noted that we used a very specific pharmacological mice model based on just one pathological hypothesis of SZ. As such, this cannot be assumed to mimic such a complex disease accurately. Another concern is whether the doses tested would represent the doses used therapeutically in humans. Irrespective of these concerns, our results are interesting and call for more research at a neuropathological level to clarify the biological effects of these pharmacological treatments.

Our results support the efficacy of JNJ treatment in counteracting deleterious cognitive and social effects induced by postnatal NMDA receptor blockade not only by treating adult animals, as shown before (Martínez-Pinteño et al. 2020), but also by treating animals during critical neurodevelopmental periods, which has high relevance for potentially preventing or slowing the deteriorating course of SZ. Adolescent JNJ treatment also produced better outcomes than CLZ in our animal model, indicating that the glutamatergic pathway could be an important therapeutic target for both the negative symptoms and cognitive deficits in SZ.

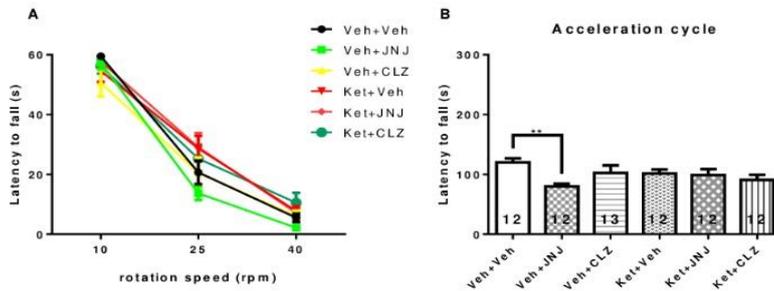


Figure 1: Motor coordination in the rotarod test. Mean values \pm SEM of latency to fall from the rotarod at different constant speeds (A) and during the acceleration cycle (B). The number of animals in each experimental group is displayed within the bars. $**p < 0.01$. Abbreviations: CLZ = clozapine; JNJ = JNJ-46356479; KET = ketamine; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle.

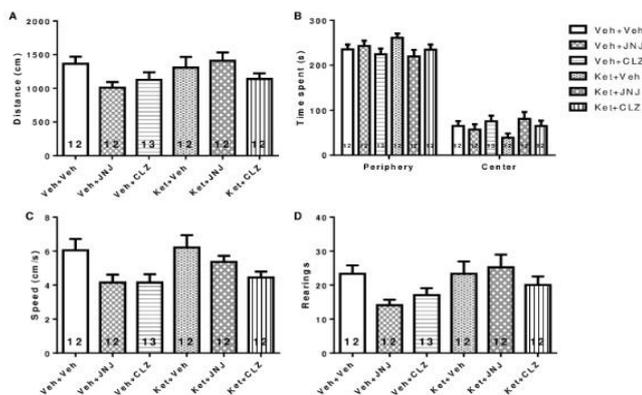


Figure 2. Activity in the open field test. Figure shows total distance traveled (A), time spent at the periphery and center of the apparatus (B), walking speed (C), and number of rearings (vertical activity) (D) performed during the test. Results are shown as the means \pm SEM of the total activity. The number of animals in each experimental group is displayed within the bars. Abbreviations: CLZ = clozapine; JNJ = JNJ-46356479; KET = ketamine; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle.

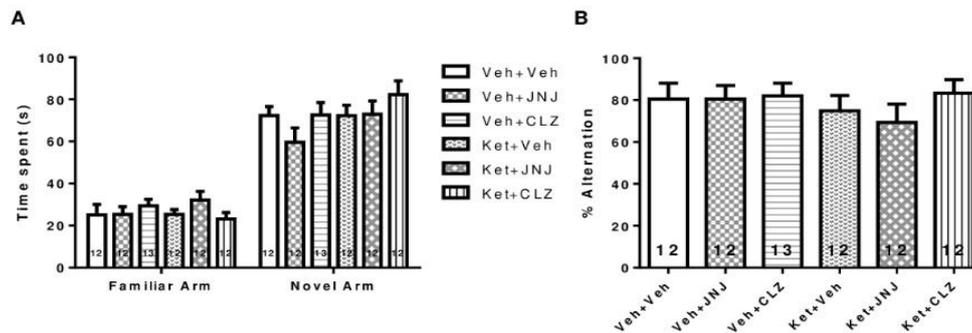


Figure 3: Spatial working memory in the Y-maze test. Figure shows time spent in the familiar or novel arms in the Y-maze for the working memory task (A) and the spontaneous alternation test with 3 trials (B). Results are shown as the means \pm SEM. The number of animals in each experimental group is displayed within the bars. Abbreviations: CLZ = clozapine; JNJ = JNJ-46356479; KET = ketamine; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle.

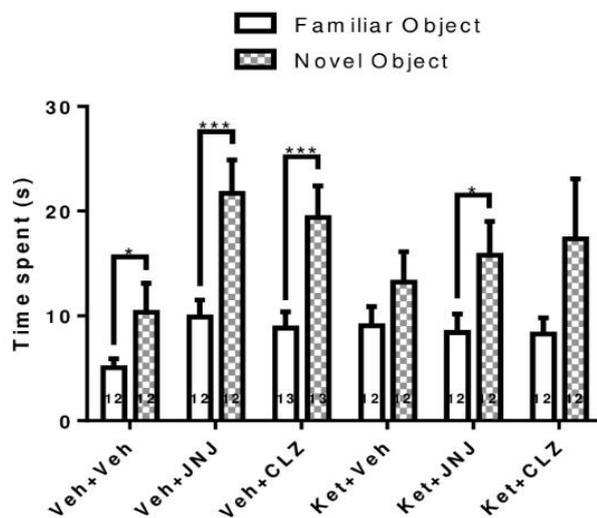


Figure 4: Novel object recognition (NOR) memory test. Results are shown as the means \pm SEM of the time mice spent exploring the familiar and novel objects. The number of animals in each experimental group is displayed within the bars. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Abbreviations: CLZ = clozapine; JNJ = JNJ-46356479; KET = ketamine; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle.

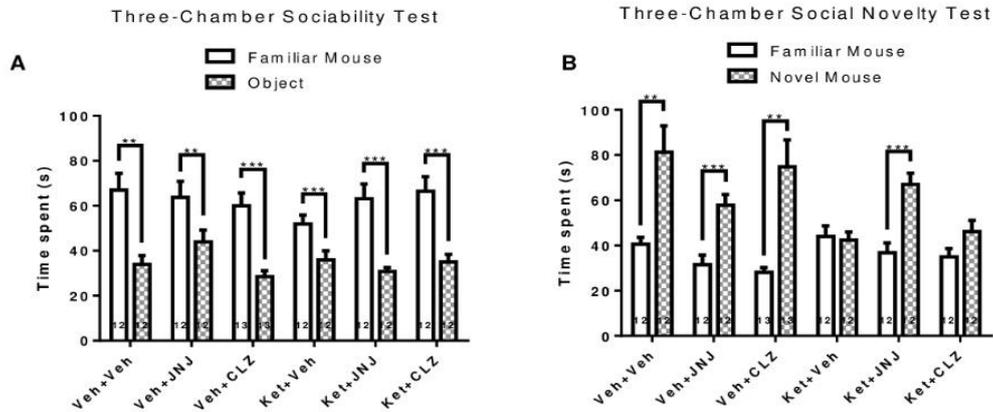


Figure 5: Social behavior in the three-chamber test. Time was measured for sociability with (A) and preference for a novel mouse (B). Results are shown as means \pm SEM. The number of animals in each experimental group is shown within the bars. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Abbreviations: CLZ = clozapine; JNJ = JNJ-46356479; KET = ketamine; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle.

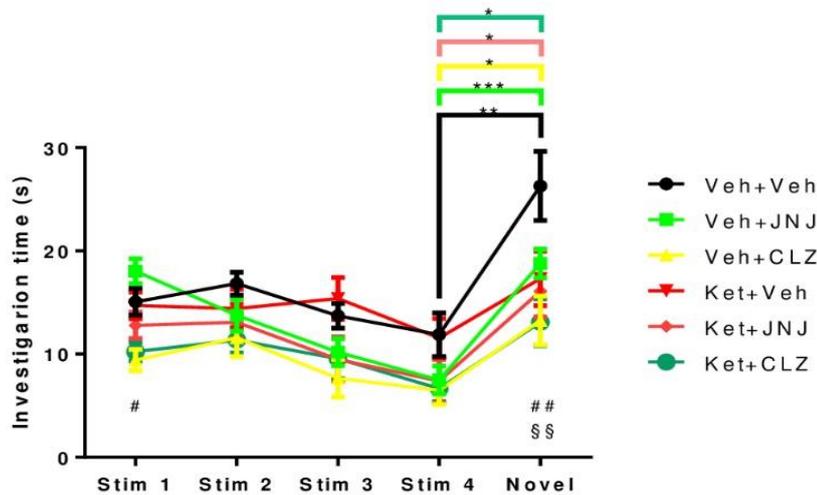


Figure 6: Social memory in the five-trial test. After four exposures to the same stimulus mouse, experimental mice were exposed to a novel stimulus mouse. Results are shown as means \pm SEM. # $p < 0.05$ Veh+CLZ vs Veh+Veh; ## $p < 0.01$ Veh+CLZ vs Veh+Veh; §§ $p < 0.01$ KET+CLZ vs Veh+Veh; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Abbreviations: CLZ = clozapine; JNJ = JNJ-46356479; KET = ketamine; SEM = standard error of the mean; Veh = vehicle.

5. REFERENCES

Adem A, Madjid N, Stiedl O, Bonito-Oliva A, Konradsson-Geuken Å, Holst S, Fisone G, Ögren SO. Atypical but not typical antipsychotic drugs ameliorate phencyclidine-induced emotional memory impairments in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2019 May;29(5):616-628. doi: 10.1016/j.euroneuro.2019.03.007.

Batalla A, Bargalló N, Gassó P, Molina O, Pareto D, Mas S, Roca JM, Bernardo M, Lafuente A, Parellada E. Apoptotic markers in cultured fibroblasts correlate with brain metabolites and regional brain volume in antipsychotic-naive first-episode schizophrenia and healthy controls. *Transl Psychiatry* 2015; 5: e626. doi: 10.1038/tp.2015.122.

Cadinu D, Grayson B, Podda G, Harte MK, Doostdar N, Neill JC. NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. *Neuropharmacology*. 2018 Nov;142:41-62. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.045.

Cid JM, Tresadern G, Vega JA, de Lucas AI, Del Cerro A, Matesanz E, Linares ML, García A, Iturrino L, Pérez-Benito L, Macdonald GJ, Oehlich D, Lavreysen H, Peeters L, Ceusters M, Ahnaou A, Drinkenburg W, Mackie C, Somers M, Trabanco AA. Discovery of 8-Trifluoromethyl-3-cyclopropylmethyl-7-[(4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl)methyl]-1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine (JNJ-46356479), a Selective and Orally Bioavailable mGlu2 Receptor Positive Allosteric Modulator (PAM). *J Med Chem* 2016; 59: 8495-507. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00913.

Cid JM, Tresadern G, Duvey G, Lütjens R, Finn T, Rocher JP, Poli S, Vega JA, de Lucas AI, Matesanz E, Linares ML, Andrés JJ, Alcazar J, Alonso JM, Macdonald GJ, Oehlich D, Lavreysen H, Ahnaou A, Drinkenburg W, Mackie C, Pype S, Gallacher D, Trabanco AA. Discovery of 1-butyl-3-chloro-4-(4-phenyl-1-piperidinyl)-(1H)-pyridone (JNJ-40411813): a novel positive allosteric modulator of the metabotropic glutamate 2 receptor. *J Med Chem*. 2014; 57(15):6495-512. doi: 10.1021/jm500496m.

Clifton NE, Morisot N, Girardon S, Millan MJ, Loiseau F. Enhancement of social novelty discrimination by positive allosteric modulators at metabotropic glutamate 5 receptors: adolescent administration prevents adult-onset deficits induced by neonatal treatment with phencyclidine. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Feb;225(3):579-94. doi: 10.1007/s00213-012-2845-3.

Gassó P, Martínez-Pinteño A, Rodríguez N, Madero S, Gómez M, Segura AG, García-Rizo C, Morén C, Mas S, Parellada E. Neuroprotective effect of the positive allosteric modulator of the mGluR2 JNJ-46356479 in human neuroblastoma cell cultures. *Int J Mol Sci*. 2022 (under review)

Gassó P, Mas S, Molina O, Lafuente A, Bernardo M, Parellada E. Increased susceptibility to apoptosis in cultured fibroblasts from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients.

J Psychiatr Res 2014; 48: 94-101. doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.09.017.

Gassó P, Mas S, Rodríguez N, Boloc D, García-Cerro S, Bernardo M, Lafuente A, Parellada E. Microarray gene-expression study in fibroblast and lymphoblastoid cell lines from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients. J Psychiatr Res 2017; 95: 91-101. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.08.003.

Goff DC. The Pharmacologic Treatment of Schizophrenia-2021. JAMA 2021; 325: 175-6. doi: 10.1001/jama.2020.19048.

Hamieh AM, Babin D, Sablé E, Hernier AM, Castagné V. Neonatal phencyclidine and social isolation in the rat: effects of clozapine on locomotor activity, social recognition, prepulse inhibition, and executive functions deficits. Psychopharmacology (Berl). 2021 Feb;238(2):517-528. doi: 10.1007/s00213-020-05700-y.

Insel TR. Rethinking schizophrenia. Nature. 2010 Nov 11;468(7321):187-93. doi: 10.1038/nature09552.

Jeevakumar V, Driskill C, Paine A, Sobhanian M, Vakil H, Morris B, Ramos J, Kroener S. Ketamine administration during the second postnatal week induces enduring schizophrenia-like behavioral symptoms and reduces parvalbumin expression in the medial prefrontal cortex of adult mice. Behav Brain Res. 2015 Apr 1;282:165-75. doi: 10.1016/j.bbr.2015.01.010.

Lavreysen H, Ahnaou A, Drinkenburg W, Langlois X, Mackie C, Pype S, Lütjens R, Le Poul E, Trabanco AA, Nuñez JM. Pharmacological and pharmacokinetic properties of JNJ-40411813, a positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor. Pharmacol Res Perspect. 2015a Feb;3(1):e00096. doi: 10.1002/prp2.96.

Lavreysen H, Langlois X, Donck LV, Nuñez JM, Pype S, Lütjens R, Megens A. Preclinical evaluation of the antipsychotic potential of the mGlu2-positive allosteric modulator JNJ-40411813. Pharmacol Res Perspect. 2015b Mar;3(2):e00097. doi: 10.1002/prp2.97. Epub 2015 Jan 30.

Lewis DA, Moghaddam B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. Arch Neurol 2006; 63: 1372-6. doi: 10.1001/archneur.63.10.1372.

Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. Trends Neurosci. 2012 Jan;35(1):57-67. doi: 10.1016/j.tins.2011.10.004.

- Li ML, Hu XQ, Li F, Gao WJ. Perspectives on the mGluR2/3 agonists as a therapeutic target for schizophrenia: Still promising or a dead end? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 2015; 60: 66–76. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.02.012
- Maksymetz J, Moran SP, Conn PJ. Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Mol Brain*. 2017 Apr 26;10(1):15. doi: 10.1186/s13041-017-0293-z.
- Marder SR, Cannon TD. Schizophrenia. *N Engl J Med* 2019; 381: 1753-1761. doi: 10.1056/NEJMr1808803.
- Marín O. Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. *Nat Med*. 2016 Nov;22(11):1229-1238. doi: 10.1038/nm.4225.
- Martínez-Pinteño A, García-Cerro S, Mas S, Torres T, Boloc D, Rodríguez N, Lafuente A, Gassó P, Arnaiz JA, Parellada E. The positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor JNJ-46356479 partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviors in a postnatal ketamine mice model. *J Psychiatr Res* 2020; 126: 8-18. doi: 10.1016/j.jpsychires.2020.04.005.
- Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G, Cadenhead K, Dazzan P, Fusar-Poli P, Gallinat J, Giedd J, Grayson DR, Heinrichs M, Kahn R, Krebs MO, Leboyer M, Lewis D, Marin O, Marin P, Meyer-Lindenberg A, McGorry P, McGuire P, Owen MJ, Patterson P, Sawa A, Spedding M, Uhlhaas P, Vaccarino F, Wahlestedt C, Weinberger D. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15: 485-515. doi: 10.1038/nrd.2016
- Miller-Rhodes P, Piazza N, Mattle A, Teboul E, Ehmann M, Morris-Schaffer K, Markowski VP. Sex-specific behavioral impairments produced by neonatal exposure to MK-801 are partially reversed by adolescent CDPPB treatment. *Neurotoxicol Teratol*. 2022 Jan-Feb;89:107053. doi: 10.1016/j.ntt.2021.107053.
- Nucifora FC Jr, Mihaljevic M, Lee BJ, Sawa A. Clozapine as a Model for Antipsychotic Development. *Neurotherapeutics*. 2017; 14: 750-761. doi: 10.1007/s13311-017-0552-9.
- Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Schizophrenia. *Lancet* 2016; 388: 86-97. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01121-6.
- Parellada E, Gassó P. Glutamate and microglia activation as a driver of dendritic apoptosis: a core pathophysiological mechanism to understand schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2021; 11: 271. doi: 10.1038/s41398-021-01385-9.
- Plataki ME, Diskos K, Sougklakos C, Velissariou M, Georgilis A, Stavroulaki V, Sidiropoulou K. Effect of Neonatal Treatment With the NMDA Receptor Antagonist, MK-801, During Different Temporal Windows of Postnatal Period in Adult Prefrontal Cortical and Hippocampal Function. *Front Behav Neurosci*. 2021 Jun 11;15:689193. doi: 10.3389/fnbeh.2021.689193.

Powell SB, Sejnowski TJ, Behrens MM. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012 Mar;62(3):1322-31. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.049.

Schobel SA, Chaudhury NH, Khan UA, Paniagua B, Styner MA, Asllani I, Inbar BP, Corcoran CM, Lieberman JA, Moore H, Small SA. Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver. *Neuron* 2013; 78: 81-93. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.011.

Trabanco AA, Bartolomé JM, Cid JM. mGluR2 positive allosteric modulators: an updated patent review (2013-2018). *Expert Opin Ther Pat*. 2019 Jul;29(7):497-507. doi: 10.1080/13543776.2019.1637421

Uno Y, Coyle JT. Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 2019; 73: 204-15. doi: 10.1111/pcn.12823.

Xing B, Han G, Wang MJ, Snyder MA, Gao WJ. Juvenile treatment with mGluR2/3 agonist prevents schizophrenia-like phenotypes in adult by acting through GSK3 β . *Neuropharmacology*. 2018 Jul 15;137:359-371. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.05.019.

Yuede CM, Wozniak DF, Creeley CE, Taylor GT, Olney JW, Farber NB. Behavioral consequences of NMDA antagonist-induced neuroapoptosis in the infant mouse brain. *PLoS One* 2010; 5: e11374. doi: 10.1371/journal.pone.0011374.

Zhou X, Cai G, Mao S, Xu D, Xu X, Zhang R, Yao Z. Modulating NMDA receptors to treat MK-801-induced schizophrenic cognition deficit: effects of clozapine combining with PQQ treatment and possible mechanisms of action. *BMC Psychiatry*. 2020 Mar 6;20(1):106. doi: 10.1186/s12888-020-02509-z.

Supplementary Table 1. Motor test battery (mean scores \pm SEM)

	Veh + Veh	Veh + JNJ	Veh + CLZ	Ket + Veh	Ket + JNJ	Ket + CLZ	Hypothesis Contrast
Visual placing reflex	3.08 \pm 0.08	3.00 \pm 0.00	2.92 \pm 0.08	3.08 \pm 0.15	3.00 \pm 0.12	2.83 \pm 0.11	p=0.489
Auditory startle	1.08 \pm 0.23	0.83 \pm 0.11	1.15 \pm 0.19	0.67 \pm 0.14	0.75 \pm 0.13	0.92 \pm 0.15	p=0.256
Righting reflex	3.00 \pm 0.00	2.5 \pm 0.34	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	p=0.060
Grip strength	2.67 \pm 0.19	1.92 \pm 0.19	1.62 \pm 0.21	2.67 \pm 0.14	2.42 \pm 0.19	2.25 \pm 0.18	p=0.000
Equilibrium wooden bar	2.71 \pm 0.13	2.33 \pm 0.23	2.96 \pm 0.38	2.58 \pm 0.20	2.62 \pm 0.22	2.29 \pm 0.21	p=0.109
Latency to fall wooden bar	40.00 \pm 0.00	40.00 \pm 0.00	36.85 \pm 2.26	40.00 \pm 0.00	40.00 \pm 0.00	40.00 \pm 0.00	p=0.127
Equilibrium aluminium bar	2.92 \pm 0.06	2.67 \pm 0.20	2.88 \pm 0.08	2.62 \pm 0.20	2.21 \pm 0.29	2.50 \pm 0.17	p=0.079
Latency to fall aluminium bar	38.50 \pm 1.02	37.67 \pm 1.18	33.97 \pm 3.12	36.75 \pm 2.15	34.25 \pm 3.08	33.94 \pm 2.48	p=0,586
Prehensile reflex	2.92 \pm 0.08	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	2.50 \pm 0.15	2.92 \pm 0.08	2.83 \pm 0.11	p=0.002
Traction capacity	5.67 \pm 0.22	5.33 \pm 0.43	5.38 \pm 0.24	3.83 \pm 0.56	5.50 \pm 0.26	5.42 \pm 0.19	p=0.004
Number of crossings coat hanger	2.17 \pm 0,11	2.00 \pm 0.00	2.08 \pm 0.24	2.08 \pm 0.08	2.00 \pm 0.12	2.08 \pm 0.08	p=0.954
Latency of arrival coat hanger	15.96 \pm 1.77	23.15 \pm 3.30	20.51 \pm 3.32	23.41 \pm 3.56	15.80 \pm 1.73	18.92 \pm 3.40	p=0.291

5.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral pretende, por un lado, profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en las alteraciones metabólicas inducidas por los APs, con el fin de identificar posibles genes candidatos para la detección de aquellos sujetos con mayor riesgo de desarrollar trastornos metabólicos. De esta forma se podría facilitar la selección del AP, disminuyendo así la aparición de efectos adversos, ayudando en el cumplimiento terapéutico y mejorando el pronóstico de los pacientes. Por otro lado, se pretende evaluar los efectos del tratamiento con JNJ *in vitro* en cultivo celular, estudiando su actividad neuroprotectora y antiapoptótica, e *in vivo* en un modelo de esquizofrenia en ratón expuesto a ketamina postnatal, valorando su capacidad de revertir las alteraciones neuropatológicas y de mejorar la sintomatología negativa y los déficits cognitivos de la esquizofrenia, síntomas para los que los tratamientos APs actuales no han demostrado ser efectivos.

A continuación, se discuten los diferentes hallazgos que se han reportado en los estudios que componen la presente la tesis doctoral.

5.1. Efectos adversos de los antipsicóticos: síndrome metabólico (Estudio 1)

Si bien la evidencia acumulada ha relacionado el tratamiento con APs con alteraciones metabólicas, los mecanismos etiopatogénicos y los factores de susceptibilidad de estos efectos secundarios permanecen sin esclarecer. En el *estudio 1*, realizamos un análisis integrado de los perfiles de expresión génica en cuatro tejidos diferentes de ratones después del tratamiento con risperidona u olanzapina para identificar genes candidatos implicados en el desarrollo de estas alteraciones metabólicas. Los genes clave identificados se evaluaron en una cohorte naturalista de pacientes con un PEP que estaban siendo tratados con APs. Nuestros hallazgos aportan nuevos conocimientos sobre el mecanismo molecular involucrado en las alteraciones metabólicas inducidas por APs, y sugieren nuevos genes candidatos para futuros estudios farmacogenéticos.

El análisis con WGCNA de los datos de expresión génica obtenidos mediante microarray en los cuatro tejidos de ratón analizados (hígado, páncreas, tejido adiposo y estriado) nos permitió identificar varios módulos de genes coexpresados que estaban significativamente asociados con el tratamiento con risperidona u olanzapina en cada tejido. Este enfoque, en lugar de centrarse en genes individuales, considera la estructura global de la expresión génica, proporcionando módulos de genes altamente correlacionados que están enriquecidos con genes involucrados en procesos biológicos conocidos (292). En el *estudio 1*, encontramos que los genes de los módulos identificados estaban relacionados con funciones biológicas similares para los dos APs evaluados, incluyendo un alto número de procesos relacionados con el metabolismo energético, la regulación hormonal y el control del tono vascular, entre otros. La modulación de estos procesos por parte de los APs a nivel transcriptómico puede conducir al desarrollo de las alteraciones metabólicas inducidas por APs.

La mayoría de las proteínas realizan sus funciones al interactuar con otros componentes que se encuentran en la misma célula o en diferentes células e incluso en diferentes tejidos (293). Los genes identificados en estos procesos relacionados con el metabolismo estaban altamente interconectados, como lo demuestran las redes de interacción proteína – proteína construidas para cada AP. Las redes de risperidona y olanzapina se fusionaron para identificar los genes compartidos. De los 12 genes comunes, 10 estaban interconectados, siendo el gen central *EP300*, que mostró conexiones con casi todos los demás genes de la red. Además, se observó que *EP300* fue también uno de los genes centrales más importantes en las redes independientes de risperidona y olanzapina. En los últimos años estos enfoques basados en redes de interacción se han aplicado a los estudios de proteínas. Durante las últimas dos décadas se han acumulado varias teorías y métodos para el análisis de redes biológicas, con el fin de evaluar las relaciones entre las proteínas y esclarecer su importancia funcional. Scardoni y Laudanna discutieron varias propiedades de la centralidad topológica, así como sus significados biológicos (294). Se ha propuesto que las proteínas altamente conectadas en un interactoma y aquellas ubicadas en el centro de la red tienen una mayor probabilidad de ser

esenciales (295,296). Así, nuestros hallazgos sugieren que *EP300* podría ser un gen crucial en el mecanismo por el cual los APs conducen a la desregulación metabólica.

El gen *EP300* codifica la proteína coactivadora transcripcional de tipo celular p300, que funciona como una acetiltransferasa para histonas y otras proteínas, regulando así la actividad transcripcional a través de la remodelación de la cromatina, y es importante en los procesos de proliferación y diferenciación celular (297). Esta proteína es un promotor de la glucólisis y su inhibición conduce a la reducción del metabolismo de la glucosa (298,299). Está implicada en el mantenimiento de la producción de glucosa hepática (300), en la señalización posterior del glucagón y la insulina y participa en la regulación de la homeostasis energética en los principales órganos metabólicos (297,301,302). Por lo tanto, tiene un papel crucial en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre tanto en ayunas como en estados posprandiales, mediante la regulación de la glucólisis, la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno (299,300,303). Además, p300 tiene un papel importante en el mantenimiento de la función de las células β pancreáticas al modular la actividad del promotor del gen de la insulina a través de la hiperacetilación de la histona H4 (304). Esta proteína se ha asociado con la interrupción de la señalización de insulina en la obesidad (305). Por lo tanto, se ha propuesto que p300 podría ser un factor principal que conduce al desarrollo de hiperglucemia, niveles de insulina alterados y resistencia a esta hormona (297,305), alteraciones que ocurren con frecuencia en personas tratadas con APs de segunda generación (306–308). Curiosamente, otro estudio reveló que algunas variantes genéticas asociadas a la diabetes tipo 2 identificadas en estudios GWAS estaban ubicadas en lugares de unión a proteínas, incluidos los de p300 (309). Estudios previos revelaron que *EP300* y su parólogo *CREBBP*, gen que codifica la proteína de unión a CREB, eran los genes más conectados en las redes de interacción asociadas con la diabetes de tipo 2 (310,311). Al regular la expresión génica, p300 también participa en la regulación de la homeostasis lipídica y la adipogénesis. Por lo tanto, la actividad de p300 podría incrementar la síntesis de triglicéridos y alterar la exportación de lípidos, lo que aumentaría el peso y la grasa corporal (297,312). Los APs se asocian con un mayor riesgo de estas alteraciones metabólicas, ya que los pacientes en tratamiento con

estos fármacos presentan con frecuencia dislipidemia, principalmente debido a una elevación de los niveles de triglicéridos, así como aumentos de peso corporal y obesidad abdominal (313–315).

En nuestro estudio analizamos la asociación de los niveles de expresión génica de *EP300*, predichos a partir de la información genética, con diferentes rasgos antropométricos y con las alteraciones metabólicas en una cohorte longitudinal de pacientes con un PEP tratados con APs. La expresión génica es un fenotipo intermedio entre la variabilidad genética y la manifestación de la enfermedad. La mayoría de las variantes genéticas asociadas a enfermedades se encuentran en regiones no codificantes, lo que sugiere que estas variantes pueden ejercer sus efectos al modular la expresión génica (316). En este escenario, se ha desarrollado un nuevo enfoque prometedor que permite la predicción de la expresión génica basada en datos genéticos. La expresión génica imputada se puede usar en lugar de los genotipos para evaluar el efecto de los genes en un fenotipo determinado (285). Esta estrategia se ha utilizado previamente para identificar genes candidatos asociados con la esquizofrenia (317), el trastorno por déficit de atención con hiperactividad y otros trastornos complejos (318–320). Nosotros encontramos que los niveles de expresión predichos de *EP300* en diferentes tejidos relacionados con el metabolismo de pacientes con un PEP tratados con APs se asociaron significativamente con aumentos en el peso corporal, el índice de masa corporal, los niveles de colesterol total y LDL, y las concentraciones de triglicéridos tras 6 meses de seguimiento. Aunque se han descrito alteraciones metabólicas en pacientes con esquizofrenia incluso en ausencia de tratamiento con APs, no encontramos asociación entre los niveles de expresión de *EP300* predichos genéticamente y el estado metabólico de los pacientes con un PEP a nivel basal, lo que sugiere que este gen podría estar relacionado con los efectos de los APs en lugar de ser un factor de riesgo para la desregulación metabólica asociada con la enfermedad. Por lo tanto, las características genéticas afectarían a los niveles de expresión de *EP300*, lo que a su vez podría hacer que los pacientes fueran más susceptibles a los efectos que ejercen los APs sobre este gen. Los resultados obtenidos en la cohorte de pacientes

respaldan los obtenidos en ratones e indican una fuerte influencia de *EP300* en el deterioro metabólico inducido por APs.

Estudios previos han descrito que variantes comunes y raras de *EP300* están asociadas con el riesgo de esquizofrenia (84,321). Sin embargo, hasta donde sabemos, esta es la primera vez que este gen se ha asociado con el tratamiento con APs. El principal mecanismo de acción utilizado para explicar las alteraciones metabólicas inducidas por APs es el bloqueo de los receptores D₂, H₁ y 5-HT_{2c}, lo que conduce a un aumento en la ingesta de alimentos y acaba desencadenando alteraciones metabólicas (159,322). Sin embargo, se espera que un mecanismo más complicado explique estos efectos. Recientemente, Chen y cols. propusieron un mecanismo molecular de la hiperfagia y la obesidad inducidas por la olanzapina que podría estar de acuerdo con nuestros resultados. Concretamente, plantearon que el efecto antagónico de la olanzapina en el receptor H₁ activa la señalización posterior de GHSR1a (receptor de grelina) en las neuronas hipotalámicas, que incluye la señalización de AMPK- FOXO1-pCREB, en la cual p300 está involucrada. Esta acción aumenta la expresión del neuropéptido Y, lo que provoca una ingesta excesiva de alimentos y un aumento de peso (323). Nuestros resultados sugirieron que la regulación de *EP300* por APs en otros tejidos también podría contribuir a la aparición de alteraciones metabólicas. Se necesitan más estudios para dilucidar el efecto pleiotrópico de *EP300* en la esquizofrenia y para desentrañar el papel específico de este gen en el mecanismo de acción de los APs y, en consecuencia, en la desregulación metabólica inducida por estos fármacos.

En conclusión, proponemos que la desregulación del funcionamiento de *EP300* estaría involucrada en la aparición de alteraciones metabólicas inducidas por APs y que los genes implicados en su red de interacción podrían considerarse posibles genes candidatos para futuros estudios farmacogenéticos sobre este efecto adverso.

5.2. Eficacia de los antipsicóticos: efecto del JNJ-46356479 en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (*Estudios 2, 3 y 4*)

En esta última década, se ha llevado a cabo el desarrollo de MAPs de los receptores mGlu para tratar trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia y, en particular, sus síntomas negativos y cognitivos. En nuestros estudios utilizamos una molécula recientemente desarrollada por Janssen, el JNJ-46356479, un nuevo MAP de los receptores mGlu2, con un perfil farmacocinético más equilibrado y atributos mejorados, como una menor eliminación y una mayor biodisponibilidad en roedores, que los fármacos desarrollados previamente (324). En concreto, en el *estudio 2* evaluamos *in vitro* la actividad neuroprotectora de este fármaco. Mientras que en los *estudios 3 y 4* analizamos *in vivo*, en ratones adultos, el efecto del tratamiento con JNJ administrado en diferentes períodos, a nivel cognitivo-conductual e histológico-molecular en un modelo animal de esquizofrenia generado mediante la administración de ketamina postnatal.

Los resultados del *estudio 2* aportan evidencia de la seguridad farmacológica del JNJ en cultivos celulares de neuroblastoma expuestos a concentraciones crecientes de esta molécula, así como de su potencial efecto neuroprotector frente a la apoptosis y muerte celular inducida por la exposición a dopamina y glutamato. Además, el tratamiento con JNJ mostró mayor seguridad y efecto neuroprotector que la administración de clozapina.

En el presente estudio, el tratamiento con JNJ, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición no afectó a la viabilidad celular. Además, este tratamiento farmacológico no indujo apoptosis en los cultivos celulares, ya que la actividad de la caspasa-3 y la externalización de la fosfatidilserina no se vieron afectadas. Estos resultados indican que el JNJ no es neurotóxico y podría tener una buena tolerabilidad en la práctica clínica, como se observó anteriormente con otra molécula previa (JNJ-40411813) (325). En comparación con clozapina, la seguridad del JNJ pareció ser superior ya que el tratamiento con clozapina sí que provocó disminuciones en la viabilidad celular y aumentos en la actividad de la caspasa-3 de

forma dosis dependiente. De manera similar, en otros estudios se han reportado efectos citotóxicos de la clozapina, mostrando evidencia de que el tratamiento con este fármaco produce disminuciones en la viabilidad de diferentes tipos celulares, incluido el neuroblastoma humano (326,327). Por su parte, Lundberg y cols. también detectaron actividad citotóxica cuando cultivos primarios de células madre de ratón se expusieron a concentraciones mayores a ≥ 500 nM de clozapina (328). Además, Park y cols. también mostraron dicha actividad neurotóxica al exponer cultivos primarios de neuronas de rata a concentraciones de clozapina superiores a ≥ 10 μ M, lo que se asoció con un aumento de la apoptosis y la autofagia (329). Sin embargo, existe mucha evidencia de los efectos neuroprotectores de los APs de segunda generación (330,331). De hecho, Lundberg y cols. también mostraron que la clozapina puede tener un efecto protector antiapoptótico en las células madre neuronales cuando se utiliza en concentraciones más bajas (10 nM), lo que respalda sus observaciones previas *in vivo* que indican que la clozapina promueve la neurogénesis (328). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Takaki y cols. que revelaron un aumento en el número de espinas dendríticas en cultivos de neuronas corticales de rata tratadas con clozapina a 1 μ M, y una disminución de su número cuando se trataron con una concentración inapropiada de clozapina (10 μ M) (332). Del mismo modo, la clozapina a 1 μ M también aumentó la densidad de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo de rata (333). Esto indica que la selección de dosis apropiadas de AP puede ser importante para la protección de las espinas dendríticas en pacientes con esquizofrenia. Nuestros resultados están en línea con este hallazgo, ya que las concentraciones bajas de clozapina no afectaron de forma relevante a la viabilidad, la apoptosis o la muerte celular en el cultivo de neuroblastomas, mientras que las concentraciones altas de este fármaco fueron tóxicas e indujeron la muerte celular. No obstante, el JNJ no produjo daño celular ni incluso al ser utilizado en altas concentraciones.

Es importante tener en cuenta que la mayoría de la evidencia de los efectos neuroprotectores de los APs se ha observado cuando los cultivos celulares se expusieron previamente a diferentes tipos de daño o estrés celular (327,331,334). En el *estudio 2*, indujimos la apoptosis y la muerte celular con altas concentraciones

de dopamina y glutamato, como ya se había reportado en otros estudios con líneas celulares de neuroblastoma (331,335–337). La dopamina y el glutamato son neurotransmisores esenciales, pero una concentración extracelular excesiva puede inducir daño y degeneración neuronal, lo que está implicado en la fisiopatología de la esquizofrenia. Dicha neurotoxicidad podría estar mediada por diferentes mecanismos, incluido el estrés oxidativo, el daño mitocondrial y la apoptosis celular (335,337), que podrían bloquearse por diferentes vías en los tratamientos con clozapina o JNJ. En nuestro estudio, el tratamiento con JNJ mostró un potencial efecto neuroprotector, ya que redujo la activación de caspasa-3 inducida por altas concentraciones de dopamina. Sin embargo, observamos en el análisis con anexina V mediante citometría de flujo una cierta potenciación de la muerte celular inducida por dopamina cuando los cultivos fueron tratados con JNJ, probablemente debido a procesos de necrosis celular (331). Nuevamente, en comparación con el JNJ, la clozapina mostró efectos citotóxicos más potentes, ya que indujo un mayor aumento de la toxicidad de la dopamina, disminuyendo la viabilidad celular, incrementando la actividad de caspasa-3 y aumentando la muerte celular según el análisis citométrico. Estas diferencias podrían deberse a la capacidad del JNJ para prevenir la activación de caspasa-3 inducida por la dopamina. En la misma línea, al inducir la apoptosis mediante la exposición a glutamato, el tratamiento con JNJ mostró un efecto neuroprotector, disminuyendo la activación de caspasa-3 en paralelo con un aumento de la viabilidad celular y una reducción de la muerte celular. Una vez más, la clozapina mostró mayor neurotoxicidad que JNJ potenciando tanto la disminución de la viabilidad celular como el aumento de la muerte celular inducida por glutamato. La neuroprotección observada con la molécula JNJ estaría en concordancia con estudios previos en cultivos con la línea celular SH-SY5Y, subclonada de la utilizada en nuestro estudio, mantenida sin diferenciar que demostraron los efectos neuroprotectores de LY354740, un agonista de los receptores mGlu2 a 10 μ M frente a la neurotoxina mitocondrial 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+) (338) y la estaurosporina (339), como inductores de muerte celular.

En este estudio, seleccionamos un rango de concentraciones de clozapina frecuentemente utilizadas en la literatura en estudios *in vitro* previos

(326,329,340,341). Para facilitar la comparativa, se utilizaron las mismas concentraciones de JNJ. En estudios *in vitro* que se llevaron a cabo en líneas celulares recombinantes se utilizaron un rango de concentraciones entre 0,01 μ M y 10 μ M del JNJ-40411813 (342), un MAP del receptor mGlu2. Esta molécula desarrollada previamente se utilizó en estudios clínicos de fase 2 para el tratamiento de la esquizofrenia, en los que se utilizaron concentraciones máximas de 150 mg/día (343), lo que corresponde a dosis clínicas bajas de clozapina. Aun así, el tratamiento con JNJ parece ser menos neurotóxico y más neuroprotector que las mismas dosis, o incluso más bajas, de clozapina.

Una de las teorías fisiopatológicas de la esquizofrenia y su sintomatología negativa y cognitiva es la existencia de una mayor poda sináptica durante etapas cruciales del desarrollo cerebral, como la adolescencia, que podría deberse a una mayor apoptosis neuronal resultante de una excesiva neurotransmisión glutamatérgica (59,344). El exceso de glutamato desencadenaría neurotoxicidad, apoptosis y poda sináptica por activación local de caspasa-3, lo que conduciría a la pérdida de densidad de las espinas dendríticas en áreas críticas del cerebro (59,61). Estos resultados están en concordancia con resultados previos de nuestro grupo que evidencian el importante papel de la apoptosis en pacientes con un PEP sin tratamiento previo con APs (198,345,346). En base a nuestros resultados el tratamiento con JNJ durante las primeras etapas podría actuar reduciendo la apoptosis excesiva en este período crítico del desarrollo neurológico, lo que podría ayudar a prevenir la poda sináptica nociva y, por lo tanto, mitigar los síntomas relacionados con la esquizofrenia.

En los *estudios 3 y 4* se evaluó en ratones adultos el efecto del tratamiento precoz y en la adultez con JNJ a nivel cognitivo conductual e histológico-molecular en un modelo animal de esquizofrenia utilizando ketamina postnatal.

Para estos estudios se escogió un modelo animal que permitiese reproducir los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia, así como algunas de las alteraciones neuropatológicas del trastorno. Por ello, se utilizó un modelo basado en la administración de antagonistas de los receptores NMDA, como la ketamina. Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el comportamiento y la

funcionalidad neuronal en estos animales en función de la edad de exposición a ketamina (255,256) y, en base a que la esquizofrenia puede ser una consecuencia de los daños producidos durante el desarrollo cerebral (57), se utilizó un modelo previamente descrito en que los animales se exponían a ketamina en los días 7, 9 y 11 posteriores al nacimiento (257,347). A diferencia de otros modelos similares en que la ketamina se administra en días posteriores, este modelo parece inducir cambios persistentes en las neuronas de distintas áreas cerebrales y producir síntomas similares a la esquizofrenia en la edad adulta (348).

En nuestro estudio, los resultados obtenidos no mostraron diferencias en el comportamiento motor del animal adulto entre los ratones expuestos a ketamina y el grupo control, cuando se evaluó la batería de pruebas motoras y el test del rotarod. Sin embargo, se observaron ciertas discrepancias en el test de campo abierto. Mientras que en el *estudio 3* los ratones expuestos a ketamina presentaron una reducción significativa de la actividad locomotora y el comportamiento exploratorio medidas según la distancia total recorrida, la velocidad media de la marcha y el número de veces que se levantaron sobre sus patas traseras, en el *estudio 4* no se observaron estas diferencias. Estudios previos han reportado también cierta variabilidad en este comportamiento describiendo tanto reducciones como aumentos en la actividad locomotora (349,350). Una de las causas de esta disparidad en los resultados es la cantidad de protocolos diferentes que se siguen y el aparato utilizado, que presentan tamaños y condiciones diferentes. No obstante, en la bibliografía la mayoría de resultados observan que a largo plazo no se detectan efectos de la administración postnatal de antagonistas de NMDA en la actividad locomotora (257,351,352) como los resultados expuestos en el *estudio 4*.

Por otro lado, la administración postnatal de ketamina sí que indujo déficits cognitivos y conductuales que permanecieron en el animal adulto. A nivel cognitivo, en la prueba del laberinto en Y, los ratones expuestos a ketamina mostraron una pérdida de la alternancia espontánea, lo que indica una alteración en la memoria de trabajo espacial. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran que la ketamina altera el rendimiento de la memoria en roedores en esta prueba (353,354). Además, los ratones expuestos a ketamina mostraron un desempeño

alterado en la tarea de reconocimiento de objeto nuevo, con una disminución de la preferencia significativa en la exploración del objeto desconocido, indicativo de un déficit en la memoria de reconocimiento. Estos resultados concuerdan con los presentados previamente por Jeevakumar y cols. en el mismo modelo animal (257).

Para valorar los síntomas negativos se utilizaron pruebas que evalúan la interacción social de los ratones. Los resultados obtenidos en la prueba de las tres cámaras indican que la exposición postnatal a ketamina alteró la motivación social en ratones adultos ya que, a diferencia de lo observado en el grupo control estos dedicaron un tiempo similar a olfatear el objeto y el ratón. Además, estos ratones tampoco mostraron preferencia por la novedad social ya que estuvieron un tiempo similar olfateando un ratón familiar y un ratón desconocido. Estos resultados coinciden con los del estudio de Moy y cols. en que se observa una fuerte interrupción de la sociabilidad en ratones C57BL/6J en la prueba de las tres cámaras tras la administración de MK-801 (355). En cuanto a la prueba de memoria social de las cinco exposiciones, los animales expuestos a ketamina mostraron un tiempo de interacción similar durante las cinco exposiciones, con independencia de si los ratones eran familiares o no. Además, este tiempo fue significativamente más bajo que el observado en los ratones control, lo que sugiere una baja actividad social y un déficit de memoria social. Jeevakumar y cols. describieron resultados similares, utilizando el mismo modelo de administración postnatal de ketamina, que mostró déficit en el interés por la novedad social en ratones adultos (257).

También se evaluó el efecto de la exposición a ketamina en la consolidación y extinción del miedo condicionado, pero en nuestros experimentos no se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento. Las alteraciones en estas pruebas conductuales se han relacionado con los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia, ya que los pacientes a menudo presentan déficits en el aprendizaje asociativo y el procesamiento motivacional, en particular mostrando una incapacidad para procesar adecuadamente el miedo (356,357). Sin embargo, hay discrepancias entre los estudios y, como en el nuestro, otros autores tampoco reportaron un efecto significativo de la ketamina en el condicionamiento del miedo al contexto (358,359).

En conjunto, estos resultados sugieren que la administración postnatal de ketamina conduce a déficits sociales y de memoria que persisten en la edad adulta, lo que podría ser útil como indicador de síntomas negativos y cognitivos similares a los de la esquizofrenia. El hecho de replicar estas alteraciones aumenta la validez de este modelo animal particular para la investigación preclínica del trastorno.

A nivel histológico-molecular, en los ratones expuestos a ketamina observamos una reducción en la expresión de PV en la CPF, corroborando los hallazgos previos reportados por Jeevakumar y Kroener en el mismo modelo de ratón. Además, observamos, por primera vez, en estos ratones una reducción en la densidad de interneuronas PV+ en el hipocampo, particularmente en el GD. Pese a observar en el grupo expuesto a ketamina una disminución en la densidad de neuronas PV+ en la región CA1, estas diferencias no fueron significativas. La formación hipocampal comprende un grupo de regiones corticales, incluido el GD y el hipocampo propiamente dicho (CA1 - CA2 - CA3) y juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria. Estudios previos han descrito reducciones en PV en la región CA1 del hipocampo en ratones expuestos a ketamina durante la adolescencia (360,361). Además, en ratones expuestos a ketamina en la edad adulta, bajo un régimen de tratamiento crónico, se reportaron disminuciones de neuronas PV+ en la CPF y el hipocampo dorsal (362). Otros estudios con MK-801 también han mostrado reducciones en la densidad de interneuronas PV+ en estas áreas (248,249). Curiosamente, junto a esta reducción de interneuronas PV+, también observamos un aumento significativo en los niveles de c-Fos, un marcador indirecto de actividad neuronal (363), en el GD de ratones expuestos a ketamina. Cabe señalar que existen discrepancias en la expresión de c-Fos detectadas previamente bajo diferentes condiciones. Aunque Hauser y cols. encontraron una reducción significativa de este marcador en CA1 en un modelo de ratón expuesto a ketamina (362), otros estudios como el de Nishizawa y cols., describieron aumentos en la expresión de c-Fos tras la administración de ketamina (364), lo que es consistente con nuestros resultados y los reportados en modelos murinos utilizando otros antagonistas de NMDA como la fenciclidina (365,366). Este aumento de actividad neuronal parece estar relacionado

con una falta de control inhibitorio como resultado de la reducción de interneuronas GABAérgicas PV+.

Al tratar los animales con JNJ, en general no se observaron diferencias en la evaluación de la batería de pruebas motoras. Sin embargo, en nuestros resultados hemos observado pequeñas discrepancias en el test del rotarod donde en el *estudio 3* no se mostraron diferencias, pero en el *estudio 4* se evidenció una latencia de caída menor. Además, mientras en el *estudio 3* se reportó una reducción significativa de los ratones tratados con JNJ, en el *estudio 4* esta reducción no llegó a ser significativa, solamente se mostró una tendencia a la baja en el grupo vehículo + JNJ, en las variables: distancia total recorrida, velocidad media de la marcha y veces que se levantaron sobre sus patas traseras. El tratamiento con clozapina no afectó ni a la función ni a la coordinación motora evaluadas con la batería de pruebas motoras, el test rotarod y el test de campo abierto, mostrando en todos ellos unos valores similares al grupo control. No obstante, en estudios previos se ha observado que la clozapina puede disminuir el comportamiento exploratorio espontáneo en ratones (352). En cuanto a los posibles efectos secundarios del tratamiento farmacológico, es importante señalar que JNJ puede desencadenar cierto comportamiento relacionado con la ansiedad ya que los ratones pasan menos tiempo en el centro del aparato del test de campo abierto (367). Aun así, se requieren más estudios para evaluar la seguridad de este MAP de los receptores mGlu2.

Algunas de las alteraciones observadas en el modelo de ratones expuestos a ketamina postnatal se atenuaron con el tratamiento con JNJ tanto en la adolescencia como en la adultez, siendo el efecto del JNJ mayor que el observado en el tratamiento con clozapina. A nivel cognitivo, en la prueba del laberinto en Y, los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ o clozapina mostraron una alternancia espontánea normal a diferencia de los que habían sido expuestos a ketamina. En la tarea de reconocimiento de objeto nuevo, el tratamiento con JNJ también mitigó los déficits de los ratones expuestos a ketamina, ya que estos animales recuperaron la preferencia por explorar más tiempo el objeto nuevo. Por otro lado, la administración de clozapina en los ratones expuestos a ketamina no fue

capaz de recuperar la preferencia significativa por la interacción con el objeto nuevo. Esto sugiere que el fármaco podría ser eficaz en la mejora de ciertos déficits cognitivos en pacientes psicóticos en mayor medida que la clozapina.

En cuanto al efecto del tratamiento sobre las alteraciones relacionadas con los síntomas negativos, los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ recuperaron la preferencia por la novedad social en la prueba de las tres cámaras dedicando más tiempo a la interacción con el ratón desconocido que con el familiar de forma similar a lo observado en el grupo control. Nuevamente, la administración de clozapina en el grupo de ratones expuestos a ketamina no recuperó la preferencia significativa por la interacción con el ratón desconocido. Además, en la prueba de memoria social de las cinco exposiciones, los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ recuperaron la habituación (tiempo de interacción reducido) después de cuatro exposiciones con el mismo ratón y una deshabituación (tiempo de interacción aumentado) en la quinta exposición con el ratón desconocido, lo que indica la normalización de la sociabilidad y la memoria social. En cuanto a la clozapina, pese a pasar menos tiempo investigando a los ratones, también se observó una recuperación del interés por el ratón nuevo después de la deshabituación. En la misma línea, otros estudios han demostrado que la estimulación del receptor mGlu2/3 en ratones expuestos a fenciclidina atenuaron las alteraciones o recuperaron la discriminación de la novedad social alterada en el modelo (368).

Por lo tanto, el tratamiento farmacológico con JNJ puede ser efectivo para controlar tanto los déficits cognitivos como los síntomas negativos de los pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, a diferencia del JNJ el tratamiento precoz con clozapina, evaluado por primera vez en este estudio, no mejoró los déficits cognitivos observados en estos animales. Estos resultados están en línea con los resultados obtenidos en un modelo de esquizofrenia generado mediante aislamiento social y expuestos a fenciclidina en el que el tratamiento con clozapina normalizó las deficiencias sociales, pero no los déficits cognitivos (369). En los pacientes, aunque no hay efectos beneficiosos claros del tratamiento con clozapina en el rendimiento cognitivo (370), este es el único fármaco que está indicado para tratar la

esquizofrenia refractaria, debido a su superior eficacia, lo que también resulta en una mayor mejoría de los síntomas negativos (371,372). Sin embargo, también se ha demostrado que el tratamiento con clozapina mejora las alteraciones de la memoria emocional inducidas por fenciclidina en ratones, lo que sugiere su capacidad para modular la disfunción glutamatérgica de la memoria (373). La supuesta eficacia de la clozapina en los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia podría deberse a su ligera activación del receptor NMDA. Curiosamente, una terapia combinando clozapina con pirroloquinonina quinona, un poderoso neuroprotector que se une específicamente a los receptores NMDA, puede mejorar las alteraciones del comportamiento inducidas por MK-801, incluido el deterioro cognitivo (374).

En cuanto al análisis histológico-molecular, los resultados de nuestro estudio muestran, por primera vez, que el tratamiento farmacológico con un MAP de los receptores mGlu2 atenúa las alteraciones neuropatológicas producidas por la administración de ketamina postnatal. Así, los ratones expuestos a ketamina y tratados con JNJ mostraron una densidad de interneuronas PV+ y unos patrones de actividad de c-Fos en la CPF y el hipocampo, similares a los obtenidos en los ratones del grupo control. Estos déficits neuropatológicos pueden ser responsables de los déficits en la memoria de trabajo y en el comportamiento social observado en estos ratones. Una reducción en las interneuronas GABAérgicas PV+ podría conducir a una disminución del control inhibitorio de las neuronas en la CPF e hipocampo y, en consecuencia, afectar a los procesos cognitivos y sociales regulados por estas áreas cerebrales. Se ha informado que la alteración de la función de las interneuronas PV+ en la CPF producen déficits en el dominio cognitivo (375), anulan la exploración social e interrumpen las preferencias sociales (376). Curiosamente, la activación selectiva de estas interneuronas en el GD también parece ser fundamental para regular la interacción social (377). En base a nuestros resultados, un mecanismo de acción que explicaría las mejoras observadas con la administración del JNJ sería la disminución de la liberación presináptica de glutamato en neuronas excitatorias, revirtiendo el estado hiperglutamatérgico inducido por ketamina y las alteraciones neuropatológicas. De manera similar, recientemente se mostró que la clozapina y la lurasidona pueden prevenir una reducción de PV en el hipocampo (378,379). En

consecuencia, la modulación del sistema GABAérgico del hipocampo se ha propuesto como un mecanismo clave de estos antipsicóticos atípicos para mejorar los síntomas cognitivos y negativos de la esquizofrenia.

Nuestros resultados respaldan la potencial eficacia del JNJ por sus efectos neuroprotectores para contrarrestar los efectos cognitivos y negativos de la esquizofrenia, tanto en el tratamiento adulto como en etapas prodrómicas. Hasta la fecha los ensayos clínicos realizados con otros MAPs que habían presentado prometedores resultados en ensayos preclínicos (133), han arrojado resultados negativos y no han alcanzado ensayos de fase 3 (342,380,381). Esto podría deberse a que en realidad han fallado en el período de tratamiento de la esquizofrenia establecida. Nuestro estudio muestra por primera vez que el tratamiento farmacológico en etapas prodrómicas podría ser efectivo en nuestro modelo animal para el estudio de la esquizofrenia. Además, se ha reportado que el tratamiento en ratas en edad juvenil con LY379268, un agonista de los receptores mGlu2/3, restaura la pérdida de las espinas dendríticas y los déficits de aprendizaje y memoria observados en un modelo animal de neurodesarrollo para el estudio de la esquizofrenia administrando metilazoximetanol (382). Curiosamente, el tratamiento temprano con un MAP de los receptores mGlu5 en un modelo animal neonatal expuesto a antagonistas de los receptores NMDA también parece revertir la progresión del desarrollo neurológico de algunos comportamientos similares a la esquizofrenia, que no se observaron cuando el fármaco se administró en adultos (359,383). Además, otros tratamientos experimentales administrados durante el desarrollo en modelos animales de esquizofrenia han reportado resultados beneficiosos, incluida la mejora de la función cognitiva (384). La psicosis no es el inicio del trastorno, sino más bien una consecuencia destacada de las alteraciones del desarrollo que quizás puedan prevenirse mediante una intervención temprana antes de que se convierta en un estado irreversible (57). Está claro que las características centrales de la esquizofrenia, como la alteración de las interneuronas GABAérgicas PV+, ya están presentes en individuos con alto riesgo de psicosis (385).

Los tratamientos farmacológicos tempranos que puedan ser efectivos para revertir estas alteraciones iniciales podrían ser la clave para prevenir o mejorar el pronóstico

del trastorno. Por este motivo se ha sugerido que los futuros fármacos deberían centrarse en el neurodesarrollo aberrante y en la progresión de la enfermedad (13). Una de estas aproximaciones sería reducir la tormenta glutamatérgica y el exceso de apoptosis dendrítica (59). En este sentido los MAPs de los receptores mGlu2, como el JNJ, que reduce la liberación presináptica de glutamato podría considerarse una de las principales estrategias farmacológicas futuras gracias a sus efectos neuroprotectores dada la prevención de la activación de caspasa-3 y la muerte celular. El uso de este tipo de moduladores de glutamato en periodos críticos como los prodrómicos o el período de transición a la psicosis, cuando podría haber una tormenta neurotóxica de glutamato (361), podría ser clave para prevenir las alteraciones neuropatológicas características de la esquizofrenia, así como para la aparición de síntomas negativos y déficits cognitivos o mejorar su control (13,59). De esta manera, futuros ensayos clínicos utilizando estos MAPs en pacientes en fase prodrómica podrían ser efectivos para retrasar el curso de la enfermedad.

En resumen, el JNJ tiene un efecto antiapoptótico y neuroprotector y podría ser eficaz para la mejora de la sintomatología negativa y déficits cognitivos, con una eficacia superior a la clozapina.

5.3. Limitaciones y puntos fuertes

Para interpretar correctamente los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se deben tener en consideración las limitaciones metodológicas existentes en cada uno de los estudios incluidos.

En el *estudio 1* la estrategia utilizada para seleccionar los procesos biológicos que podrían estar relacionados con las alteraciones metabólicas inducidas por APs podría haberse visto afectada por un sesgo, por lo que no podemos descartar la posible contribución de otros genes que no se incluyeron en nuestro análisis. En segundo lugar, aunque las concentraciones farmacológicas se seleccionaron en base a estudios previos, no se controló los niveles plasmáticos del fármaco al no poder obtener un volumen de sangre suficiente para su determinación con las técnicas disponibles en nuestras instalaciones. Además, la falta de un grupo de ratones

tratados con un AP con bajo riesgo de desregulación metabólica implicó que no se pudo explorar el efecto específico de los APs de riesgo intermedio y alto. Otra limitación de este estudio es que como no se observaron diferencias significativas en los parámetros metabólicos evaluados entre los grupos de tratamiento en ratones, no pudimos correlacionar estas variables con los cambios en la expresión génica inducidos por los APs en estos animales. Esta falta de diferencias significativas puede deberse al diseño experimental, en el que los ratones fueron alimentados con una dieta estándar. No obstante, aunque una dieta alta en grasas podría imitar mejor los efectos clínicos de los APs en los parámetros metabólicos, que se deben en parte a los cambios en el perfil de ingesta de los alimentos, escogimos la dieta estándar para evaluar específicamente los cambios en la expresión génica inducidos por APs, sin la influencia de factores externos.

El principal punto fuerte de nuestro estudio es su diseño traslacional, que incluye la integración de resultados transcriptómicos de diferentes tejidos de ratón que habían sido tratados con APs y la posterior exploración de la influencia de *EP300* en una cohorte humana. Destacar que, a pesar de las limitaciones, pudimos analizar la influencia del gen clave identificado en el deterioro metabólico al evaluar el efecto de los niveles de expresión génica predichos en los pacientes. A pesar de que el tamaño de la muestra de pacientes no nos permitió un estudio de subgrupos estratificados por tratamiento con AP, el análisis estadístico se ajustó a diversas variables como sexo, edad y potencia del AP. No obstante, otros factores de confusión también podrían haber tenido un efecto sobre los rasgos metabólicos evaluados como el diagnóstico, el tratamiento concomitante o la dieta. Finalmente, la predicción de los niveles de expresión génica en esta población estuvo limitada por los modelos de predicción actualmente disponibles. En el futuro, estos modelos podrían incluir más variantes genéticas en base a los avances científicos. Por lo tanto, nuestros resultados deben interpretarse como exploratorios y requieren replicación.

En cuanto al *estudio 2*, cabe señalar que trabajar con el modelo celular de neuroblastoma tiene sus limitaciones. Es difícil obtener resultados terapéuticamente significativos, debido a que los efectos inducidos por los diferentes tratamientos evaluados *in vitro* podrían variar a nivel cerebral en los pacientes con esquizofrenia.

Además, el uso de concentraciones de fármacos distintas a las evaluadas en nuestro estudio podría inducir efectos diferentes en los cultivos celulares. Por otro lado, a pesar de los efectos observados por el JNJ sobre la apoptosis y la viabilidad celular, son necesarios más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares que conducen a los efectos antiapoptóticos ejercidos por el JNJ. Otra limitación de nuestro estudio es haber utilizado un único tipo de modelo *in vitro*, que además se encuentra en un estado indiferenciado. Sería interesante comparar nuestros resultados con el efecto del fármaco en otros modelos celulares. No obstante, la línea celular de neuroblastoma desarrollada por Biedler y cols. (386) muestra propiedades neuronales y es un modelo *in vitro* ampliamente utilizado en la investigación neuropsiquiátrica, incluida la esquizofrenia (207,387). Concretamente, se ha utilizado extensamente en ensayos de citotoxicidad, como por ejemplo en respuesta a neurotoxinas, privación del suero, elevada confluencia celular o cambios de permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que indica que es muy útil como modelo *in vitro* para la evaluación de la neurotoxicidad y la neuroprotección (388). Además, tiene la ventaja de su bajo coste, facilidad de cultivo, reproducibilidad y bibliografía disponible, ya que se ha utilizado ampliamente para probar los efectos farmacológicos, incluidos los APs (340,389,390).

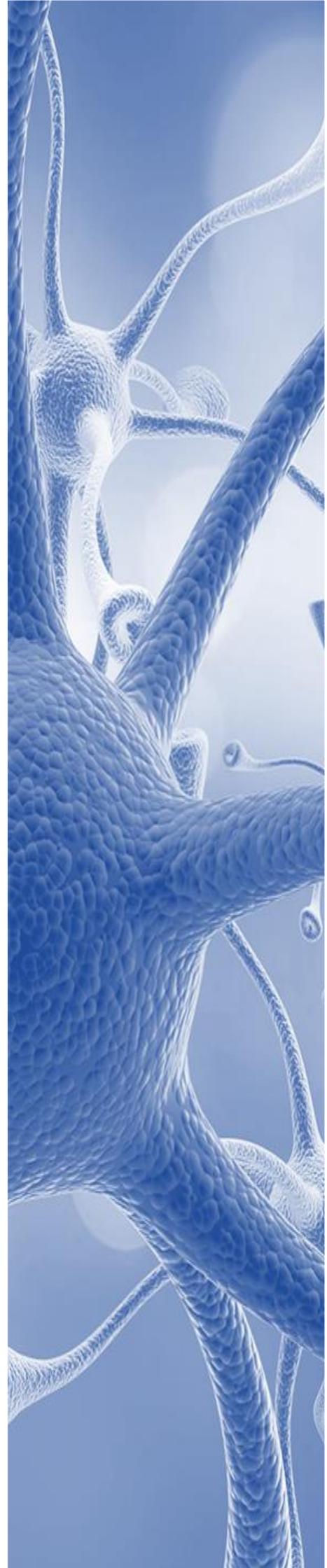
En relación a los *estudios in vivo* 3 y 4 una de las principales limitaciones de estos es el uso de un modelo animal, por su capacidad limitada para mimetizar la complejidad de la esquizofrenia en humanos. No obstante, las limitaciones éticas y prácticas en la experimentación en humanos, hacen que estos modelos sean esenciales. Sin embargo, la gran cantidad de modelos animales reportados dificulta el uso de protocolos similares que permitan generalizar los resultados. Estos modelos pueden diferir en el fármaco utilizado, el tratamiento realizado, las dosis administradas, además de en la cepa y la edad de los animales utilizados (246,347). Otra limitación de nuestros estudios es la falta de realización y análisis de la inmunohistoquímica en los ratones con tratamiento precoz. Estos datos, por un lado, nos aportarían valores de respuesta al tratamiento con clozapina y, por otro lado, nos permitirían comparar el efecto a este nivel del tratamiento con JNJ en dos periodos temporales distintos, lo que complementarían los resultados planteados en esta tesis. Cabe señalar que en

la actualidad estamos realizando estos estudios. Por último, aunque el objetivo fue valorar la eficacia farmacológica en el tratamiento de los síntomas negativos y el déficit cognitivo, para los que no existen alternativas farmacéuticas eficaces, habría sido interesante realizar la prueba de inhibición prepulso para valorar el posible efecto del JNJ sobre la sintomatología positiva (391,392) provocada por nuestro modelo de ketamina (393).

Cabe señalar como fortaleza en nuestros estudios *in vivo* el hecho de incluir ambos sexos en los experimentos y evaluar su efecto en los parámetros analizados dado que se han reportado diferencias sexuales en varias características relacionadas con la esquizofrenia y en la respuesta farmacológica tanto en humanos como en animales (394). Además, se utilizó una proporción similar de machos y hembras, ya que es importante incluir una representación pareja en este tipo de investigación preclínica para generalizar a toda la población (395).

6.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

1. El análisis de coexpresión génica en tejidos de ratones tratados con risperidona u olanzapina ha permitido identificar genes comunes relacionados con las alteraciones metabólicas inducidas por APs.
2. El gen *EP300* es clave en las alteraciones metabólicas inducidas por APs, lo que indica que la desregulación de la función de p300 podría ser importante en el desarrollo de estos efectos secundarios.
3. Los niveles de expresión predichos de *EP300* en pacientes con un PEP tratados con APs se encuentran significativamente asociados con alteraciones metabólicas de estos pacientes.
4. *EP300* y los genes implicados en su red de interacción podrían considerarse posibles genes candidatos para futuros estudios farmacogenéticos del síndrome metabólico inducido por APs.
5. El fármaco JNJ-46356479 no es neurotóxico y atenúa la apoptosis, particularmente la activación de caspasa-3 inducida por altas concentraciones de dopamina y glutamato, en cultivos celulares de neuroblastoma.
6. En comparación con la clozapina, el JNJ-46356479 parece ser menos neurotóxico y más neuroprotector en una línea celular de neuroblastoma.
7. La administración de ketamina en ratón los días 7, 9 y 11 postnatales provoca déficits cognitivos y conductuales observados en la edad adulta.
8. En el modelo animal de esquizofrenia expuesto a ketamina postnatal, el tratamiento en ratones adultos con JNJ-46356479 revirtió los déficits cognitivos y sociales observados en la prueba del laberinto en Y, la prueba de las tres cámaras y la prueba de la memoria social de las cinco exposiciones.

9. En el modelo animal de esquizofrenia expuesto a ketamina postnatal, el tratamiento en ratones adultos con JNJ-46356479 atenuó los cambios neuropatológicos, incrementando los niveles de expresión de PV en el hipocampo y en el GD, así como atenuando los niveles de c-Fos en las mismas áreas.

10. En el modelo animal de esquizofrenia expuesto a ketamina postnatal, el tratamiento precoz durante la adolescencia de los ratones con JNJ-46356479 mejoró los déficits cognitivos y sociales en la prueba de la tarea de reconocimiento de objeto nuevo, la prueba de las tres cámaras, y la prueba de la memoria social de las cinco exposiciones.

11. En el modelo animal de esquizofrenia expuesto a ketamina postnatal, el tratamiento precoz durante la adolescencia de los ratones con clozapina mejoró los déficits observados en la prueba de la memoria social de las cinco exposiciones. Sin embargo, en comparación con el tratamiento con JNJ-46356479, la clozapina demostró ser menos eficaz.

7.

BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Moskowitz A, Heim G. Eugen Bleuler's Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias (1911): A centenary appreciation and reconsideration. *Schizophrenia Bulletin*. 2011 May; 37(3):471–9.
2. World Health Organization (WHO). Trastornos mentales. 2019. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>
3. Moreno-Küstner B, Martín C, Pastor L. Prevalence of psychotic disorders and its association with methodological issues. A systematic review and meta-analyses. *PLoS One*. 2018; 13(4): e0195687.
4. Abel KM, Drake R, Goldstein JM. Sex differences in schizophrenia. *International Review of Psychiatry*. 2010 Oct; 22(5):417–28.
5. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev*. 2008 Nov; 30(1):67–76.
6. Ringen PA, Engh JA, Birkenaes AB, Dieset I, Andreassen OA. Increased mortality in schizophrenia due to cardiovascular disease - a non-systematic review of epidemiology, possible causes and interventions. *Frontiers in Psychiatry*. 2014; 5(SEP):137.
7. Bai W, Liu ZH, Jiang YY, Zhang QE, Rao WW, Cheung T, et al. Worldwide prevalence of suicidal ideation and suicide plan among people with schizophrenia: a meta-analysis and systematic review of epidemiological surveys. *Translational Psychiatry*. 2021 Dec 1; 11(1).
8. Barch DM, Bustillo J, Gaebel W, Gur R, Heckers S, Malaspina D, et al. Logic and justification for dimensional assessment of symptoms and related clinical phenomena in psychosis: Relevance to DSM-5. *Schizophrenia Research*. 2013 Oct 1; 150(1):15–20.
9. Larson MK, Walker EF, Compton MT. Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. *Expert Rev Neurother*. 2010 Aug; 10(8):1347.
10. McClellan J, McCurry C, Speltz ML, Jones K. Symptom factors in early-onset psychotic disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2002; 41(7):791–8.
11. Harrow M, Jobe TH, Faull RN. Does treatment of schizophrenia with antipsychotic medications eliminate or reduce psychosis? A 20-year multi-follow-up study. *Psychol Med*. 2014 Oct 1; 44(14):3007–16.
12. Jääskeläinen E, Juola P, Hirvonen N, McGrath JJ, Saha S, Isohanni M, et al. A systematic review and meta-analysis of recovery in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2013 Nov; 39(6):1296–306.
13. Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G, Cadenhead K, Dazzan P, Fusar-Poli P, et al. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016 Jul; 15(7):485–515.

14. Molnar MJ, Jimoh IJ, Zeke H, Palásti Á, Fedor M. Early-Onset Schizophrenia with predominantly negative symptoms: a case study of a drug-naive female patient treated with cariprazine. *Frontiers in Pharmacology*. 2020 Apr 23; 11:477.
15. Ho B, Black D, Andreasen N. Esquizofrenia y otros trastornos psicóticos. In: *Fundamentos de psiquiatría clínica*. 2nd ed. Ed. Masson; 2005. p. 201–57.
16. Perkins DO, Gu H, Boteva K, Lieberman JA. Relationship between duration of untreated psychosis and outcome in first-episode schizophrenia: a critical review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2005 Oct; 162(10):1785–804.
17. Association AP. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders fifth edition: DSM-V*. Ed. Médica Panamericana 2013.
18. van Os J, Rutten BPF, Poulton R. Gene-environment interactions in schizophrenia: review of epidemiological findings and future directions. *Schizophr Bull*. 2008 Nov; 34(6):1066–82.
19. Shepherd AM, Laurens KR, Matheson SL, Carr VJ, Green MJ. Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Apr;36(4):1342–56.
20. van Erp TGM, Hibar DP, Rasmussen JM, Glahn DC, Pearlson GD, Andreassen OA, et al. Subcortical brain volume abnormalities in 2028 individuals with schizophrenia and 2540 healthy controls via the ENIGMA consortium. *Mol Psychiatry*. 2016 Apr; 21(4):547–53.
21. Rimol LM, Hartberg CB, Nesvåg R, Fennema-Notestine C, Hagler DJ, Pung CJ, et al. Cortical thickness and subcortical volumes in schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2010 Jul 1; 68(1):41–50.
22. Hill K, Mann L, Laws KR, Stephenson CME, Nimmo-Smith, McKenna PJ. Hypofrontality in schizophrenia: a meta-analysis of functional imaging studies. *Acta Psychiatr Scand* 2004 Oct; 110(4):243–56.
23. Sedvall G. Monoamines and schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1990; 358:7–13.
24. Salavati B, Rajji TK, Price R, Sun Y, Graff-Guerrero A, Daskalakis ZJ. Imaging-based neurochemistry in schizophrenia: a systematic review and implications for dysfunctional long-term potentiation. *Schizophr Bull*. 2015 Jan 1; 41(1):44–56.
25. Delay J, Deniker P, Harl JM. [Therapeutic use in psychiatry of phenothiazine of central elective action (4560 RP)]. *Annales Medico-Psychologiques*. 1952; 110(21):112–7.
26. Carlsson A, Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on the formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1963; 20(2):140–4.
27. van Rossum JM. The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. 1966 Apr; 160(2):492–4.
28. Lau CI, Wang HC, Hsu JL, Liu ME. Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia? *Reviews in the Neurosciences*. 2013 Aug 1; 24(4):389–400.

29. Angrist B, Lee HK, Gershon S. The antagonism of amphetamine induced symptomatology by a neuroleptic. *American Journal of Psychiatry*. 1974; 131(7):817–9.
30. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 1976 261:5562. 1976 Jun 1; 261(5562):717–9.
31. Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 1991; 148(11):1474–86.
32. Kambeitz J, Abi-Dargham A, Kapur S, Howes OD. Alterations in cortical and extrastriatal subcortical dopamine function in schizophrenia: systematic review and meta-analysis of imaging studies. *The British Journal of Psychiatry*. 2014; 204(6):420–9.
33. Yui K, Ikemoto S, Ishiguro T, Goto K. Studies of amphetamine or methamphetamine psychosis in Japan: relation of methamphetamine psychosis to schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 914:1–12.
34. Lim J, Lee SA, Lam M, Rapisarda A, Kraus M, Keefe RSE, et al. The relationship between negative symptom subdomains and cognition. *Psychol Med*. 2016 Jul 1; 46(10):2169–77.
35. Eggers AE. A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Medical Hypotheses*. 2013 Jun 1; 80(6):791–4.
36. Abel KM, O’Keane V, Murray RM. Enhancement of the prolactin response to d-fenfluramine in drug-naive schizophrenic patients. *Br J Psychiatry*. 1996; 168(1):57–60.
37. Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Mar; 31(2–3):302–12.
38. van Praag HM. Serotonergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. In: *New biological vistas of schizophrenia*. New York: In J. P. Lindenmayer & S. R. Kay; 1992. p. 182–206.
39. Sifakis S, Tzachanis D, Samara M, Papazisis G. Antipsychotic drugs: from receptor-binding profiles to metabolic side effects. *Current Neuropharmacology*. 2018 Jul 8; 16(8):1210.
40. Hashimoto T, Nishino N, Nakai H, Tanaka C. Increase in serotonin 5-HT_{1A} receptors in prefrontal and temporal cortices of brains from patients with chronic schizophrenia. *Life Sci*. 1991; 48(4):355–63.
41. Arora RC, Meltzer HY. Serotonin₂ (5-HT₂) receptor binding in the frontal cortex of schizophrenic patients. *J Neural Transm Gen Sect*. 1991 Feb; 85(1):19–29.
42. Laruelle M, Abi-Dargham A, Casanova MF, Toti R, Weinberger DR, Kleinman JE. Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. A postmortem study. *Arch Gen Psychiatry*. 1993; 50(10):810–8.
43. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience Letters*. 1980 Dec 1; 20(3):379–82.
44. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1991; 148(10):1301–8.

45. Coyle JT. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry*. 1996; 3(5):241–53.
46. Coyle JT. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26(4–6):365–84.
47. Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Jan; 37(1):4–15.
48. Erard R, Luisada P v., Peele R. The PCP Psychosis: Prolonged Intoxication or Drug-Precipitated Functional Illness? 2012; 12(3–4):235–51.
49. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry*. 1994; 51(3):199–214.
50. Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, Pickar D, et al. Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1999; 156(10):1646–9.
51. Pilowsky LS, Bressan RA, Stone JM, Erlandsson K, Mulligan RS, Krystal JH, et al. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol Psychiatry*. 2006 Feb; 11(2):118–9.
52. Catts VS, Lai YL, Weickert CS, Weickert TW, Catts S v. A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical N-methyl-D-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? *Biol Psychol*. 2016 Apr 1; 116:57–67.
53. Weinberger DR, Nasrallah HA. The neurology of schizophrenia. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier; 1986. 397–406 p.
54. Murray RM, Lewis SW, Lecturer L. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 Sep 19; 295(6600):681–2.
55. Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia Bulletin*. 2009 May; 35(3):528.
56. Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Mol Psychiatry*. 2012 Dec; 17(12):1228–38.
57. Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature*. 2010 Nov; 468(7321):187–93.
58. Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, Craddock N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2011 Mar; 198(3):173–5.
59. Parellada E, Gassó P. Glutamate and microglia activation as a driver of dendritic apoptosis: a core pathophysiological mechanism to understand schizophrenia. *Translational Psychiatry* 2021 11:1. 2021 May 6; 11(1):1–13.
60. Jarskog LF, Selinger ES, Lieberman JA, Gilmore JH. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *American Journal of Psychiatry*. 2004 Jan 1; 161(1):109–15.

61. Yuede CM, Wozniak DF, Creeley CE, Taylor GT, Olney JW, Farber NB. Behavioral consequences of NMDA antagonist-induced neuroapoptosis in the infant mouse brain. *PLoS ONE*. 2010;5(6).
62. Glausier JR, Lewis DA. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience*. 2013 Oct; 251:90–107.
63. Tye KM, Deisseroth K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Apr; 13(4):251–66.
64. Lee S, Zhang H, Webb DJ. Dendritic spine morphology and dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*. 2015 Jun 3; 7:121–31.
65. Hilker R, Helenius D, Fagerlund B, Skytthe A, Christensen K, Werge TM, et al. Heritability of schizophrenia and schizophrenia spectrum based on the nationwide danish twin register. *Biol Psychiatry*. 2018 Mar 15; 83(6):492–8.
66. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Dec; 60(12):1187–92.
67. McDonald C, Murphy KC. The new genetics of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am*. 2003 Mar; 26(1):41–63.
68. Gottesman I. Schizophrenia genesis: The origins of madness. Wolfgram L, Freeman WH, editors. New York; 1991. XIII–296.
69. St Clair D, Blackwood D, Muir W, Walker M, St Clair D, Muir W, et al. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *The Lancet*. 1990 Jul 7; 336(8706):13–6.
70. Karayiorgou M, Morris MA, Morrow B, Shprintzen RJ, Goldberg R, Borrow J, et al. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15; 92(17):7612–6.
71. Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev M v., et al. Genetic variation in the 6p22.3 gene *DTNBP1*, the human ortholog of the mouse *dysbindin* gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2002; 71(2):337–48.
72. Riley B. Linkage studies of schizophrenia. *Neurotox Res*. 2004; 6(1):17–34.
73. Cichon S, Nöthen MM, Stöber G, Schroers R, Albus M, Maier W, et al. Systematic screening for mutations in the 5'-regulatory region of the human dopamine D1 receptor (*DRD1*) gene in patients with schizophrenia and bipolar affective disorder. *American Journal of Medical Genetics*. 1996 Jul 26; 67(4):424–8.
74. Glatt SJ, Jönsson EG. The Cys allele of the *DRD2* Ser311Cys polymorphism has a dominant effect on risk for schizophrenia: evidence from fixed- and random-effects meta-analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006 Mar 5; 141B(2):149–54.
75. Fanous AH, Neale MC, Straub RE, Webb BT, O'Neill AF, Walsh D, et al. Clinical features of psychotic disorders and polymorphisms in *HT2A*, *DRD2*, *DRD4*, *SLC6A3* (*DAT1*), and *BDNF*: a family based association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004 Feb 15; 125B(1):69–78.

76. Jönsson EG, Kaiser R, Brockmöller J, Nimgaonkar VL, Crocq MA. Meta-analysis of the dopamine D3 receptor gene (DRD3) Ser9Gly variant and schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 2004 Mar; 14(1):9–12.
77. Li D, He L. Meta-analysis shows association between the tryptophan hydroxylase (TPH) gene and schizophrenia. *Hum Genet*. 2006 Aug; 120(1):22–30.
78. Xia X, Ding M, Xuan JF, Xing JX, Yao J, Wu X, et al. Functional polymorphisms and transcriptional analysis in the 5' region of the human serotonin receptor 1B gene (HTR1B) and their associations with psychiatric disorders. *BMC Psychiatry*. 2020 Oct 9; 20(1).
79. Golimbet VE, Lavrushina OM, Kaleda VG, Abramova LI, Lezheiko T v. Supportive evidence for the association between the T102C 5-HTR2A gene polymorphism and schizophrenia: a large-scale case-control and family-based study. *Eur Psychiatry*. 2007 Apr; 22(3):167–70.
80. Watanabe Y, Nunokawa A, Kaneko N, Someya T. The tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) gene and risk of schizophrenia: a moderate-scale case-control study and meta-analysis. *Neurosci Res*. 2007 Nov; 59(3):322–6.
81. Fan JB, Sklar P. Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005 Oct; 10(10):928–38.
82. Deng X, Shibata H, Takeuchi N, Rachi S, Sakai M, Ninomiya H, et al. Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes SLC1A1, SLC1A3, and SLC1A6 with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Apr 5; 144B(3):271–8. 7
83. Saini SM, Mancuso SG, Mostaid MS, Liu C, Pantelis C, Everall IP, et al. Meta-analysis supports GWAS-implicated link between GRM3 and schizophrenia risk. *Transl Psychiatry*. 2017 Aug 8; 7(8):e1196.
84. Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh KH, Holmans PA, et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014; 511(7510):421–7.
85. Pardiñas AF, Holmans P, Pocklington AJ, Escott-Price V, Ripke S, Carrera N, et al. Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nat Genet*. 2018; 50(3):381–9.
86. Trubetskoy V, Pardiñas AF, Qi T, Panagiotaropoulou G, Awasthi S, Bigdeli TB, et al. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*. 2022 Apr 21; 604(7906):502–8.
87. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 2009 Aug 6; 460(7256):748–52.
88. Bennett MR. Schizophrenia: susceptibility genes, dendritic-spine pathology and gray matter loss. *Prog Neurobiol*. 2011 Nov; 95(3):275–300.
89. Stilo SA, Murray RM. Non-genetic factors in schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*. 2019 Oct 1; 21(10):1–10.

90. Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, Webb RT, Baker PN, et al. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*. 2008 Feb; 65(2):146–52.
91. Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med*. 2013 Feb; 43(2):239–57.
92. McClellan JM, Susser E, King MC. Maternal famine, de novo mutations, and schizophrenia. *JAMA*. 2006 Aug 2; 296(5):582–4.
93. Eyles DW, Trzaskowski M, Vinkhuyzen AAE, Mattheisen M, Meier S, Gooch H, et al. The association between neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia. *Scientific Reports*. 2018 Dec 1; 8(1).
94. Brown AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol*. 2011 Jan; 93(1):23–58.
95. Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry*. 2002; 159(7):1080–92.
96. Rubio-Abadal E, Ochoa S, Barajas A, Baños I, Dolz M, Sanchez B, et al. Birth weight and obstetric complications determine age at onset in first episode of psychosis. *J Psychiatr Res*. 2015 Jun 1; 65:108–14.
97. Vassos E, Pedersen CB, Murray RM, Collier DA, Lewis CM. Meta-analysis of the association of urbanicity with schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2012 Nov; 38(6):1118–23.
98. Wicks S, Hjern A, Gunnell D, Lewis G, Dalman C. Social adversity in childhood and the risk of developing psychosis: a national cohort study. *Am J Psychiatry*. 2005 Sep; 162(9):1652–7.
99. Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry*. 2005 Jan; 162(1):12–24.
100. 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. *Schizophr Bull*. 2003; 29(3):587–93.
101. Hubert A, Szöke A, Leboyer M, Schürhoff F. [Influence of paternal age in schizophrenia]. *L'Encephale*. 2011 Jun; 37(3):199–206.
102. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012 Aug 23; 488(7412):471–5.
103. Godin S, Shehata S. Adolescent cannabis use and later development of schizophrenia: An updated systematic review of longitudinal studies. *J Clin Psychol*. 2022 Jan 11; 78(7), 1331–40.
104. López-Muñoz F, Alamo C, Cuenca E, Shen WW, Clervoy P, Rubio G. History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Ann Clin Psychiatry*. 2005 Jul; 17(3):113–35.

105. Ritter JM, Rod J F, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Rang and Dale's Pharmacology. 9th Edition. 2018.
106. Leucht S, Komossa K, Rummel-Kluge C, Corves C, Hunger H, Schmid F, et al. A meta-analysis of head-to-head comparisons of second-generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2009 Feb; 166(2):152–63.
107. Brandl EJ, Kennedy JL, Müller DJ. Pharmacogenetics of antipsychotics. *Can J Psychiatry*. 2014; 59(2):76–88.
108. Seeman P. Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology*. 1992; 7(4):261–84.
109. Farde L, Nordström AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine: relation to extrapyramidal side effects. *Archives of General Psychiatry*. 1992; 49(7):538–44.
110. Farde L, Wiesel FA, Nordström AL, Sedvall G. D1- and D2-dopamine receptor occupancy during treatment with conventional and atypical neuroleptics. *Psychopharmacology* 1989 99:1. 1989 Mar; 99(1):S28–31.
111. Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. Relationship between dopamine D2 occupancy, clinical response, and side effects: A double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 2000 Apr; 157(4):514–20.
112. Sharif Z, Miyamoto S, Lieberman JA. Pharmacotherapy of schizophrenia. *Handbook of contemporary neuropharmacology*. 2007 Mar 2.
113. Kapur S, Zipursky R, Jones C, Shammi CS, Remington G, Seeman P. A positron emission tomography study of quetiapine in schizophrenia: A preliminary finding of an antipsychotic effect with only transiently high dopamine D2 receptor occupancy. *Archives of General Psychiatry*. 2000; 57(6):553–9.
114. Horacek J, Bubenikova-Valesova V, Kopecek M, Palenicek T, Dockery C, Mohr P, et al. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs*. 2006; 20(5):389–409.
115. Lieberman JA. Dopamine partial agonists: A new class of antipsychotic. *CNS Drugs*. 2004 Aug 29; 18(4):251–67.
116. Potkin SG, Saha AR, Kujawa MJ, Carson WH, Ali M, Stock E, et al. Aripiprazole, an antipsychotic with a novel mechanism of action, and risperidone vs placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Archives of General Psychiatry*. 2003 Jul 1; 60(7):681–90.
117. Labelle A, de Beaupaire R, Boulay LJ, Naber D, Jones BD, Barnes TRE. A pilot study of the safety and tolerance of SCH 39166 in patients with schizophrenia. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 1998; 23(2):93.
118. Meltzer HY, Huang M. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Progress in Brain Research*. 2008 Jan 1; 172:177–97.

119. Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1989; 251(1).
120. Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1996 Apr; 153(4):466–76.
121. Trichard C, Paillère-Martinot ML, Attar-Levy D, Recassens C, Monnet F, Martinot JL. Binding of antipsychotic drugs to cortical 5-HT_{2A} receptors: a PET study of chlorpromazine, clozapine, and amisulpride in schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*. 1998; 155(4):505–8.
122. Yokoi F, Gründer G, Biziere K, Stephane M, Dogan AS, Dannals RF, et al. Dopamine D₂ and D₃ receptor occupancy in normal humans treated with the antipsychotic drug aripiprazole (OPC 14597): a study using positron emission tomography and [¹¹C] raclopride. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27(2):248–59.
123. de Paulis T. M-100907 Aventis. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2001; 2(1):123–32.
124. Newman-Tancredi A. The importance of 5-HT_{1A} receptor agonism in antipsychotic drug action: rationale and perspectives. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010 Jul; 11(7):802–12.
125. Meltzer HY. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 21(2 Suppl):106S-115S.
126. Haleem DJ. 5-HT_{1A} receptor-dependent control of nigrostriatal dopamine neurotransmission in the pharmacotherapy of Parkinson's disease and schizophrenia. *Behavioural pharmacology*. 2015; 26(1–2):45–58.
127. Razakarivony O, Newman-Tancredi A, Zimmer L. Towards in vivo imaging of functionally active 5-HT_{1A} receptors in schizophrenia: concepts and challenges. *Transl Psychiatry*. 2021 Jun 1; 11(1).
128. Gómez-Ayala AE. Farmacoterapia de la esquizofrenia. *Farmacia Profesional*. 2006 Oct; 20(9):73–8.
129. Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev*. 1998 Dec; 50(4):597–664.
130. Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Alho H, Guidotti A, Costa E. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 1986 Jul; 6(7):1905–11.
131. Muguruza C, Meana JJ, Callado LF. Group II metabotropic glutamate receptors as targets for novel antipsychotic drugs. *Frontiers in Pharmacology*. 2016;7(MAY):130.
132. Wierońska JM, Zorn SH, Doller D, Pilc A. Metabotropic glutamate receptors as targets for new antipsychotic drugs: Historical perspective and critical comparative assessment. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016 Jan 1; 157:10–27.
133. Maksymetz J, Moran SP, Conn PJ. Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Molecular Brain* 2017 10:1. 2017 Apr 26; 10(1):1–19.

134. Li ML, Hu XQ, Li F, Gao WJ. Perspectives on the mGluR2/3 agonists as a therapeutic target for schizophrenia: Still promising or a dead end? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2015 Jul 3; 60:66–76.
135. Wright RA, Johnson BG, Zhang C, Salhoff C, Kingston AE, Calligaro DO, et al. CNS distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors: Transgenic mice and [3H]LY459477 autoradiography. *Neuropharmacology*. 2013 Mar 1; 66:89–98.
136. Ohishi H, Neki A, Mizuno N. Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neuroscience Research*. 1998 Jan 1; 30(1):65–82.
137. Cartmell J, Schoepp DD. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*. 2000 Sep 1; 75(3):889–907.
138. Conn PJ, Tamminga C, Schoepp DD, Lindsley C. Schizophrenia: moving beyond monoamine antagonists. *Mol Interv*. 2008 Apr; 8(2):99–107.
139. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Örey D, Richter F, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*. 2013; 382(9896):951–62.
140. Harvey PD, Loewenstein DA, Czaja SJ. Hospitalization and Psychosis: Influences on the Course of Cognition and Everyday Functioning in People with Schizophrenia. *Neurobiol Dis*. 2013 May; 53:18.
141. Patel KR, Cherian J, Gohil K, Atkinson D. Schizophrenia: overview and treatment options. *Pharmacy and Therapeutics*. 2014 Sep 1; 39(9):638.
142. Higashi K, Medic G, Littlewood KJ, Diez T, Granström O, de Hert M. Medication adherence in schizophrenia: factors influencing adherence and consequences of nonadherence, a systematic literature review. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. 2013; 3(4):200.
143. Haddad PM, Correll CU. The acute efficacy of antipsychotics in schizophrenia: a review of recent meta-analyses. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. 2018 Nov; 8(11):303.
144. Elkis H. Treatment-resistant schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am*. 2007 Sep; 30(3):511–33.
145. Povlsen UJ, Norrng U, Fog R, Gerlach J. Tolerability and therapeutic effect of clozapine. A retrospective investigation of 216 patients treated with clozapine for up to 12 years. *Acta Psychiatr Scand*. 1985; 71(2):176–85.
146. Meltzer HY. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989 Mar; 99 Suppl (1 Supplement).
147. Pahwa M, Sleem A, Elsayed OH, Good ME, El-Mallakh RS. New antipsychotic medications in the last decade. *Curr Psychiatry Rep*. 2021 Dec 1; 23(12).
148. Moghaddam B, Adams BW. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science*. 1998 Aug 28; 281(5381):1349–52.

149. Cartmell J, Monn JA, Schoepp DD. Tolerance to the motor impairment, but not to the reversal of PCP- induced motor activities by oral administration of the mGlu2/3 receptor agonist, LY379268. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2000; 361(1):39–46.
150. Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev B v., et al. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med*. 2007 Sep; 13(9):1102–7.
151. Kasper S. Risperidone and olanzapine: optimal dosing for efficacy and tolerability in patients with schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*. 1998; 13(6):253–62.
152. Divac N, Prostran M, Jakovcevski I, Cerovac N. Second-generation antipsychotics and extrapyramidal adverse effects. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:656370.
153. Üçok A, Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008; 7(1):58–62.
154. Howes OD, Bhatnagar A, Gaughran FP, Amiel SA, Murray RM, Pilowsky LS. A prospective study of impairment in glucose control caused by clozapine without changes in insulin resistance. *Am J Psychiatry*. 2004 Feb;161(2):361–3.
155. Fernandez-Egea E, Miller B, Garcia-Rizo C, Bernardo M, Kirkpatrick B. Metabolic effects of olanzapine in patients with newly diagnosed psychosis. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2011 Apr; 31(2):154–9.
156. Foley DL, Morley KI. Systematic review of early cardiometabolic outcomes of the first treated episode of psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Jun; 68(6):609–16.
157. Ward A, Quon P, Abouzaid S, Haber N, Ahmed S, Kim E. Cardiometabolic consequences of therapy for chronic schizophrenia using second-generation antipsychotic agents in a medicaid population: clinical and economic evaluation. *Pharmacy and Therapeutics*. 2013; 38(2):109.
158. Tek C, Kucukgoncu S, Guloksuz S, Woods SW, Srihari VH, Annamalai A. Antipsychotic-induced weight gain in first-episode psychosis patients: a meta-analysis of differential effects of antipsychotic medications. *Early Intervention in Psychiatry*. 2016 Jun; 10(3):193–202.
159. de Hert M, Detraux J, van Winkel R, Yu W, Correll CU. Metabolic and cardiovascular adverse effects associated with antipsychotic drugs. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011 Oct 18; 8(2):114–26.
160. Vancampfort D, Stubbs B, Mitchell AJ, de Hert M, Wampers M, Ward PB, et al. Risk of metabolic syndrome and its components in people with schizophrenia and related psychotic disorders, bipolar disorder and major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. *World Psychiatry*. 2015 Oct; 14(3):339–47.
161. Carney R, Cotter J, Bradshaw T, Firth J, Yung AR. Cardiometabolic risk factors in young people at ultra-high risk for psychosis: A systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res*. 2016 Feb 1; 170(2–3):290–300.
162. Emul M, Kalelioglu T. Etiology of cardiovascular disease in patients with schizophrenia: current perspectives. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015 Oct 1; 11:2493–503.

163. Robinson D, Woerner MG, Alvir JM, Bilder R, Goldman R, Geisler S, et al. Predictors of relapse following response from a first episode of schizophrenia or schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1999; 56(3):241–7.
164. Haddad PM, Brain C, Scott J. Nonadherence with antipsychotic medication in schizophrenia: challenges and management strategies. *Patient Related Outcome Measures*. 2014 Jun; 5:43.
165. Cortés Morales B. Síndrome metabólico y antipsicóticos de segunda generación. *Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría*. 2011 Jun; 31(2):303–20.
166. Stahl SM, Mignon L, Meyer JM. Which comes first: atypical antipsychotic treatment or cardiometabolic risk? *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2009 Mar 1; 119(3):171–9.
167. Shams TA, Müller DJ. Antipsychotic induced weight gain: genetics, epigenetics, and biomarkers reviewed. *Current Psychiatry Reports*. 2014 Oct;16(10):473.
168. Mukundan A, Faulkner G, Cohn T, Remington G. Antipsychotic switching for people with schizophrenia who have neuroleptic-induced weight or metabolic problems. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010 Dec 8; (12).
169. Edlinger M, Baumgartner S, Eltanaihi-Furtmüller N, Hummer M, Fleischhacker WW. Switching between second-generation antipsychotics: why and how? *CNS Drugs*. 2005; 19(1):27–42.
170. Bzdok D, Meyer-Lindenberg A. Machine learning for precision psychiatry: opportunities and challenges. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2018 Mar 1; 3(3):223–30.
171. Penttilä M, Jääskeläinen E, Hirvonen N, Isohanni M, Miettunen J. Duration of untreated psychosis as predictor of long-term outcome in schizophrenia: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2014; 205(2):88–94.
172. Immonen J, Jääskeläinen E, Korpela H, Miettunen J. Age at onset and the outcomes of schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Early Interv Psychiatry*. 2017 Dec 1; 11(6):453–60.
173. Ran MS, Xiao Y, Zhao X, Zhang TM, Yu YH, Mao WJ, et al. Family history of psychosis and outcome of people with schizophrenia in rural China: 14-year follow-up study. *Asian J Psychiatr*. 2018 Feb 1; 32:14–9.
174. Díaz-Caneja CM, Pina-Camacho L, Rodríguez-Quiroga A, Fraguas D, Parellada M, Arango C. Predictors of outcome in early-onset psychosis: a systematic review. *NPJ Schizophr*. 2015; 1:14005.
175. Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*. 2000; 28(2):325–34.
176. Wong AHC, van Tol HHM. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003; 27(3):269–306.
177. Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, Bartko JJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol Psychiatry*. 2005 Feb 1; 57(3):252–60.

178. Knable MB, Torrey EF, Webster MJ, Bartko JJ. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Res Bull*. 2001 Jul 15; 55(5):651–9.
179. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Veldic M, et al. GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Jul; 180(2):191–205.
180. Beneyto M, Kristiansen L v., Oni-Orisan A, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH. Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Sep; 32(9):1888–902.
181. Baumann B, Bogerts B. The pathomorphology of schizophrenia and mood disorders: similarities and differences. *Schizophr Res*. 1999 Sep 29; 39(2):141–8.
182. Pierri JN, Volk CLE, Auh S, Sampson A, Lewis DA. Decreased somal size of deep layer 3 pyramidal neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2001; 58(5):466–73.
183. Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex*. 2002; 12(4):386–94.
184. Kolluri N, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2005 Jun; 162(6):1200–2.
185. Rosoklija G, Toomayan G, Ellis SP, Keilp J, Mann JJ, Latov N, et al. Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57(4):349–56.
186. Potkin SG, Alva G, Fleming K, Anand R, Keator D, Carreon D, et al. A PET study of the pathophysiology of negative symptoms in schizophrenia. *Positron emission tomography*. *Am J Psychiatry*. 2002; 159(2):227–37.
187. Cannon TD, Glahn DC, Kim J, van Erp TGM, Karlsgodt K, Cohen MS, et al. Dorsolateral prefrontal cortex activity during maintenance and manipulation of information in working memory in patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Oct; 62(10):1071–80.
188. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011 Oct 1; 70(7):663–71.
189. Ahmed AO, Kramer S, Hofman N, Flynn J, Hansen M, Martin V, et al. A Meta-analysis of brain-derived neurotrophic f effects on brain volume in schizophrenia: genotype and serum levels. *Neuropsychobiology*. 2021 Oct 1; 80(5):411–24.
190. Martínez-Pinteño A, Mezquida G, Bioque M, López-Ilundain JM, Andreu-Bernabeu Á, Zorrilla I, et al. The role of BDNF and NGF plasma levels in first-episode schizophrenia: A longitudinal study. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2022 Apr; 57:105–17.

191. Mata I, Madoz V, Arranz MJ, Sham P, Murray RM. Olanzapine: concordant response in monozygotic twins with schizophrenia. *The British Journal of Psychiatry*. 2001; 178(1):86–86.
192. Müller DJ, Schulze TG, Knapp M, Held T, Krauss H, Weber T, et al. Familial occurrence of tardive dyskinesia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2001 Nov 1; 104(5):375–9.
193. Rahmioğlu N, Ahmadi KR. Classical twin design in modern pharmacogenomics studies. *Pharmacogenomics*. 2010 Feb; 11(2):215–26.
194. Lee BS, McIntyre RS, Gentle JE, Park NS, Chiriboga DA, Lee Y, et al. A computational algorithm for personalized medicine in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2018 Feb 1; 192:131–6.
195. Cao B, Cho RY, Chen D, Xiu M, Wang L, Soares JC, et al. Treatment response prediction and individualized identification of first-episode drug-naïve schizophrenia using brain functional connectivity. *Molecular Psychiatry*. 2018 Jun 19; 25(4):906–13.
196. Mas S, Gassó P, Rodríguez N, Cabrera B, Mezquida G, Lobo A, et al. Personalized medicine begins with the phenotype: identifying antipsychotic response phenotypes in a first-episode psychosis cohort. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2020 Jun 1; 141(6):541–52.
197. Schlachetzki JCM, Saliba SW, de Oliveira ACP. Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)*. 2013; 35 Suppl 2(SUPPL.2).
198. Gassó P, Mas S, Molina O, Lafuente A, Bernardo M, Parellada E. Increased susceptibility to apoptosis in cultured fibroblasts from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients. *Journal of Psychiatric Research*. 2014 Jan 1; 48(1):94–101.
199. Mahadik SP, Mukherjee S. Cultured skin fibroblasts as a cell model for investigating schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 1996; 30(6):421–39.
200. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30; 131(5):861–72.
201. Chang CY, Ting HC, Liu CA, Su HL, Chiou TW, Harn HJ, et al. Induced Pluripotent Stem Cells: A Powerful Neurodegenerative Disease Modeling Tool for Mechanism Study and Drug Discovery. *Cell Transplant*. 2018 Nov; 27(11):1588–602.
202. Biehl JK, Russell B. Introduction to stem cell therapy. *J Cardiovasc Nurs*. 2009; 24(2):98-103.
203. Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011 473:7346. 2011 Apr 13; 473(7346):221–5.
204. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255(5052):1707–10.
205. Coulthard LG, Hawksworth OA, Li R, Balachandran A, Lee JD, Seppehrband F, et al. Complement C5aR1 signaling promotes polarization and proliferation of embryonic neural progenitor cells through PKC ζ . *J Neurosci*. 2017 May 31; 37(22):5395–407.

-
206. Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, et al. Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Transl Psychiatry*. 2016 Nov 1; 6(11).
 207. Abashkin DA, Kurishev AO, Karpov DS, Golimbet VE. Cellular Models in schizophrenia research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Aug 2; 22(16).
 208. Słońska A, Cymerys J. Application of three-dimensional neuronal cell cultures in the studies of mechanisms of neurodegenerative diseases. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2017 Jun 19; 71(0):510–9.
 209. Sun Z, Williams DJ, Xu B, Gogos JA. Altered function and maturation of primary cortical neurons from a 22q11.2 deletion mouse model of schizophrenia. *Translational Psychiatry*. 2018 Dec 1; 8(1):85.
 210. Zhang Q, Esrafilzadeh D, Crook JM, Kapsa R, Stewart EM, Tomaskovic-Crook E, et al. Electrical stimulation using conductive polymer polypyrrole counters reduced neurite outgrowth of primary prefrontal cortical neurons from NRG1-KO and DISC1-LI mice. *Scientific Reports*. 2017 Feb 15; 7.
 211. Vanderburgh J, Sterling JA, Guelcher SA. 3D printing of tissue engineered constructs for in vitro modeling of disease progression and drug screening. *Ann Biomed Eng*. 2017 Jan 1; 45(1):164–79.
 212. Pas SP. The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature*. 2018 Jan 24; 553(7689):437–45.
 213. Mittal R, Woo FW, Castro CS, Cohen MA, Karanxha J, Mittal J, et al. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. *J Cell Physiol*. 2019 Jun 1; 234(6):8352–80.
 214. Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Schizophrenia. *Lancet*. 2016 Jul 2; 388(10039):86–97.
 215. Wang P, Li M, Zhao A, Ma J. Application of animal experimental models in the research of schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2021 Jun 22; 186(4):209–27.
 216. Young JW, Zhou X, Geyer MA. Animal models of schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010; 4:391–433.
 217. Ross CA, Margolis RL, Reading SAJ, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of Schizophrenia. *Neuron*. 2006 Oct 5; 52(1):139–53.
 218. Kamiya A, Kubo K ichiro, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, et al. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol*. 2005 Dec; 7(12):1167–78.
 219. Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, et al. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron*. 2009 Sep 24; 63(6):761–73.
 220. Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, et al. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet*. 2004 Nov; 75(5):862–72.

221. Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J Neurosci*. 2009 Oct 14; 29(41):12768–75.
222. Lee H, Dvorak D, Kao HY, Duffy ÁM, Scharfman HE, Fenton AA. Early cognitive experience prevents adult deficits in a neurodevelopmental schizophrenia model. *Neuron*. 2012 Aug 23; 75(4):714–24.
223. Shoji H, Toyama K, Takamiya Y, Wakana S, Gondo Y, Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of ENU-induced Disc1-Q31L and -L100P mutant mice. *BMC Res Notes*. 2012 Feb 20; 5:108.
224. Karlsgodt KH, Robleto K, Trantham-Davidson H, Jairl C, Cannon TD, Lavin A, et al. Reduced dysbindin expression mediates N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction and impaired working memory performance. *Biol Psychiatry*. 2011 Jan 1; 69(1):28–34.
225. Jones CA, Watson DJG, Fone KCF. Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 164(4):1162–94.
226. Waddington JL, Zhen X, O'Tuathaigh CMP. Developmental genes and regulatory proteins, domains of cognitive impairment in schizophrenia spectrum psychosis and implications for antipsychotic drug discovery: the example of dysbindin-1 isoforms and beyond. *Front Pharmacol*. 2019; 10:1638.
227. Bhardwaj SK, Ryan RT, Wong TP, Srivastava LK. Loss of dysbindin-1, a risk gene for schizophrenia, leads to impaired group 1 metabotropic glutamate receptor function in mice. *Front Behav Neurosci*. 2015; 9:72.
228. Pei JC, Liu CM, Lai WS. Distinct phenotypes of new transmembrane-domain neuregulin 1 mutant mice and the rescue effects of valproate on the observed schizophrenia-related cognitive deficits. *Front Behav Neurosci*. 2014; 8:126.
229. Andreasen NC. The lifetime trajectory of schizophrenia and the concept of neurodevelopment. *Dialogues Clin Neurosci*. 2010 Sep 30; 12(3):409–15.
230. Miyamoto Y, Nitta A. Behavioral phenotypes for negative symptoms in animal models of schizophrenia. *J Pharmacol Sci*. 2014; 126(4):310–20.
231. Bouwmeester H, Gerrits MAFM, Roozmond JG, Snapper J, Ronken E, Kruse CG, et al. Neonatal basolateral amygdala lesions affect monoamine and cannabinoid brain systems in adult rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007 Dec; 10(6):727–39.
232. Lazar NL, Rajakumar N, Cain DP. Injections of NGF into neonatal frontal cortex decrease social interaction as adults: a rat model of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2008 Jan; 34(1):127–36.
233. Fone KCF, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Aug; 32(6):1087–102.
234. Modinos G, Allen P, Grace AA, McGuire P. Translating the MAM model of psychosis to humans. *Trends Neurosci*. 2015 Mar; 38(3):129–38.

-
235. Neves GA, Grace AA. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-modulating agents reverse the hyperdopaminergic tone in the MAM model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2018; 43(8):1712–20.
236. Baharnoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull*. 2012 May; 38(3):444–56.
237. Palmer C. A Theory of risk and resilience factors in military families. *Military Psychology*. 2008 Jun; 20(3):205–17.
238. Schmitt A, Fendt M, Zink M, Ebert U, Starke M, Berthold M, et al. Altered NMDA receptor expression and behavior following postnatal hypoxia: potential relevance to schizophrenia. *J Neural Transm (Vienna)*. 2007 Feb; 114(2):239–48.
239. Dong E, Tueting P, Matrisciano F, Grayson DR, Guidotti A. Behavioral and molecular neuroepigenetic alterations in prenatally stressed mice: relevance for the study of chromatin remodeling properties of antipsychotic drugs. *Transl Psychiatry*. 2016 Jan 12; 6:e711.
240. Powell SB. Models of neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010; 4:435–81.
241. Jáquez-Cabalceta G, Mora-Gallegos A, Fornaguera Trías J. Modelos animales en roedores para el estudio de la esquizofrenia. *Revista Latinoamericana de Ciencia Psicológica*. 2017 Jun; 9(2):1–35.
242. Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *Journal of Theoretical Biology*. 2006; 241(2):252–61.
243. Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2009 Jul; 33(7):1061–79.
244. Meyer U. Developmental immune activation models with relevance to schizophrenia. In 2015. *Immunology and Psychiatry* p. 15–32.
245. Gireud M, Sirisaengtaksin N, Bean A. Molecular mechanisms of neurological disease. From molecules to networks: an introduction to cellular and molecular neuroscience. Londres: Academic Press; 2014. p. 639–61.
246. Lee G, Zhou Y. NMDAR hypofunction animal models of schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2019 Jul 31; 12:185.
247. Elsworth JD, Jentsch JD, Groman SM, Roth RH, Redmond ED, Leranath C. Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys. *Journal of Comparative Neurology*. 2015 Jun 1; 523(8):1248–57.
248. Braun I, Genius J, Grunze H, Bender A, Möller HJ, Rujescu D. Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophrenia Research*. 2007 Dec; 97(1–3):254–63.
-

249. Coleman LG, Jarskog LF, Moy SS, Crews FT. Deficits in adult prefrontal cortex neurons and behavior following early post-natal NMDA antagonist treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2009 Sep; 93(3):322–30.
250. Jeevakumar V, Kroener S. Ketamine administration during the second postnatal week alters synaptic properties of fast-spiking interneurons in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Cereb Cortex*. 2016 Mar; 26(3):1117–29.
251. Neill JC, Harte MK, Haddad PM, Lydall ES, Dwyer DM. Acute and chronic effects of NMDA receptor antagonists in rodents, relevance to negative symptoms of schizophrenia: A translational link to humans. *European Neuropsychopharmacology*. 2014 May; 24(5):822–35.
252. Beasley CL, Reynolds GP. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophr Res*. 1997 Apr; 24(3):349–55.
253. Zhang ZJ, Reynolds GP. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2002 May;55(1–2):1–10.
254. Cadinu D, Grayson B, Podda G, Harte MK, Doostdar N, Neill JC. NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. *Neuropharmacology*. 2018 Nov 1; 142:41–62.
255. Honeycutt JA, Chrobak JJ. Parvalbumin loss following chronic sub-anesthetic NMDA antagonist treatment is age-dependent in the hippocampus: implications for modeling NMDA hypofunction. *Neuroscience*. 2018 Nov 21; 393:73–82.
256. Benneyworth MA, Roseman AS, Basu AC, Coyle JT. Failure of NMDA receptor hypofunction to induce a pathological reduction in PV-positive GABAergic cell markers. *Neurosci Lett*. 2011 Jan 25; 488(3):267–71.
257. Jeevakumar V, Driskill C, Paine A, Sobhanian M, Vakil H, Morris B, et al. Ketamine administration during the second postnatal week induces enduring schizophrenia-like behavioral symptoms and reduces parvalbumin expression in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Behavioural brain research*. 2015 Apr; 282:165–75.
258. Nakatani-Pawlak A, Yamaguchi K, Tatsumi Y, Mizoguchi H, Yoneda Y. Neonatal phencyclidine treatment in mice induces behavioral, histological and neurochemical abnormalities in adulthood. *Biol Pharm Bull*. 2009 Sep; 32(9):1576–83.
259. Turner CP, DeBenedetto D, Ware E, Stowe R, Lee A, Swanson J, et al. Postnatal exposure to MK801 induces selective changes in GAD67 or parvalbumin. *Experimental Brain Research*. 2010 Mar; 201(3):479–88.
260. Wang CZ, Yang SF, Xia Y, Johnson KM. Postnatal phencyclidine administration selectively reduces adult cortical parvalbumin-containing interneurons. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Sep; 33(10):2442–55.
261. Plataki ME, Diskos K, Sougklakos C, Velissariou M, Georgilis A, Stavroulaki V, et al. Effect of neonatal treatment with the NMDA receptor antagonist, MK-801, during different temporal windows of postnatal period in adult prefrontal cortical and hippocampal function. *Front Behav Neurosci*. 2021 Jun 11; 15.

-
262. Wang P, Li M, Zhao A, Ma J. Application of animal experimental models in the research of schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2021 Jun 1; 186(4):209–27.
263. Crowley JJ, Kim Y, Szatkiewicz JP, Pratt AL, Quackenbush CR, Adkins DE, et al. Genome-wide association mapping of loci for antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in mice. *Mammalian Genome*. 2012 Jun; 23(5–6):322.
264. Garcia-Cerro S, Mas S, Gortat A, Sindreu C, Martinez-Pinteño A, Marmol F, et al. Different Modulation of Rps6 Phosphorylation by Risperidone in Striatal Cells Sub Populations: Involvement of the mTOR Pathway in Antipsychotic-Induced Extrapyramidal Symptoms in Mice. 8(3): 1083–93.
265. Mas S, Gassó P, Boloc D, Rodriguez N, Mármol F, Sánchez J, et al. Network analysis of gene expression in mice provides new evidence of involvement of the mTOR pathway in antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms. *The Pharmacogenomics Journal*. 2016; 16(3): 293–300.
266. Arora D, Mudgal J, Nampoothiri M, Mallik SB, Kinra M, Hall S, et al. Interplay between adenosine receptor antagonist and cyclooxygenase inhibitor in haloperidol-induced extrapyramidal effects in mice. *Metab Brain Dis*. 2018 Aug 1; 33(4):1045–51.
267. Ahmadi SA, Sabahi M, Haddadi R. The effect of acute and repeated administration of buspirone, 8-OHDPAT and fluoxetine on haloperidol-induced extrapyramidal symptoms. *Neuropsychopharmacologia Hungarica: a Magyar Pszichofarmakologiai Egyesület lapja = official journal of the Hungarian Association of Psychopharmacology*, 2019; 21(2): 59–68.
268. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*. 1966 Sep 2;153 (3740): 1127–8.
269. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012 Sep;Chapter 5: Unit5.61.
270. Nilsson C, Raun K, Yan F fei, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin*. 2012 Feb; 33(2): 173–81.
271. Zhuhua Z, Zhiquan W, Zhen Y, Yixin N, Weiwei Z, Xiaoyong L, et al. A novel mice model of metabolic syndrome: the high-fat-high-fructose diet-fed ICR mice. *Exp Anim*. 2015; 64 (4): 435–42.
272. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Nov; 295 (5): R1370-5.
273. Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr*. 2012 Jun; 51(4): 445–54.
274. Percelay S, Since M, Lagadu S, Freret T, Bouet V, Boulouard M. Antipsychotic lurasidone: Behavioural and pharmacokinetic data in C57BL/6 mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2020 Jul 1; 194.
275. May M, Beauchemin M, Vary C, Barlow D, Houseknecht KL. The antipsychotic medication, risperidone, causes global immunosuppression in healthy mice. *PLoS One*. 2019 Sep 1; 14(6).
-

276. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*. 2008 Dec 29; 9(1):1–13.
277. Al-Shahrour F, Minguez P, Tárraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, et al. FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jul; 35.
278. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. 2000 May; 25(1):25–9.
279. Minguez P, Götz S, Montaner D, Al-Shahrour F, Dopazo J. SNOW, a web-based tool for the statistical analysis of protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jul; 37: W109-W-114.
280. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003 Nov; 13(11): 2498–504.
281. Bernardo M, Bioque M, Parellada M, Ruiz JS, Cuesta MJ, Llerena A, et al. Assessing clinical and functional outcomes in a gene–environment interaction study in first episode of psychosis (PEPs). *Revista de Psiquiatría y Salud Mental (English Edition)*. 2013 Jan 1; 6(1):4–16.
282. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV*. Washington DC; 1994.
283. Mas S, Boloc D, Rodríguez N, Mezquida G, Amoretti S, Cuesta MJ, et al. Examining gene–environment interactions using aggregate scores in a first-episode psychosis cohort. *Schizophr Bull*. 2020 Jul 1; 46(4):1019–25.
284. Das S, Forer L, Schönherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nature Genetic*. 2016 Aug 29; 48(10):1284–7.
285. Gamazon ER, Wheeler HE, Shah KP, Mozaffari S v., Aquino-Michaels K, Carroll RJ, et al. A gene-based association method for mapping traits using reference transcriptome data. *Nature Genetics*. 2015 Aug 10; 47(9):1091–8.
286. Powell SB, Sejnowski TJ, Behrens MM. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012; 62(3):1322–31.
287. García-Cerro S, Martínez P, Vidal V, Corrales A, Flórez J, Vidal R, et al. Overexpression of Dyrk1A is implicated in several cognitive, electrophysiological and neuromorphological alterations found in a mouse model of down syndrome. Adlard PA, editor. *PLoS ONE*. 2014 Sep; 9(9):e106572.
288. Rompala GR, Zsiros V, Zhang S, Kolata SM, Nakazawa K. Contribution of NMDA receptor hypofunction in prefrontal and cortical excitatory neurons to schizophrenia-like phenotypes. Yoshikawa T, editor. *PLoS One*. 2013 Apr; 8(4):e61278.
289. Korotkova T, Fuchs EC, Ponomarenko A, von Engelhardt J, Monyer H. NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory. *Neuron*. 2010 Nov; 68(3):557–69.

-
290. Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*. 2004 Oct; 3(5):287–302.
 291. Paxinos G, Franklin KBJ. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. 5th Edition. Vol. 2nd Edition, Academic Press. 2019. 375 p.
 292. Zhao W, Langfelder P, Fuller T, Dong J, Li A, Hovarth S. Weighted gene coexpression network analysis: state of the art. *J Biopharm Stat*. 2010 Mar; 20(2):281–300.
 293. Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2010 Dec 17; 12(1):56–68.
 294. Scardoni G, Laudanna C. Centralities based analysis of complex networks. *New Frontiers in Graph Theory*. 2012 Mar 2; 323-348.
 295. Wuchty S, Almaas E. Peeling the yeast protein network. *Proteomics*. 2005 Feb; 5(2):444–9.
 296. Jeong H, Mason SP, Barabási AL, Oltvai ZN. Lethality and centrality in protein networks. *Nature*. 2001 May 3; 411(6833):41–2.
 297. Yao W, Wang T, Huang F. P300/CBP as a key nutritional sensor for hepatic energy homeostasis and liver fibrosis. *BioMed Research International*. 2018 May 15; 2018: 8168791.
 298. He H, Lai Y, Hao Y, Liu Y, Zhang Z, Liu X, et al. Selective p300 inhibitor C646 inhibited HPV E6-E7 genes, altered glucose metabolism and induced apoptosis in cervical cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2017; 812:206–15.
 299. Huang H, Tang S, Ji M, Tang Z, Shimada M, Liu X, et al. p300-mediated lysine 2-hydroxyisobutyrylation regulates glycolysis. *Mol Cell*. 2018 May 17; 70(4):663-678.e6.
 300. He L, Naik K, Meng S, Cao J, Sidhaye AR, Ma A, et al. Transcriptional Co-activator p300 maintains basal hepatic gluconeogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Sep 14; 287(38):32069–77.
 301. Yano H, Sakai M, Matsukawa T, Yagi T, Naganuma T, Mitsushima M, et al. PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signalling in hepatocytes. *Scientific Reports* 2018 8:1. 2018 Sep 24; 8(1):1–16.
 302. Namwanje M, Liu L, Chan M, Aaron N, Kraakman MJ, Qiang L. The depot-specific and essential roles of CBP/p300 in regulating adipose plasticity. *Journal of Endocrinology* 2019 Feb 1; 240(2):257–69.
 303. Wondisford AR, Xiong L, Chang E, Meng S, Meyers DJ, Li M, et al. Control of Foxo1 gene expression by co-activator P300. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014 Feb 14; 289(7):4326–33.
 304. Mosley AL, Corbett JA, Özcan S. Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1. *Mol Endocrinol*. 2004 Sep; 18(9):2279–90.

305. Cao J, Peng J, An H, He Q, Boronina T, Guo S, et al. Endotoxemia-mediated activation of acetyltransferase P300 impairs insulin signaling in obesity. *Nat Commun.* 2017 Dec 1; 8(1),131.
306. Newcomer JW, Haupt DW, Fucetola R, Melson AK, Schweiger JA, Cooper BP, et al. Abnormalities in glucose regulation during antipsychotic treatment of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2002; 59(4):337–45.
307. Henderson DC, Cagliero E, Copeland PM, Borba CP, Evins E, Hayden D, et al. Glucose metabolism in patients with schizophrenia treated with atypical antipsychotic agents: a frequently sampled intravenous glucose tolerance test and minimal model analysis. *Arch Gen Psychiatry.* 2005 Jan; 62(1):19–28.
308. Teff KL, Rickels MR, Grudziak J, Fuller C, Nguyen HL, Rickels K. Antipsychotic-induced insulin resistance and postprandial hormonal dysregulation independent of weight gain or psychiatric disease. *Diabetes.* 2013 Sep; 62(9):3232–40.
309. Cheng M, Liu X, Yang M, Han L, Xu A, Huang Q. Computational analyses of type 2 diabetes-associated loci identified by genome-wide association studies. *Journal of Diabetes.* 2017 Apr 1; 9(4):362–77.
310. Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segrè A v., Steinthorsdottir V, et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2012 Sep; 44(9):981–90.
311. Randhawa V, Sharma P, Bhushan S, Bagler G. Identification of key nodes of type 2 diabetes mellitus protein interactome and study of their interactions with phloridzin. *OMICS.* 2013 Jun 1; 17(6):302–17.
312. Zhou F, Liu Q, Zhang L, Zhu Q, Wang S, Zhu K, et al. Selective inhibition of CBP/p300 HAT by A-485 results in suppression of lipogenesis and hepatic gluconeogenesis. *Cell Death & Disease.* 2020 Sep 11; 11(9):1–12.
313. Bioque M, García-Portilla MP, García-Rizo C, Cabrera B, Lobo A, González-Pinto A, et al. Evolution of metabolic risk factors over a two-year period in a cohort of first episodes of psychosis. *Schizophr Res.* 2018 Mar 1; 193:188–96.
314. Nicol GE, Yingling MD, Flavin KS, Schweiger JA, Patterson BW, Schechtman KB, et al. Metabolic effects of antipsychotics on adiposity and insulin sensitivity in youths: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry.* 2018 Aug 1; 75(8):788–96.
315. Wedervang-Resell K, Friis S, Lonning V, Smelror RE, Johannessen C, Agartz I, et al. Lipid alterations in adolescents with early-onset psychosis may be independent of antipsychotic medication. *Schizophr Res.* 2020 Feb 1; 216:295–301.
316. Nicolae DL, Gamazon E, Zhang W, Duan S, Eileen Dolan M, Cox NJ. Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLOS Genetics.* 2010 Apr; 6(4):e1000888.
317. Gusev A, Mancuso N, Won H, Kousi M, Finucane HK, Reshef Y, et al. Transcriptome-wide association study of schizophrenia and chromatin activity yields mechanistic disease insights. *Nature Genetics.* 2018 Apr 9; 50(4):538–48.

-
318. Liao C, Laporte AD, Spiegelman D, Akçimen F, Joober R, Dion PA, et al. Transcriptome-wide association study of attention deficit hyperactivity disorder identifies associated genes and phenotypes. *Nature Communications*. 2019 Oct 1; 10(1):1–7.
319. Lindström S, Consortium on behalf of the I, Wang L, Consortium on behalf of the I, Smith EN, Consortium on behalf of the I, et al. Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci for venous thromboembolism. *Blood*. 2019 Nov 7; 134(19):1645–57.
320. Wu C, Tan S, Liu L, Cheng S, Li P, Li W, et al. Transcriptome-wide association study identifies susceptibility genes for rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2021 Dec 1; 23(1):1–10.
321. Girard SL, Dion PA, Bourassa C v., Geoffroy S, Lachance-Touchette P, Barhdadi A, et al. Mutation burden of rare variants in schizophrenia candidate genes. *PLOS ONE*. 2015 Jun 3; 10(6):e0128988.
322. Reynolds GP, McGowan OO. Mechanisms underlying metabolic disturbances associated with psychosis and antipsychotic drug treatment. *Journal of Psychopharmacology*. 2017 Nov 1; 31(11):1430–6.
323. Chen X, Yu Y, Zheng P, Jin T, He M, Zheng M, et al. Olanzapine increases AMPK-NPY orexigenic signaling by disrupting H1R-GHSR1a interaction in the hypothalamic neurons of mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2020 Apr 1; 114:104594.
324. Cid JM, Tresadern G, Vega JA, de Lucas AI, del Cerro A, Matesanz E, et al. Discovery of 8-Trifluoromethyl-3-cyclopropylmethyl-7-[(4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl)methyl]-1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine (JNJ-46356479), a selective and orally bioavailable mGlu2 receptor positive allosteric modulator (PAM). *J Med Chem*. 2016 Sep; 59(18):8495–507.
325. Kent JM, Daly E, Kezic I, Lane R, Lim P, de Smedt H, et al. Efficacy and safety of an adjunctive mGlu2 receptor positive allosteric modulator to a SSRI/SNRI in anxious depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Jun 3; 67:66–73.
326. Kang UG, Seo MS, Roh MS, Kim Y, Yoon SC, Kim YS. The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signaling pathway. *FEBS Lett*. 2004 Feb 27; 560(1–3):115–9.
327. Qing H, Xu H, Wei Z, Gibson K, Li XM. The ability of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol to protect PC12 cells against MPP⁺-induced apoptosis. *Eur J Neurosci*. 2003 Apr; 17(8):1563–70.
328. Lundberg M, Curbo S, Bohman H, Agartz I, Ögren SO, Patrone C, et al. Clozapine protects adult neural stem cells from ketamine-induced cell death in correlation with decreased apoptosis and autophagy. *Bioscience Reports*. 2020 Jan 1; 40(1).
329. Park J, Chung S, An H, Kim J, Seo J, Kim DH, et al. Haloperidol and clozapine block formation of autophagolysosomes in rat primary neurons. *Neuroscience*. 2012 May 3; 209:64–73.
330. Chen AT, Nasrallah HA. Neuroprotective effects of the second-generation antipsychotics. *Schizophrenia Research*. 2019 Jun 1; 208:1–7.

331. Gassó P, Mas S, Molina O, Bernardo M, Lafuente A, Parellada E. Neurotoxic/neuroprotective activity of haloperidol, risperidone and paliperidone in neuroblastoma cells. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012 Jan 10; 36(1):71–7.
332. Takaki M, Kodama M, Mizuki Y, Kawai H, Yoshimura B, Kishimoto M, et al. Effects of the antipsychotics haloperidol, clozapine, and aripiprazole on the dendritic spine. *European Neuropsychopharmacology*. 2018 May 1; 28(5):610–9.
333. Critchlow HM, Maycox PR, Skepper JN, Krylova O. Clozapine and haloperidol differentially regulate dendritic spine formation and synaptogenesis in rat hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2006 Aug 1; 32(4):356–65.
334. Bai O, Wei Z, Lu W, Bowen R, Keegan D, Li XM. Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC12 cells after serum withdrawal. *Journal of Neuroscience Research*. 2002 Jul 15; 69(2):278–83.
335. Ballesteros MA, Marín MJ, Martín MS, Rubio-Lopez MI, López-Hoyos M, Miñambres E. Effect of neuroprotective therapies (hypothermia and cyclosporine a) on dopamine-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Brain Injury*. 2013; 27(3), 354–360.
336. Nikolova S, Lee YS, Lee YS, Kim JA. Rac1-NADPH oxidase-regulated generation of reactive oxygen species mediates glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Free Radic Res*. 2005 Dec; 39(12):1295–304.
337. Yuksel TN, Yayla M, Halici Z, Cadirci E, Polat B, Kose D. Protective effect of 5-HT7 receptor activation against glutamate-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells via antioxidative and antiapoptotic pathways. *Neurotoxicology and Teratology*. 2019 Mar 1; 72:22–8.
338. Jantas D, Greda A, Golda S, Korostynski M, Grygier B, Roman A, et al. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor group II and III activators against MPP(+)-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: The impact of cell differentiation state. *Neuropharmacology*. 2014 Aug 1; 83:36–53.
339. Jantas D, Greda A, Leskiewicz M, Grygier B, Pilc A, Lason W. Neuroprotective effects of mGluR II and III activators against staurosporine- and doxorubicin-induced cellular injury in SH-SY5Y cells: New evidence for a mechanism involving inhibition of AIF translocation. *Neurochemistry International*. 2015 Sep 1; 88:124–37.
340. Jeon S, Kim Y, Chung IW, Kim YS. Clozapine induces chloride channel-4 expression through PKA activation and modulates CDK5 expression in SH-SY5Y and U87 cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015 Jan 2; 56:168–73.
341. Sharp SI, Hu Y, Weymer JF, Rizig M, McQuillin A, Hunt SP, et al. The effect of clozapine on mRNA expression for genes encoding G protein-coupled receptors and the protein components of clathrin-mediated endocytosis. *Psychiatr Genet*. 2013 Aug; 23(4):153-62.
342. Lavreysen H, Ahnaou A, Drinkenburg W, Langlois X, Mackie C, Pype S, et al. Pharmacological and pharmacokinetic properties of JNJ-40411813, a positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2015 Feb; 3(1):e00096.

-
343. Trabanco AA, Bartolomé JM, Cid JM. mGluR2 positive allosteric modulators: an updated patent review (2013–2018). *Expert opinion on therapeutic patents*. 2019 Jul 3; 29(7):497–507.
344. Germann M, Brederoo SG, Sommer IEC. Abnormal synaptic pruning during adolescence underlying the development of psychotic disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 2021 May 1; 34(3):222–7.
345. Batalla A, Bargalló N, Gassó P, Molina O, Pareto D, Mas S, et al. Apoptotic markers in cultured fibroblasts correlate with brain metabolites and regional brain volume in antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia and healthy controls. *Transl Psychiatry*. 2015 Aug 25; 5:e626.
346. Gassó P, Mas S, Rodríguez N, Boloc D, García-Cerro S, Bernardo M, et al. Microarray gene-expression study in fibroblast and lymphoblastoid cell lines from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients. *J Psychiatr Res*. 2017; 95:91–101.
347. Powell SB, Sejnowski TJ, Behrens MM. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012 Mar;62(3):1322–31.
348. Hakami T, Jones NC, Tolmacheva EA, Gaudias J, Chaumont J, Salzberg M, et al. NMDA receptor hypofunction leads to generalized and persistent aberrant gamma oscillations independent of hyperlocomotion and the state of consciousness. *PLoS One*. 2009 Aug 25; 4(8):e6755.
349. Beninger RJ, Jhamandas A, Aujla H, Xue L, Dagnone R v., Boegman RJ, et al. Neonatal exposure to the glutamate receptor antagonist MK-801: Effects on locomotor activity and pre-pulse inhibition before and after sexual maturity in rats. *Neurotoxicity Research*. 2002 Aug; 4(5–6):477–88.
350. Si T, Guo C, Yang Y, Su Y. Postnatal BDNF expression profiles in prefrontal cortex and hippocampus of a rat schizophrenia model induced by MK-801 Administration. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010; 2010:783297.
351. Lim AL, Taylor DA, Malone DT. Consequences of early life MK-801 administration: long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behavioural brain research*. 2012 Feb; 227(1):276–86.
352. Pinar N, Akillioglu K, Sefil F, Alp H, Sagir M, Acet A. Effect of clozapine on locomotor activity and anxiety-related behavior in the neonatal mice administered MK-801. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015 Aug 11; 15(3):74–9.
353. Ben-Azu B, Aderibigbe AO, Eneni AEO, Ajayi AM, Umukoro S, Iwalewa EO. Morin attenuates neurochemical changes and increased oxidative/nitrergic stress in brains of mice exposed to ketamine: prevention and reversal of schizophrenia-like symptoms. *Neurochemical Research*. 2018 Jun 28; 43(9):1745–55.
354. Hou Y, Zhang H, Xie G, Cao X, Zhao Y, Liu Y, et al. Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2013 Aug; 45:107–16.
-

355. Moy SS, Nonneman RJ, Shafer GO, Nikolova VD, Riddick N v., Agster KL, et al. Disruption of social approach by MK-801, amphetamine, and fluoxetine in adolescent C57BL/6J mice. *Neurotoxicology and Teratology*. 2013 Mar 1; 36:36–46.
356. Calzavara MB, Medrano WA, Levin R, Kameda SR, Andersen ML, Tufik S, et al. Neuroleptic drugs revert the contextual fear conditioning deficit presented by spontaneously hypertensive rats: a potential animal model of emotional context processing in schizophrenia? *Schizophr Bull*. 2009 Jul; 35(4):748–59.
357. Pietersen CY, Bosker FJ, Doorduyn J, Jongsma ME, Postema F, Haas J v, et al. An animal model of emotional blunting in schizophrenia. Baune B, editor. *PLoS ONE*. 2007 Dec; 2(12):e1360.
358. Bolton MM, Heaney CF, Sabbagh JJ, Murtishaw AS, Magcalas CM, Kinney JW. Deficits in emotional learning and memory in an animal model of schizophrenia. *Behavioural brain research*. 2012 Jul; 233(1):35–44.
359. Clifton NE, Thomas KL, Hall J. The effect of ketamine on the consolidation and extinction of contextual fear memory. *J Psychopharmacol*. 2018 Feb; 32(2):156–62.
360. Koh MT, Shao Y, Sherwood A, Smith DR. Impaired hippocampal-dependent memory and reduced parvalbumin-positive interneurons in a ketamine mouse model of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2016 Mar 1; 171(1–3):187–94.
361. 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 10; 78(1):81–93.
362. Hauser MJ, Isbrandt D, Roeper J. Disturbances of novel object exploration and recognition in a chronic ketamine mouse model of schizophrenia. *Behavioural brain research*. 2017 Aug 14; 332:316–26.
363. Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*. 1989 Sep; 29(3):261–5.
364. Nishizawa N, Nakao SI, Nagata A, Hirose T, Masuzawa M, Shingu K. The effect of ketamine isomers on both mice behavioral responses and c-Fos expression in the posterior cingulate and retrosplenial cortices. *Brain Res*. 2000 Feb 28; 857(1–2):188–92.
365. Castañé A, Santana N, Artigas F. PCP-based mice models of schizophrenia: differential behavioral, neurochemical and cellular effects of acute and subchronic treatments. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015 Nov; 232(21–22):4085–97.
366. Hervig ME, Thomsen MS, Kalló I, Mikkelsen JD. Acute phencyclidine administration induces c-Fos-immunoreactivity in interneurons in cortical and subcortical regions. *Neuroscience*. 2016 Oct; 334:13–25.
367. Mutlu O, Gumuslu E, Ulak G, Celikyurt IK, Kokturk S, Kır HM, et al. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. *Life Sciences*. 2012 Dec; 91(25–26):1252–62.

-
368. Harich S, Gross G, Bepalov A. Stimulation of the metabotropic glutamate 2/3 receptor attenuates social novelty discrimination deficits induced by neonatal phencyclidine treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 May;192(4):511–9.
369. Hamieh AM, Babin D, Sablé E, Hernier AM, Castagné V. Neonatal phencyclidine and social isolation in the rat: effects of clozapine on locomotor activity, social recognition, prepulse inhibition, and executive functions deficits. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021 Feb 1; 238(2):517–28.
370. Keefe RSE, Bilder RM, Davis SM, Harvey PD, Palmer BW, Gold JM, et al. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Jun; 64(6):633–47.
371. Nucifora FC, Mihaljevic M, Lee BJ, Sawa A. Clozapine as a model for antipsychotic development. *Neurotherapeutics*. 2017 Jul 26; 14(3):750–61.
372. 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.
373. Adem A, Madjid N, Stiedl O, Bonito-Oliva A, Konradsson-Geuken Å, Holst S, et al. Atypical but not typical antipsychotic drugs ameliorate phencyclidine-induced emotional memory impairments in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2019; 29(5):616–28.
374. Zhou X, Cai G, Mao S, Xu D, Xu X, Zhang R, et al. Modulating NMDA receptors to treat MK-801-induced schizophrenic cognition deficit: effects of clozapine combining with PQQ treatment and possible mechanisms of action. *BMC Psychiatry*. 2020;20(1):106.
375. Murray AJ, Woloszynowska-Fraser MU, Ansel-Bollepalli L, Cole KLH, Foggetti A, Crouch B, et al. Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. *Scientific Reports*. 2015 Dec; 5(1):16778.
376. Bicks LK, Koike H, Akbarian S, Morishita H. Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. *Frontiers in Psychology*. 2015; 6,1805.
377. Zou D, Chen L, Deng D, Jiang D, Dong F, McSweeney C, et al. DREADD in parvalbumin interneurons of the dentate gyrus modulates anxiety, social interaction and memory extinction. *Curr Mol Med*. 2016; 16(1):91–102.
378. Filipović D, Stanisavljević A, Jasnić N, Bernardi RE, Inta D, Perić I, et al. Chronic treatment with fluoxetine or clozapine of socially isolated rats prevents subsector-specific reduction of parvalbumin immunoreactive cells in the hippocampus. *Neuroscience*. 2018 Feb; 371:384–94.
379. Rossetti AC, Paladini MS, Colombo M, Gruca P, Lason-Tyburkiewicz M, Tota-Glowczyk K, et al. Chronic stress exposure reduces parvalbumin expression in the rat hippocampus through an imbalance of redox mechanisms: restorative effect of the antipsychotic lurasidone. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2018 Sep; 21(9):883–93.
380. Cid JM, Tresadern G, Duvey G, Lütjens R, Finn T, Rocher JP, et al. Discovery of 1-Butyl-3-chloro-4-(4-phenyl-1-piperidinyl)-(1*H*/*i*)-pyridone (JNJ-40411813): a novel positive

- allosteric modulator of the metabotropic glutamate 2 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014 Aug; 57(15):6495–512.
381. Litman RE, Smith MA, Doherty JJ, Cross A, Raines S, Gertsik L, et al. AZD8529, a positive allosteric modulator at the mGluR2 receptor, does not improve symptoms in schizophrenia: A proof of principle study. *Schizophrenia Research*. 2016 Apr; 172(1–3):152–7.
382. Xing B, Han G, Wang MJ, Snyder MA, Gao WJ. Juvenile treatment with mGluR2/3 agonist prevents schizophrenia-like phenotypes in adult by acting through GSK3 β . *Neuropharmacology*. 2018 Jul 15; 137:359-371.
383. Miller-Rhodes P, Piazza N, Mattle A, Teboul E, Ehmann M, Morris-Schaffer K, et al. Sex-specific behavioral impairments produced by neonatal exposure to MK-801 are partially reversed by adolescent CDPBB treatment. *Neurotoxicol Teratol*. 89:107053.
384. Marín O. Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. *Nat Med*. 2016 Nov 1; 22(11):1229–38.
385. 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.
386. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*. 1973 Nov; 33(11):2643–52.
387. Bray NJ, Kapur S, Price J. Investigating schizophrenia in a “dish”: possibilities, potential and limitations. *World Psychiatry*. 2012; 11(3):153-155.
388. Ba F, Pang PKT, Benishin CG. The establishment of a reliable cytotoxic system with SK-N-SH neuroblastoma cell culture. *J Neurosci Methods*. 2003 Feb 15; 123(1):11–22.
389. Abe C, Nishimura S, Mori A, Niimi Y, Yang Y, Hane M, et al. Chlorpromazine increases the expression of polysialic acid (PolySia) in human neuroblastoma cells and mouse prefrontal cortex. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 1; 18(6):1123.
390. Du J, Nakachi Y, Kiyono T, Fujii S, Kasai K, Bundo M, et al. Comprehensive DNA methylation analysis of human neuroblastoma cells treated with haloperidol and risperidone. *Front Mol Neurosci*. 2021 Dec 6; 14:792874.
391. Powell SB, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*. 2009 Dec 7; 204(2):282–94.
392. Braff DL, Freedman R, Schork NJ, Gottesman II. Deconstructing schizophrenia: an overview of the use of endophenotypes in order to understand a complex disorder. *Schizophrenia Bulletin*. 2006 Dec 7; 33(1):21–32.
393. Brody SA, Geyer MA, Large CH. Lamotrigine prevents ketamine but not amphetamine-induced deficits in prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Sep 1; 169(3–4):240–6.
394. Hill RA. Sex differences in animal models of schizophrenia shed light on the underlying pathophysiology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Aug; 67:41–56.
395. McCarthy MM. Incorporating sex as a variable in preclinical neuropsychiatric Research. *Schizophr Bull*. 2015 Sep; 41(5):1016–20.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA