

TESIS DOCTORAL

2023



Exploración de las alteraciones conductuales, transcriptómicas y en la función cerebral relacionadas con esquizofrenia debidas a posibles efectos sinérgicos de la activación inmune materna y la exposición a THC durante la adolescencia en ratas de ambos sexos

MARIO MORENO FERNÁNDEZ

Programa de Doctorado en Psicología

Directores de la tesis doctoral:
Dr. ALEJANDRO HIGUERA MATAS
Dr. EMILIO AMBROSIO FLORES
Dr. MARCOS UCHA TORTUERO

FINANCIACIÓN

Esta investigación ha sido financiada por:

Universidad de Educación a Distancia.

Plan de Promoción de la Investigación (2016-2022)

Ministerio de Economía y Competitividad.

Agencia Estatal de Investigación:

PSI2016-80541-P

PID2019-104523RB-I00

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Plan Nacional sobre Drogas:

2017I042

2021I039

Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (Instituto de Salud Carlos III):

RD16/0017/0022

Unión Europea.

JUST-2017-AG-DRUGS-806996-JUSTSO

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el inestimable apoyo de mis directores, compañeros, amigos y, especialmente, mi familia.

Gracias por todo.

Índice

ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN.....	16
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Neurodesarrollo y sus etapas vulnerables	23
1.1. Del cigoto a la neurulación.....	23
1.2. Formación de circuitos neuronales	24
1.3. La relación entre los sistemas inmunes materno y fetal.....	25
1.4. Del nacimiento a la etapa adulta	27
2. Esquizofrenia.....	29
2.1. Epidemiología	29
2.2. Curso de la enfermedad.....	30
2.3. Tratamientos	32
2.3.1. Antipsicóticos de primera generación	32
2.3.2. Antipsicóticos de segunda generación.....	32
2.3.3. Antipsicóticos de tercera generación	34
2.3.4. Futuros tratamientos	34
2.4. Esquizofrenia y la hipótesis del neurodesarrollo	37
2.5. Esquizofrenia y su asociación con las infecciones prenatales	37
2.6. Esquizofrenia y su asociación con el cannabis	39
2.6.1. Alteraciones del SEC en esquizofrenia.....	43
2.7. Hipótesis del doble impacto	44
3. Modelos animales	45
3.1. Genéticos.....	47
3.2. Modelos inducidos por drogas	47
3.3. Modelos del neurodesarrollo.....	48
3.3.1. Modelos de un impacto.....	48
3.3.1.3. Otros modelos de un impacto	52
3.3.2. Modelos de doble impacto	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. Animales y procedimiento experimental.....	63

1.1. Tandas experimentales.....	63
1.2. Cruces e impacto prenatal (LPS).....	65
1.3. Impacto postnatal (THC).....	66
2. Obtención de muestras.....	67
2.1. Cerebro y PBMC.....	67
2.2. Extracción de ARN.....	67
3. Marcadores tempranos.....	68
3.1. Laberinto en cruz elevado.....	68
3.2. Actividad locomotora.....	69
3.3. Prueba de reactividad inmune y citometría.....	69
4. Pruebas de comportamiento en la descendencia.....	70
4.1. Memoria de trabajo.....	70
4.2. Interacción social.....	71
4.3. Test de formación de asociaciones incidentales.....	72
4.4. Filtrado preatencional.....	74
4.5. Anhedonia.....	75
5. Tomografía por emisión de positrones.....	75
6. Secuenciación masiva de ARN.....	77
7. Análisis de datos.....	78
7.1. Análisis de los vídeos.....	78
7.2. Índices y correlaciones.....	78
7.3. Normalización de los datos.....	78
7.4. Estadística.....	79
RESULTADOS.....	81
Objetivo 1: EXPLORAR POSIBLES EFECTOS DERIVADOS DE LA COMBINACIÓN DE UNA ACTIVACION INMUNE MATERNA Y UNA EXPOSICIÓN A UNA DOSIS BAJA DE THC DURANTE LA ADOLESCENCIA.....	83
1.1. Evaluación de la potencia de los impactos.....	83
1.2. Búsqueda de alteraciones similares a síntomas cognitivos, negativos y positivos de la esquizofrenia causadas por la combinación de AIM y la exposición a una dosis baja de THC durante la adolescencia.....	88
1.3. Exploración de posibles marcadores tempranos en las madres que puedan indicar o predecir la gravedad de los síntomas de la descendencia.....	95
Objetivo 2. EXPLORAR POSIBLES EFECTOS SURGIDOS DE LA COMBINACIÓN DE UNA ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA Y UNA ADMINISTRACIÓN SIMILAR A UN CONSUMO ABUSIVO DE THC DURANTE LA ADOLESCENCIA.....	96

2.1. Evaluación de la potencia de los impactos mediante cambios de temperatura y/o peso en las madres y la descendencia	96
2.2. Búsqueda de alteraciones conductuales similares a los síntomas cognitivos, negativos y positivos que ocurren en esquizofrenia.....	101
2.3. Evaluación de marcadores tempranos.....	107
2.4. Evaluación de la actividad cerebral.....	109
2.5. RNAseq PBMC	115
2.6. RNAseq COF	130
DISCUSIÓN.....	145
1. Efecto de la activación inmune prenatal en las madres	147
2. Efectos de la exposición a LPS durante la gestación y a una dosis alta o baja de THC durante la adolescencia	148
2.1. Peso corporal.....	148
2.2. Síntomas cognitivos: memoria de trabajo y filtrado preatencional	149
2.3. Síntomas negativos: sociabilidad, preferencia por la novedad social y anhedonia	150
2.4. Síntomas positivos: formación de asociaciones incidentales.....	151
2.5. Marcadores tempranos de la severidad de los síntomas	152
3. Cambios en la actividad cerebral causados por AIM y la exposición a una dosis alta de THC durante la adolescencia	152
4. Cambios en la expresión génica causados por AIM y la exposición a una dosis alta de THC durante la adolescencia	154
4.1. PBMC.....	154
4.2. Corteza orbitofrontal.....	155
CONCLUSIONES.....	159
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
ANEXOS.....	195

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I1. Etapas del desarrollo previas a la implantación en humano y ratón	24
Figura I2. Esquema temporal de los eventos más importantes del desarrollo del cerebro y del sistema inmune desde la fecundación a la etapa adulta	26
Figura I3. Activación inmune materna y desarrollo	28
Figura I4. Incidencia de la esquizofrenia a nivel global en los últimos 10 años.....	30
Figura I5. Curso clínico de la esquizofrenia	31
Figura I6. Representación esquemática de las principales vías dopaminérgicas implicadas en esquizofrenia	33
Figura I7. Representación de la hipótesis serotoninérgica	35
Figura I8. Representación de la hipótesis glutamatérgica	36
Figura I9. Mecanismo propuesto para la relación entre la activación inmune materna y TEA	39
Figura I10. Procedimiento de evaluación de las representaciones mentales.....	46
Figura I11. Señalización de los receptores tipo Toll	50

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1. Representación gráfica de los experimentos realizados en cada tanda	64
Figura M2. Región de corteza orbitofrontal diseccionada.....	68
Figura M3. Espectros de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados en las PBMC	70
Figura M4. Laberinto en Y con el área de los brazos delimitados con el programa ANY-maze	71
Figura M5. Diagrama del modelo de asociaciones incidentales	74
Figura M6. Equipo de PET/CT SuperArgus	76

RESULTADOS

Figura R1.1. Inducción de AIM en la gestación con LPS.....	84
Figura R1.2. Administración de THC a la descendencia	86
Figura R1.3. Efectos independientes del THC y LPS en los pesos de la descendencia.....	87
Figura R1.4. Pruebas de comportamiento tras AIM y una dosis baja de THC	89
Figura R1.5. Test de asociaciones incidentales.....	92
Figura R2.1. Inducción de AIM en la gestación de las tandas 3 y 4	97
Figura R2.2. Efecto del THC en el peso de la descendencia	99
Figura R2.3. Efectos en el peso de las interacciones entre THC y LPS.....	100
Figura R2.4. Pruebas de comportamiento tras AIM y dosis crecientes de THC.....	102
Figura R2.5. Test de asociaciones incidentales.....	106
Figura R2.6. Respuesta inmune materna	108
Figura R2.7. Actividad cerebral en las regiones más anteriores.....	110
Figura R2.8. Actividad cerebral en las regiones más posteriores.....	113
Figura R2.9. Número de genes diferencialmente expresados en las PBMC.....	116

Figura R2.10. Distribución de los genes diferencialmente expresados en las PBMC en función del impacto	117
Figura R2.11. Efecto de la AIM en PBMC de los machos	119
Figura R2.12. Efecto del THC en PBMC de los machos	120
Figura R2.13. Efecto de los dos impactos en PBMC de los machos.....	121
Figura R2.14. Efecto de los dos impactos versus AIM en PBMC de los machos.....	122
Figura R2.15. Efecto de los dos impactos versus THC en PBMC de los machos.....	123
Figura R2.16. Efecto de AIM en PBMC de las hembras.....	125
Figura R2.17. Efecto del THC en PBMC de las hembras	126
Figura R2.18. Efecto de los dos impactos en PBMC de las hembras	127
Figura R2.19. Efecto de los dos impactos versus AIM en PBMC de las hembras	128
Figura R2.20. Efecto de los dos impactos versus THC en PBMC de las hembras	129
Figura R2.21. Número de genes diferencialmente expresados en corteza orbitofrontal.....	131
Figura R2.22. Distribución de los genes diferencialmente expresados en COF en función del impacto	132
Figura R2.23. Efecto de AIM en COF de los machos	134
Figura R2.24. Efecto del THC en COF de los machos	135
Figura R2.25. Efecto de los dos impactos en COF de los machos	136
Figura R2.26. Efecto de los dos impactos versus AIM en COF de los machos	137
Figura R2.27. Efecto de los dos impactos versus THC en COF de los machos	138
Figura R2.28. Efecto de AIM en COF de las hembras.....	140
Figura R2.29. Efecto del THC en COF de las hembras.....	141
Figura R2.30. Efecto de los dos impactos en COF de las hembras	142
Figura R2.31. Efecto de los dos impactos versus AIM en PBMC de las hembras	143
Figura R2.32. Efecto de los dos impactos versus THC en PBMC de las hembras	144

ANEXOS

Figura A1. Diferencias por sexo en la actividad cerebral.....	197
Figura A2. Efectos del LPS en la actividad cerebral	198
Figura A3. Efectos del THC en la actividad cerebral	199

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I1. Porcentaje de pacientes TEA con alteraciones en la migración neuronal.....	25
Tabla I2. Citoquinas inflamatorias y riesgo de TEA en humanos	26
Tabla I3. Variantes TLR.....	50

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M1. Número de crías y madres por grupo	65
--	----

RESULTADOS

Tabla R1.1. Efectos del LPS en la temperatura corporal.....	83
Tabla R1.2. Efectos del THC y LPS en el peso durante la administración de THC	85
Tabla R1.3. Estadísticos del laberinto en Y	88
Tabla R1.4. Número de animales utilizados en la estadística de las pruebas de conducta de la tanda 1.....	90
Tabla R1.5. Estadísticos de las pruebas de interacción social	91
Tabla R1.6. Estadísticos del test de asociaciones incidentales.....	92
Tabla R1.7. Estadísticos para todas las condiciones de la PPI.....	94
Tabla R1.8. Correlaciones entre marcadores tempranos y déficits de la descendencia	95
Tabla R2.1. Efectos de LPS en las madres gestantes.....	97
Tabla R2.2. Efectos del THC y LPS en el peso durante la exposición a dosis altas de THC	98
Tabla R2.3. Estadísticos del laberinto en Y	101
Tabla R2.4. Número de animales utilizados en la estadística de las pruebas de conducta de las tandas 2 y 3.....	103
Tabla R2.5. Estadísticos de las pruebas de interacción social	104
Tabla R2.6. Estadísticos para todas las condiciones de la PPI.....	105
Tabla R2.7. Estadísticos del test de asociaciones incidentales.....	107
Tabla R2.8. Estadísticos de la respuesta inmune materna.....	108
Tabla R2.9. Correlaciones entre los índices de las crías y los índices de las madres y sus componentes.....	109
Tabla R2.10. Estadísticos de la actividad cerebral en las regiones más anteriores.....	111
Tabla R2.11. Número de animales utilizados en la estadística de las pruebas de PET	111
Tabla R2.12. Estadísticos de la actividad cerebral las regiones más posteriores	114
Tabla R2.13. Integridad y concentración de ARN en las muestras de PBMC.....	115
Tabla R2.14. Integridad y concentración de ARN en las muestras de corteza orbitofrontal	130

ABREVIATURAS

- ¹⁸F-FDG:** ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa
- 22qDS:** *22q deletion syndrome* (síndrome de delección de 22q)
- 2-AG:** 2-araquidonilglicerol
- 5-HT:** 5-Hidroxitriptamina o serotonina
- AA:** Aminoácido
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AEA:** Anandamida
- AIM:** Activación inmune materna
- AMPA:** *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico)
- APG:** Antipsicóticos de primera generación
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNr:** ARN ribosómico
- ASG:** Antipsicóticos de segunda generación
- ATG:** Antipsicóticos de tercera generación
- BHE:** Barrera hematoencefálica
- BR:** Bulbo raquídeo
- C:** Corteza
- CAB:** Cerebro anterior basal
- CACNA1C:** *Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 C* (subunidad alfa1C del canal activado por voltaje de calcio)
- Cb:** Cerebelo
- CB₁R:** *Cannabinoid receptor type 1* (receptor cannabinoide de tipo 1)
- CB₂R, Cnr2:** *Cannabinoid receptor type 2* (receptor cannabinoide de tipo 2)
- CBD:** Cannbidiol
- CCA:** Corteza cingulada anterior
- CCP:** Corteza cingulada posterior
- CE:** Cuerpo estriado
- CF:** Corteza frontal
- CLCN3:** *Chloride voltage-gated channel 3* (canal controlado por voltaje de cloruro 3)
- CM:** Cerebro medio
- Col:** Colículos
- COMT:** *Catechol-O-methyltransferase* (catecol-O-metiltransferasa)
- CPF:** Corteza prefrontal
- CRF:** Captación relativa de ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa
- CTe:** Corteza temporal
- Cxcl:** *C-X-C motif chemokine ligand* (ligando de quimiocina con motivo C-X-C)
- DAGL:** Diacilglicerol lipasa
- DAO:** *D-amino acid oxidase* (D-aminoácido oxidasa)
- DAOA:** *D-amino acido oxidase activator* (activador de D-aminoácido oxidasa)
- dB:** Decibelios

- DCC:** DCC Netrin 1 Receptor (receptor 1 de netrina DCC)
- dCS:** *direct conditioned stimulus* (estímulo condicionado directo)
- DE:** Diferencialmente expresado
- DI:** Deficiencia intelectual
- DISC1:** *DISC1 Scaffold Protein* (proteína de andamiaje DISC1)
- DLGAP2:** *DLG Associated Protein 2* (proteína 2 asociada a DLG)
- DP:** Día postnatal
- DSM:** *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales)
- FAAH:** Fatty acid amide hydrolase (amida hidrolasa de ácidos grasos)
- FC:** *fold change* (número de veces de cambio)
- FDR:** *False discovery rate* (ratio de descubrimiento falso)
- GABA:** *γ-aminobutyric acid* (ácido γ-aminobutírico)
- gl:** Grados de libertad
- GM-CSF:** *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos)
- GPM6A:** Glicoproteína M6A
- Gria1/2/3:** subunidad GluA1/A2/A3 del receptor AMPA
- Grik2/3:** subunidad Glu2/3 del receptor de kainato
- Grin2a/3a:** subunidad GluN2A/3A del receptor de NMDA
- Grm1/2/3/5/8:** *metabotropic glutamate receptor 1/2/3/5/8* (receptor metabotrópico de glutamato 1/2/3/5/8)
- GWAS:** Genome-wide association study (estudio de asociación del genoma completo)
- HT:** Hipotálamo
- Htr1b/1a/2a/2c/5a/6:** Receptor de serotonina 1b/1a/2a/2c/5a/6
- i.p.:** Intraperitoneal
- IC:** Índice crías
- ICD:** *International classification of diseases* (Clasificación internacional de enfermedades)
- IFN:** Interferón
- IL:** Interleucina
- IM:** Índice madres
- LCE:** Laberinto en cruz elevado
- LPS:** Lipopolisacárido
- LRRC4B:** Leucine rich repeat containing 4B (repeticiones ricas en leucina 4B)
- MAO:** Monoamina oxidasa
- MAPK3:** Mitogen-activated protein kinase 3 (proteína quinasa 3 activada por mitógenos)
- mCS:** *mediated conditioned stimulus* (estímulo condicionado mediado)
- mGluR2/3:** *metabotropic glutamate receptor 2/3* (receptor metabotrópico de glutamato 2/3)
- NAPE:** *N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D* (fosfolipasa D de N-acil-fosfatidiletanolaminas)
- NMDA:** N-metil-D-aspartato
- NMDAR:** Receptor NMDA
- NRG1:** Neuroregulina 1

- PAK6:** *P21 activated kinase 6* (quinasa 6 activada por p21)
- PBMC:** *Peripheral blood mononuclear cell* (células mononucleares de sangre periférica)
- PBS:** *Phosphate buffered saline* (tampón fosfato salino)
- PCP:** *Fenilciclohexilpiperidina* (fenciclidina)
- Poli I:C:** ácido polinosínico:policitídílico
- PPI:** *Prepulse inhibition of the acoustic startle response* (inhibición por prepulso de la respuesta a sobresalto)
- RD:** Retraso en el desarrollo
- RDI:** Regiones de interés
- RIN:** *RNA integrity number* (número de integridad del ARN)
- SB:** Sustancia blanca
- SD:** Sprague-Sawley
- SEC:** Sistema endocannabinoide
- SEP:** Síntomas extrapiramidales
- SPM:** *Statistical parametric mapping* (mapeado paramétrico estadístico)
- SRR:** Serina racemasa
- TAAR:** *Trace amine-associated receptors* (receptores asociados a trazas de aminas)
- TDH:** Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
- TEA:** Trastorno del espectro autista
- TH₁₇:** T helper lymphocytes 17 (linfocitos T colaboradores 17)
- THC:** Δ^9 -tetrahidrocannabinol
- TLR:** *Toll-like receptor* (receptor tipo Toll)
- TNF:** Factor de necrosis tumoral
- TREM1:** *Triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (receptor desencadenante expresado en células mieloides)

RESUMEN

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de cannabis aumenta de manera importante el riesgo de desarrollar esquizofrenia. Sin embargo, por su naturaleza y características metodológicas, este tipo de investigaciones no tienen la capacidad de determinar si existe una relación de causalidad entre el consumo de cannabis y el desarrollo de patología psicótica. Es más, algunos estudios de asociación del genoma completo sugieren una asociación inversa, es decir, que las variantes genéticas relacionadas con la esquizofrenia contribuyan a un mayor riesgo de consumo de cannabis. Por estos motivos, los estudios con modelos animales son clave para poder esclarecer si el consumo de cannabis es un agente causal en el desarrollo de la esquizofrenia.

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso de vital importancia, con múltiples etapas, algunas de ellas muy vulnerables a alteraciones. En el contexto que nos ocupa, las alteraciones en el curso de estos procesos, en especial en periodos críticos, causadas por infecciones durante la gestación, son un factor de riesgo de enfermedades como esquizofrenia. Por ello, esta tesis doctoral estudia la relación entre los efectos que la activación inmune materna y la exposición a $\Delta 9$ tetrahidrocannabinol (THC) durante la adolescencia en ratas, para explorar los efectos que estos dos factores pueden tener en el dominio del comportamiento relacionados con los grandes grupos sintomáticos de la enfermedad. Además, para conocer con mayor profundidad las alteraciones cerebrales asociadas, hemos explorado los cambios en expresión génica y en actividad cerebral. Por último, hemos explorado si existen marcadores temprano en variables conductuales y de respuesta inmune en las madres que puedan predecir la aparición o severidad de algunos de los síntomas en la descendencia.

Por tanto, en la presente tesis doctoral se ha utilizado una administración de lipopolisacárido (LPS) (50 μ g/Kg) durante la gestación de ratas Sprague-Dawley para inducir una activación del sistema inmune. Además, se analizaron variables inmunes y la conducta espontánea de las madres como posibles marcadores tempranos. En un primer experimento, se expuso a la descendencia a una dosis baja de THC (3mg/Kg) durante la adolescencia y, en la etapa adulta, se realizaron pruebas para analizar comportamientos similares a los síntomas cognitivos, como memoria de trabajo y alteraciones en el filtrado preatencional; negativos como anhedonia o déficits en los comportamientos sociales y positivos como alteraciones en la representación mental de la realidad. En el segundo experimento, se utilizó un protocolo de dosis crecientes de THC (2,5; 5; 10mg/Kg) en la adolescencia, considerándose como patrón de uso abusivo, y en la etapa adulta, se analizaron los mismos comportamientos. Además, en distintas tandas de animales, se analizó la actividad cerebral mediante pruebas de tomografía por emisión de positrones en dos puntos de la etapa adulta y se realizaron secuenciaciones masivas de ARN de corteza orbitofrontal y células blancas mononucleares procedentes de sangre troncal.

Los resultados mostraron que en general el THC durante la adolescencia no se comportaba como un factor desencadenante en individuos expuestos a la activación inmune, al menos no en las dimensiones conductuales analizadas. Sin embargo, la exposición al cannabinoide durante la adolescencia sí produjo cambios en la preferencia por la novedad social. La activación inmune prenatal, por su parte, produjo

alteraciones en la memoria de trabajo, comportamiento social, preferencia por sacarosa, filtrado preatencional. En las pruebas de imagen, la exposición a LPS durante la gestación provocó en la descendencia alteraciones en la actividad de los colículos, el hipotálamo y el mesencéfalo. El estudio transcriptómico de las células blancas mononucleares periféricas evidenció que la combinación de los dos impactos se asociaba a alteraciones diferentes en función del sexo en diferentes genes relacionados con la respuesta inmune. Por último, en la corteza orbitofrontal, la exposición a LPS durante la gestación disminuyó, en ambos sexos, la expresión génica de numerosos receptores glutamatérgicos y serotoninérgicos o sus subunidades. Sorprendentemente, la combinación con THC revirtió o evitó en gran medida estos cambios.

En resumen, los datos de esta tesis doctoral sugieren que el THC no actúa a nivel conductual como un factor desencadenante de alteraciones conductuales compatibles con síntomas de la esquizofrenia en ratas. Además, sugerimos que la exposición a este cannabinoide durante la adolescencia podría de hecho revertir parte de las alteraciones en la expresión génica en corteza orbitofrontal asociadas a la activación inmune materna. Así mismo, la exposición a LPS durante la gestación altera genes del sistema inmune de la descendencia que podrían con potenciales consecuencias para futuras gestaciones por parte de esta descendencia.

En conclusión, se han de realizar más estudios en el futuro para intentar determinar las consecuencias de las alteraciones cerebrales encontradas, tanto en dominios de la conducta diferentes a los estudiados como con pruebas conductuales más sofisticadas. De esta manera podremos calibrar de una manera más fina el alcance de los cambios cerebrales encontrados.

ABSTRACT

Numerous epidemiological studies suggest that cannabis consumption significantly increases the risk of developing schizophrenia. However, due to their nature and methodological characteristics, this type of investigations does not have the capacity to determine whether there is a causal relationship between cannabis consumption and the development of the psychotic pathology. Moreover, some whole-genome association studies suggest an inverse association, i.e., that genetic variants related to schizophrenia contribute to a higher risk of cannabis consumption. For these reasons, animal models are key to elucidate whether cannabis consumption is a causal agent in the development of schizophrenia.

The development of the nervous system is a process of vital importance, with multiple stages, some of them very vulnerable to alterations. In the context of our study, alterations in the course of these processes, especially during critical periods, caused by infections during gestation, are a risk factor for diseases such as schizophrenia. Therefore, this doctoral thesis studies the relationship between the effects of maternal immune activation and exposure to Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) during adolescence in rats, to explore the effects that these two factors can have on behavioural domains related to the major symptomatic groups of the disease. In addition, to gain a deeper understanding of the associated brain alterations, we explored changes in gene expression and brain activity. Finally, we explored whether there are early markers in behavioural and immune response variables in mothers that can predict the onset or severity of some of the symptoms in the offspring.

Therefore, in the present doctoral thesis, a lipopolysaccharide (LPS) administration (50 μ g/Kg) was used during Sprague-Dawley rat gestation to induce immune system activation. In addition, immune variables and spontaneous behaviour of the mothers were analysed as possible early markers. In a first experiment, offspring were exposed to a low dose of THC (3mg/Kg) during adolescence, and in adulthood, tests were performed to analyse behaviours similar to cognitive symptoms, such as working memory and alterations in pre-attentional filtering; negative symptoms such as anhedonia or deficits in social behaviours, and positive symptoms such as alterations in the mental representation of reality. In the second experiment, a protocol of increasing doses of THC (2.5; 5; 10mg/Kg) in adolescence was used, considered as a pattern of abusive use, and in adulthood, the same behaviours were analysed. In addition, in different batches of animals, brain activity was analysed through positron emission tomography tests at two points in adulthood, and massive RNA sequencing of orbitofrontal cortex and mononuclear white cells from cord blood was performed.

The results showed that, in general, THC during adolescence did not behave as a triggering factor in individuals exposed to immune activation, at least not in the behavioural dimensions analysed. However, exposure to the cannabinoid during adolescence did produce changes in social novelty preference. Maternal immune activation, on the other hand, produced alterations in working memory, social behaviour, sucrose preference, pre-attentional filtering. In imaging tests, exposure to LPS during gestation caused alterations in the activity of the colliculi, hypothalamus, and midbrain in offspring. Our transcriptomic study of the peripheral mononuclear white cells showed that the combination of the two impacts was associated with different alterations depending on sex in different genes related to immune response. Finally,

in the orbitofrontal cortex, exposure to LPS during gestation decreased, in both sexes, the gene expression of numerous glutamatergic and serotonergic receptors or their subunits. Surprisingly, the combination with THC reversed or largely prevented these changes.

In summary, the data from this doctoral thesis suggest that THC does not act, at the behavioural level, as a trigger for behavioural alterations compatible with schizophrenia symptoms in rats. Additionally, we suggest that exposure to this cannabinoid during adolescence could actually reverse some of the alterations in gene expression in the orbitofrontal cortex associated with maternal immune activation. Similarly, exposure to LPS during gestation alters immune system genes in offspring that could have potential consequences for future pregnancies by this offspring.

In conclusion, further studies need to be conducted in the future to attempt to determine the consequences of the brain alterations found, both in behavioural domains different from those studied in this thesis and also with more sophisticated behavioural tests. This way we will be able to calibrate the scope of the brain changes found in a more fine-grained manner.

INTRODUCCIÓN¹

¹ Parte de esta introducción ha sido publicada en Moreno-Fernández et al., 2022.

1. Neurodesarrollo y sus etapas vulnerables

1.1. Del cigoto a la neurulación

El desarrollo en mamíferos se inicia con la fusión de los gametos (ovocito y esperma), proceso conocido como fecundación, dando lugar al cigoto. Tras este proceso, se inician una serie de divisiones celulares que, manteniendo el volumen, incrementan el número celular formando la mórula. La formación de una cavidad denominada blastocele en la mórula da lugar al blastocisto o blástula que ya es capaz de implantarse en el endometrio uterino (Molè et al., 2020). Estos procesos previos a la implantación muestran una fuerte conservación entre especies (**Figura 11**). El inicio de la gastrulación, en el día 14, establece los límites para la experimentación con embriones humanos. La formación de la gástrula, que en roedores se inicia en torno al día 6 (Rivera-Pérez & Hadjantonakis, 2015), se compone de varios procesos que transforman la masa de células que compone el blastocisto en los planos de un organismo completo a través del mesodermo, endodermo y ectodermo (Ghimire et al., 2021). Es el ectodermo el que, mediante un proceso conocido como neurulación, dará lugar a la médula espinal y al cerebro. La neurulación se inicia con la formación de la placa neural que forma el tubo neural al plegarse sobre sí misma aproximadamente entre la semana 3 y 4 de embarazo (día 10,5-11 en ratas) (Semple et al., 2013) y está regulada por más de 300 genes. Algunos ejemplos son *sonic hedgehog* y las proteínas de la familia TGF- β (BMP4, BMP7, dorsalina, etc.) que mediante un gradiente de concentración dan lugar a la polarización ventral y dorsal, respectivamente, del tubo neural. Aunque es imprescindible una coordinación precisa de los genes que guían este proceso, los factores ambientales como la dieta parecen tener también una influencia crítica (Gilbert, 2003). Ejemplo de ello es que se estima que el 75% de los defectos en el tubo neural se podrían prevenir con una suplementación adecuada de ácido fólico (vitamina B₁₂) (Ravi et al., 2021). También tienen una influencia importante otros factores ambientales como la contaminación, la exposición a químicos o enfermedades maternas como la diabetes o la obesidad (Avagliano et al., 2019). Estos defectos pueden dar lugar a fallos en el cierre del tubo neural y, por tanto, en el futuro cerebro y médula espinal, dando como resultado anencefalia y espina bífida (Greene & Copp, 2014).

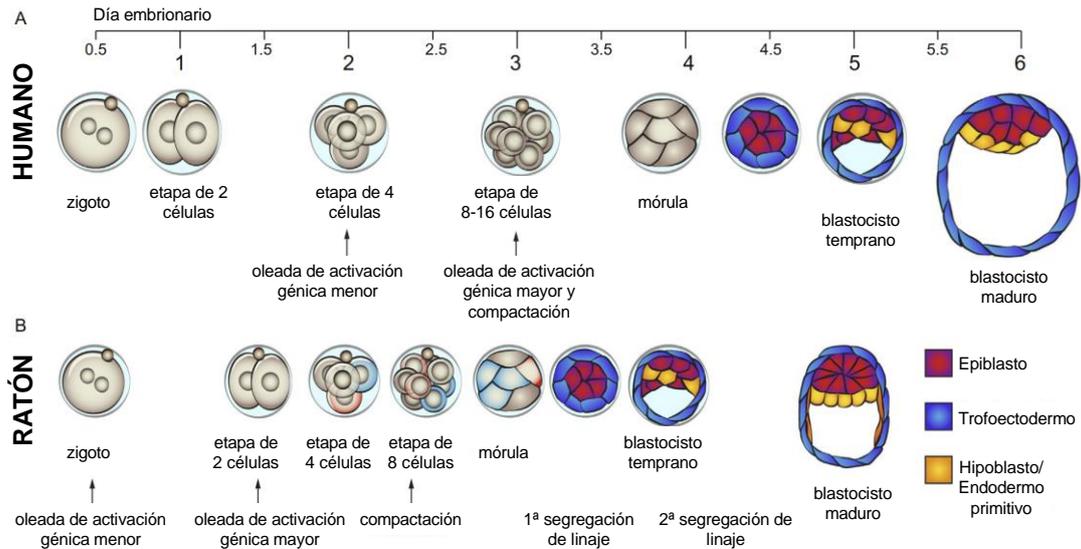


Figura 11. Etapas del desarrollo previas a la implantación en humano y ratón. Comparación temporal entre humano (A) y ratón (B) de las etapas más conservadas del desarrollo. Se muestran las diferentes oleadas de activación génica y divisiones celulares que conducen a la mórula, las segregaciones en los linajes principales (epiblasto, trofoectodermo y endodermo primitivo) y, finalmente al blastocisto maduro con capacidad de implantación en el endometrio uterino. Adaptada de Molè et al., 2020.

1.2. Formación de circuitos neuronales

La neurogénesis se inicia en torno a la semana 4 de embarazo (días 12-15 en ratas) dando lugar a nuevas neuronas que se integrarán en los circuitos cerebrales mediante dos procesos fundamentales para el neurodesarrollo: la migración neuronal y la sinaptogénesis (Pressler & Auvin, 2013) (**Figura 12**). La migración se inicia antes del segundo trimestre de embarazo y finaliza al inicio del tercero mientras que la sinaptogénesis comienza en el segundo trimestre y se extiende casi hasta la adolescencia del individuo (Estes & McAllister, 2016). En cambio, en ratas, la migración se observa principalmente entre los días 19 y 21 de gestación mientras que la sinaptogénesis se extiende el día 17 de gestación hasta la tercera semana de vida, con un pico importante durante la segunda (Pressler & Auvin, 2013). En la migración, las neuronas producidas en las zonas germinales migran a regiones concretas del cerebro para formar circuitos funcionales. Por ejemplo, una migración radial adecuada es esencial para la formación de la arquitectura laminar y las sinapsis de la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo. Este proceso tiene una regulación muy precisa que permite que las neuronas cambien de dirección o de modo de migración para alcanzar su destino final (Hatanaka et al., 2016). La lisencefalia (ausencia de circunvoluciones) y las heterotopías neuronales son las anomalías más comunes causadas por defectos en la migración neuronal. Patologías en las que está implicada una migración radial anormal, como paquiquiria, displasia y heterotopías, han sido observadas con frecuencia en casos de trastornos del espectro autista (TEA) (Pan et al., 2019). En la mayoría de pacientes con TEA se encuentra alterada la distribución laminar de neuronas y los límites entre la materia gris y blanca, en cerebros

postmortem. Numerosos estudios neuropatológicos han demostrado la presencia de aberraciones en la migración neuronal en pacientes con TEA (**Tabla I1**).

Estudio	Tipo de alteración en la migración neuronal	Área afectada	TEA		Controles	
			Nº (H/M)	Nº (%)	Nº (H/M)	Nº (%)
(Bailey et al., 1998)	Laminación neuronal	CF	6 (5/1)	4 (66,7)	7 (5/2)	0 (0)
(Kemper & Bauman, 1998)	Arquitectura laminar	CCA	9 (-/-)	8 (88,9)	9 (-/-)	0 (0)
(Simms et al., 2009)	Laminación irregular ↑ Neuronas en SB	CCA	9 (9/0)	3 (33,3) 6 (66,3)	4 (4/0)	0 (0)
(Oblak et al., 2011)	↑ Neuronas en SB	CCP	8 (8/0)	8 (100)	8 (6/2)	0 (0)
(Stoner et al., 2014)	Arquitectura laminar cortical	CPF y CTe	11 (8/3)	10 (90,9)	11 (8/3)	1 (9,1)

Tabla I1. Porcentaje de pacientes TEA con alteraciones en la migración neuronal. Se recogen diversas perturbaciones neuropatológicas causadas por migraciones neuronales alteradas y su frecuencia comparada en pacientes TEA y controles. CCA: Corteza cingulada anterior, CCP: Corteza cingulada posterior, CPF: Corteza prefrontal, CF: Corteza frontal; CTe: Corteza temporal; SB: sustancia blanca. Adaptada de Pan et al., 2019.

Finalmente, los procesos de apoptosis, sinaptogénesis y gliogénesis son los encargados de que las neuronas que han llegado al sitio correcto se conecten entre sí dando lugar a circuitos cerebrales funcionales (**Figura I2**). Estos procesos cobran importancia a partir de la segunda mitad del segundo trimestre y en ellos intervienen un elevadísimo número de vías de señalización cuya perturbación puede ocasionar defectos en el futuro cerebro del feto (Tau & Peterson, 2010). Diversos factores como el estrés o infecciones durante la gestación pueden influir en estas vías dando lugar a circuitos alterados (Kreitz et al., 2020; Rudolph et al., 2018; Scheinost et al., 2017).

1.3. La relación entre los sistemas inmunes materno y fetal

El sistema inmune materno ha sido uno de los factores productores de alteraciones en el neurodesarrollo más estudiado, debido a su íntima relación con el feto y su sistema inmune (**Figura I3**). Este vínculo, adquiere una gran importancia en el segundo trimestre, ya que es cuando se inicia un notable desarrollo del sistema inmune fetal que permite establecer una simbiosis con el materno (**Figura I2**). En esta fase se observa una acumulación de linfocitos T reguladores (T_{reg}) que se origina a partir de células progenitoras del feto y de migraciones de T_{reg} maternos a través de la placenta (Dowling & Levy, 2014). Alteraciones como infecciones durante el embarazo o el estrés pueden producir un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias que, a su vez, pueden alterar el neurodesarrollo normal del feto (**Tabla I2**). El estrés de la madre durante la gestación juega un papel importante en este sentido ya que ha sido relacionado con una mayor susceptibilidad frente a infecciones (Culhane et al., 2001). También se ha asociado con un incremento de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β o TNF α y una disminución de IL-10 (antiinflamatoria) (Coussons-Read et al., 2005, 2007). Diversos estudios han

relacionado niveles elevados de componentes del sistema inmune con complicaciones del embarazo y enfermedades como esquizofrenia, TEA o depresión en la descendencia (Choi et al., 2016; Fu et al., 2014; Galecka et al., 2021; Upthegrove & Khandaker, 2020).

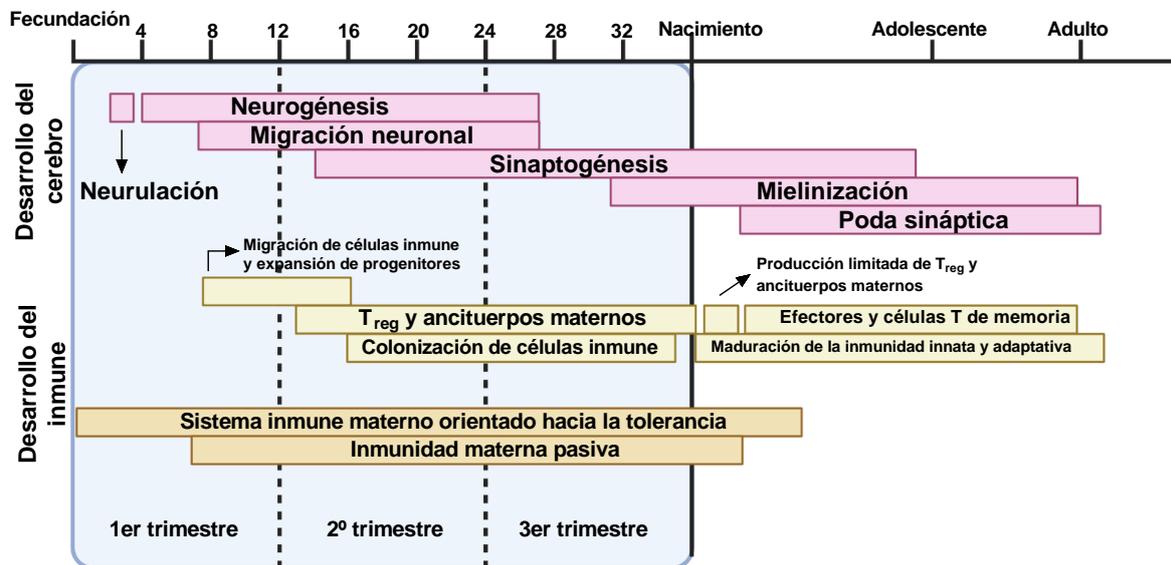


Figura I2. Esquema temporal de los eventos más importantes del desarrollo del cerebro y del sistema inmune desde la fecundación a la etapa adulta. Adaptado de Estes & McAllister, 2016

Estudio	Nº	Muestra	Medición	Diagnóstico	Resultados
(Goines et al., 2011)	84 M _{TEA} 49 M _{RD} 159 M _C	Mitad de la gestación	Eotaxina, GM-CSF, IFN γ , IL-10, IL-12, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5 y TNF	TEA o retraso en el desarrollo mediante DSM-IV	\uparrow IL-4, IL-5 e IFN γ asociados a TEA
(K. L. Jones et al., 2017)	184 M _{TEA+DI} 201 M _{TEA+noDI} 188 M _{RD} 428 M _C	Mitad de la gestación	GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, TNF, eotaxina, sIL-2R α e IL-1RA	TEA o retraso en el desarrollo mediante DSM-IV	\uparrow GM-CSF, IFN γ , IL-1 α e IL-6 asociados con TEA+DI \downarrow IL-1 β y CCL2 asociados con TEA+noDI
(Abdallah et al., 2012)	414 M _{TEA} 820 M _C	Fluido amniótico	CCL2, CCL3 and CCL5	TEA mediante ICD-8 e ICD-10	\uparrow CCL2 asociados a TEA
(Abdallah et al., 2013)	331 M _{TEA} 698 M _C	Fluido amniótico	IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, TNF, TNF β , TREM1, sIL-6R α and GM-CSF	TEA mediante ICD-8 e ICD-10	\uparrow IL-4, IL-10, TNF y TNF β asociados a TEA

Tabla I2. Citoquinas inflamatorias y riesgo de TEA en humanos. Se recogen estudios que examinaron la relación entre las citoquinas inflamatorias durante la gestación y el riesgo de padecer

TEA. Las muestras de fluido amniótico fueron tomadas entre la semana 16-20 de gestación. Mc: Madres de niños control; MRD: Madres de niños con retraso en el desarrollo; M_{TEA}: Madres de niños con trastornos del espectro autista; M_{TEA+DI}: Madres de niños con trastornos del espectro autista y deficiencia intelectual; M_{TEA+noDI}: Madres de niños con trastornos del espectro autista pero no deficiencia intelectual; TNF: Factor de necrosis tumoral. Adaptada de Han et al., 2021.

1.4. Del nacimiento a la etapa adulta

Tras el nacimiento, la mielinización empieza a cobrar importancia, aunque los fenómenos de sinaptogénesis, apoptosis y gliogénesis comentados continúan activos. Además, durante la adolescencia se produce la poda sináptica, un proceso crucial para el neurodesarrollo en el que se da una eliminación masiva de sinapsis infrautilizadas y un fortalecimiento de las importantes (**Figura I2**). La finalización de la gestación produce un cambio en el entorno del individuo y, por tanto, en los factores que pueden perturbar estos procesos. Por ejemplo, en el ámbito de la nutrición se ha visto que algunos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son necesarios para una correcta mielinización y que afectan a la producción de varios neurotransmisores (Kadosh et al., 2021). El estrés que sufre el individuo en sus primeras etapas de la vida es otro factor que afecta al neurodesarrollo en función del momento en que se produzca. Los traumas o el estrés durante los primeros años de vida pueden provocar una hiperreactividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) mientras que si se producen durante la adolescencia pueden dar lugar a una hiporreactividad de este eje (Agorastos et al., 2019). Tanto los traumas y el estrés como las alteraciones del HPA han sido relacionadas con un mayor riesgo de sufrir esquizofrenia o psicosis (DeRosse & Barber, 2021; Popovic et al., 2019). El consumo de drogas, como el cannabis, también es capaz de alterar estos procesos incrementando la pérdida de materia gris que se produce durante la poda sináptica en la corteza prefrontal, especialmente en individuos que consumen múltiples drogas (Dhein, 2020).

Alteraciones como las comentadas u otras similares en cualquiera de estas fases conducen a un desarrollo anormal del sistema nervioso que da lugar a los trastornos del neurodesarrollo entre los que se encuentran TEA, discapacidades intelectuales, trastornos de la comunicación, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) o trastornos motores (American Psychiatric Association, 2022; Ismail & Shapiro, 2019). Sin embargo, el conocimiento de estos trastornos ha sentado las bases de la hipótesis del neurodesarrollo que pretende explicar enfermedades que parecen compartir estos mismos mecanismos patogénicos, como es el caso de la esquizofrenia. Antes de explicar la relación entre la hipótesis del neurodesarrollo y la esquizofrenia comenzaremos haciendo una breve introducción a esta patología.

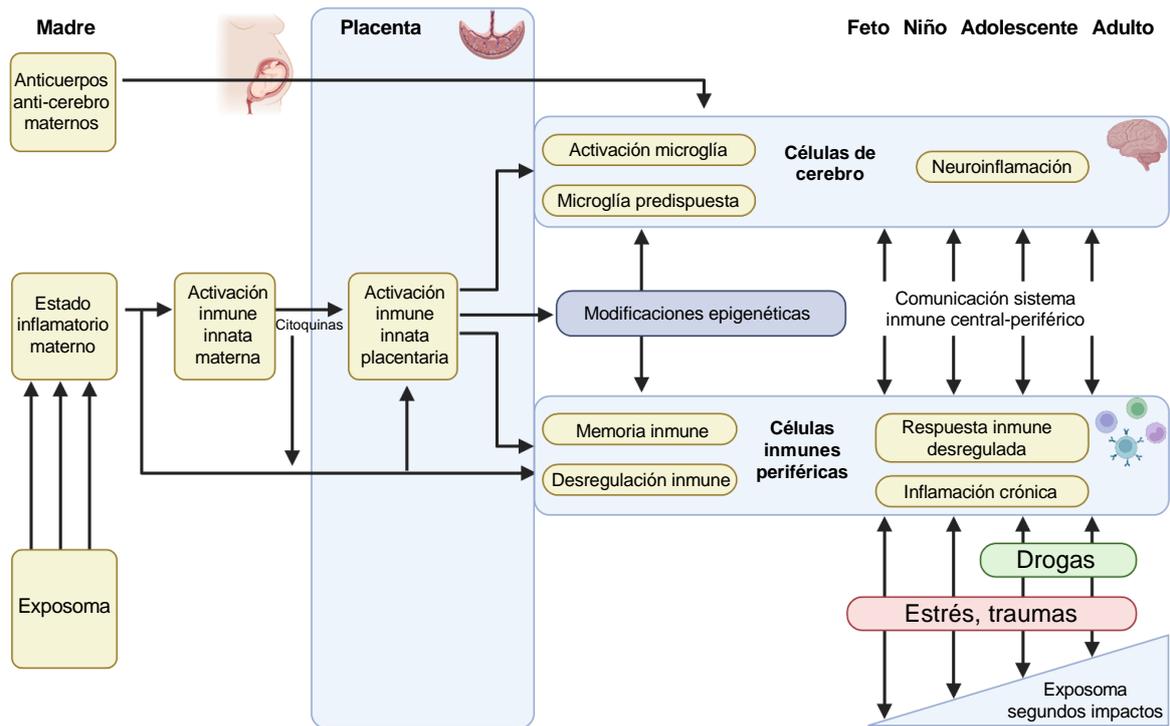


Figura I3. Activación inmune materna y desarrollo. Diferentes factores ambientales, infecciosos o no, pueden activar los receptores tipo Toll en el sistema inmune periférico de la madre activando así el sistema inmune innato periférico y de la placenta produciendo una liberación de citoquinas. Esta inflamación materna puede inducir cambios epigenéticos en la microglía y el sistema inmune fetal. Durante la vida del individuo, los factores ambientales pueden activar señales inflamatorias en el sistema inmune periférico que, junto con la programación del sistema inmune, el riesgo genético y la comunicación con las células del sistema inmune del cerebro puede manifestarse en forma de alteraciones cerebrales. Adaptada de Han et al., 2021.

2. Esquizofrenia

2.1. Epidemiología

La esquizofrenia es un trastorno mental severo que afecta al 0,32% de la población mundial (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2020).

La esquizofrenia es uno de los trastornos del espectro psicótico que, según el DSM-5 se caracterizan por alteraciones en uno o más de los siguientes 5 dominios: delirios, alucinaciones, pensamiento desorganizado, comportamiento motor alterado y síntomas negativos (American Psychiatric Association, 2022). Para el diagnóstico de esquizofrenia, debe haber alteraciones en dos de los dominios durante al menos 1 mes.

Los delirios se definen como creencias inmutables a las que el individuo no está dispuesto a renunciar incluso a pesar de evidencias contrarias claras. Estas creencias son variables entre individuos y pueden ser persecutorias, somáticas, religiosas, etc. Por otro lado, las alucinaciones se diferencian de los delirios al ser percepciones que ocurren sin la existencia de un estímulo externo. Pueden ocurrir en cualquier modalidad sensorial, aunque las auditivas son las más comunes. El pensamiento desorganizado suele estar asociado a un discurso errático en el que el individuo cambia de un tema a otro con frecuencia y sus respuestas pueden ser totalmente incoherentes. El comportamiento motor alterado puede ir desde comportamientos catatónicos en los que el individuo exhibe una baja reacción al entorno hasta mutismo y estupor en los que el individuo muestra una completa falta de respuesta verbal y motora.

Los síntomas negativos más comunes en la esquizofrenia son expresión emocional disminuida y abulia, que se caracteriza por una menor motivación en actividades iniciadas por uno mismo (American Psychiatric Association, 2022). También se encuentra entre estos síntomas la anhedonia, definida como una alteración en la habilidad para buscar, experimentar o aprender sobre el placer (Thomsen et al., 2015).

Aunque tradicionalmente se ha pensado que esta enfermedad afecta por igual a ambos sexos, recientes estudios parecen indicar que existe una mayor prevalencia en hombres (Jongsma et al., 2019) (**Figura 14**). A pesar de ser un trastorno menos prevalente que otras enfermedades mentales, este supone una importante carga, en primer lugar, para los pacientes y su entorno, pero también para los sistemas sanitarios. Se estima que el coste anual que supone la esquizofrenia, teniendo en cuenta costes directos (tratamientos, daños, accidentes, etc.) e indirectos (pérdida de capital humano) se sitúa en torno a 3.500 millones de dólares en países como España y hasta 102.000 millones de dólares, según los estudios más pesimistas, en países como Estados Unidos (Chong et al., 2016). Sin embargo, el coste económico difícilmente refleja el coste personal que sufren tanto las personas con esquizofrenia como su entorno. Para mostrar esta otra cara de la enfermedad, una de las principales medidas que se utiliza son los años de vida vividos con discapacidad o YLD (del inglés *years of life lived with disability*). En el periodo comprendido entre 2010 y 2019 la esquizofrenia ha supuesto una media anual de más de 14 millones de YLD a nivel mundial (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2020). Esto hizo que en

2016 fuera considerada como 12ª enfermedad más discapacitante de 310 analizadas (Vos et al., 2017). Además, las personas que sufren esquizofrenia tienen una esperanza de vida media 15 años menos que la población general y un riesgo de suicidio 22 veces superior, especialmente durante 1 año tras la primera hospitalización (Hjorthøj et al., 2017).

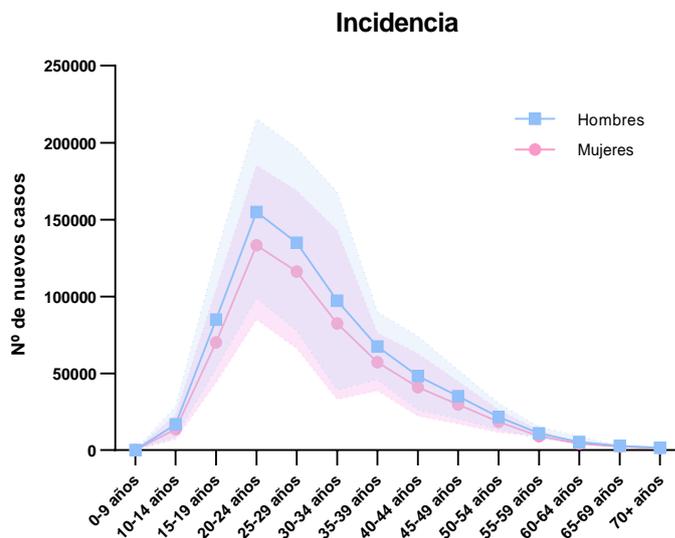


Figura 14. Incidencia de la esquizofrenia a nivel global en los últimos 10 años. Se representa la media de los nuevos casos anuales de esquizofrenia, en las franjas de edad indicadas, entre los años 2010-2019. Las zonas sombreadas indican el intervalo de confianza del 95%. Fuente: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2020.

2.2. Curso de la enfermedad

Antes del inicio de la esquizofrenia, la mayoría de los individuos (más de un 70%), pasan por una fase prodrómica de la enfermedad cuya duración puede durar desde semanas hasta 12 meses (Häfner et al., 1998). Los síntomas que aparecen durante esta fase son muy heterogéneos y pueden ir desde el desarrollo de nuevos intereses hasta déficits cognitivos (Fusar-Poli et al., 2012), depresión, pasando por ansiedad irritable o retraimiento social (Jauhar et al., 2022).

Es en la adolescencia tardía o la adultez temprana cuando se diagnostica la esquizofrenia siguiendo los criterios comentados del DSM-5. Esto se puede ver claramente si se observa la incidencia anual media de los últimos 10 años dividida por franjas de edad (**Figura 14**). Sin embargo, es interesante destacar que existe cierto debate en cuanto al inicio de la enfermedad. Las evidencias de un declive cognitivo que se inicia en la pubertad han provocado que algunos autores se planteen si realmente debiésemos cambiar los criterios diagnósticos de la esquizofrenia e incluso no considerarla un trastorno psicótico sino un trastorno cognitivo (Kahn & Keefe, 2013; Kahn & Sommer, 2015).

La prognosis de la esquizofrenia tiene una gran variabilidad y aún son necesarios más estudios a largo plazo para determinar con exactitud su curso y evolución. Entre las limitaciones más importantes se encuentran la dificultad y variabilidad en su diagnóstico, el uso y efecto de los tratamientos y la falta de estudios de imagen de

larga duración. Sin embargo, analizando y tratando de homogenizar los estudios disponibles se pueden extraer algunas líneas generales (Heilbronner et al., 2016). En primer lugar, parece que a corto plazo los síntomas positivos y negativos se mantienen estables (Heilbronner et al., 2016) o decrecen (Gur et al., 1998). Sin embargo, a largo plazo los síntomas positivos tienden a fluctuar (Rosen et al., 2011) mientras que los negativos mantienen su estabilidad o varían junto con los síntomas positivos (Heilbronner et al., 2016) (**Figura I5**). En lo que respecta a la cognición, existe un deterioro sostenido tanto a corto (Albus et al., 2002; Burdick et al., 2006) como a largo plazo en los diferentes dominios (Bonner-Jackson et al., 2010).

Estos datos aportan soporte empírico para la hipótesis más aceptada por la comunidad científica en lo que a causas de la esquizofrenia se refiere: la hipótesis del neurodesarrollo.

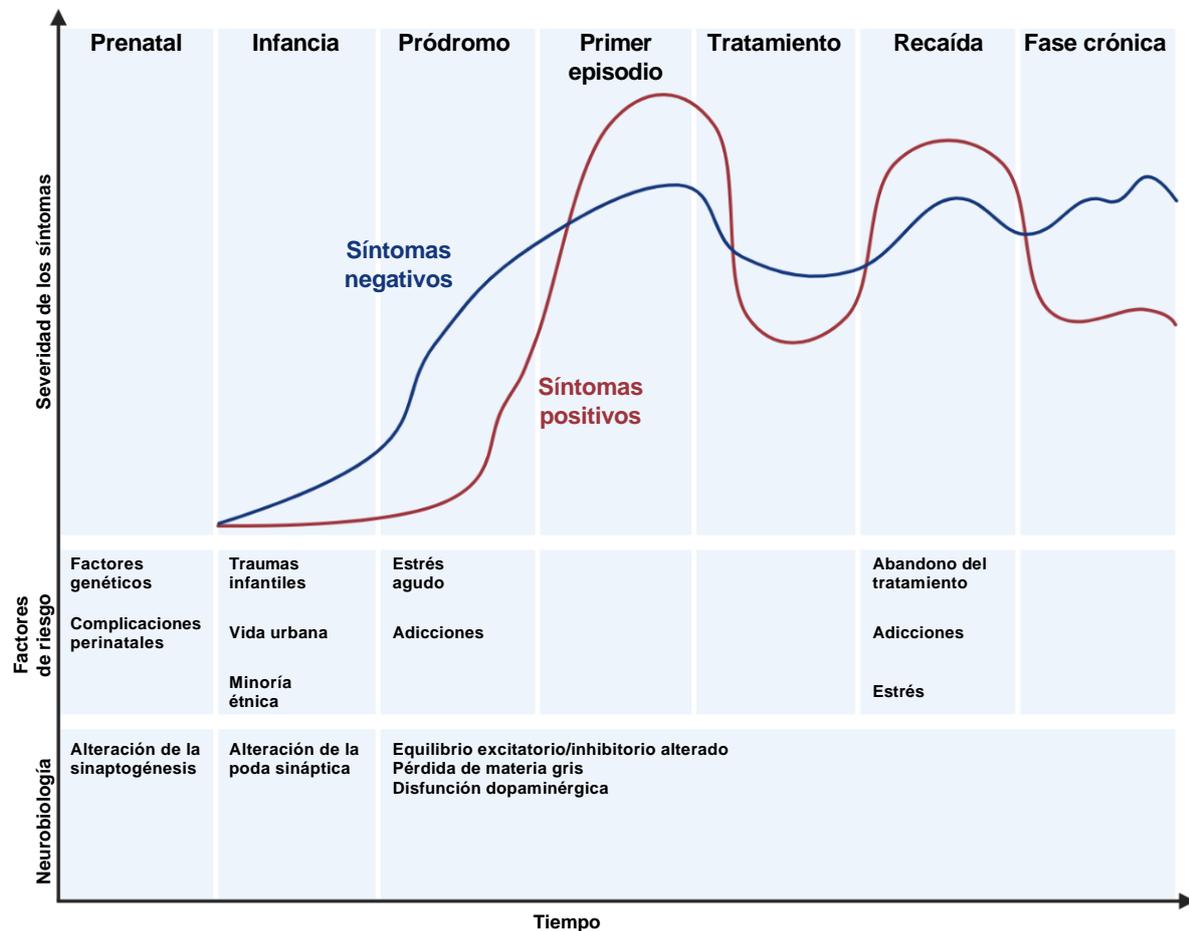


Figura I5. Curso clínico de la esquizofrenia. Se representa la evolución temporalmente aproximada de los síntomas negativos (azul), positivos (rojo) a lo largo de la vida, así como de las alteraciones neurobiológicas implicadas (las alteraciones de la sinaptogénesis y la poda sináptica no están confirmadas *in vivo*). Se muestran también los factores de riesgo más influyentes de cada etapa. Durante la adolescencia tardía suele tener lugar una etapa prodrómica con síntomas positivos, negativos y cognitivos atenuados que precede al primer episodio psicótico. Tras el inicio del ► tratamiento, los síntomas positivos tienen a responder bien a los antipsicóticos al contrario que los negativos y cognitivos, que responden peor o incluso son exacerbados. La mayoría de los pacientes sufre recaídas tras abandonar el tratamiento, aunque su riesgo se reduce si se mantiene el tratamiento incluso con los síntomas positivos controlados. Adaptada de McCutcheon et al., 2020.

2.3. Tratamientos

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo contra la esquizofrenia, por lo que las terapias actuales están destinadas a paliar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Esta falta de tratamientos no se debe a la recuperación espontánea ya que, según un metaanálisis realizado por la Jääskeläinen, la proporción mediana (cuantiles 25-75) de pacientes que llegan a cumplir los criterios de recuperación es tan solo del 13.5% (Jääskeläinen et al., 2013).

2.3.1. Antipsicóticos de primera generación

Los antipsicóticos fueron los fármacos que revolucionaron la manera de tratar la esquizofrenia y otras enfermedades mentales. La primera generación de estos fármacos, también conocidos como antipsicóticos típicos o de primera generación (APG), fue descubierta como en tantas otras ocasiones, por serendipia. A principios de los años 50, un cirujano francés estaba probando la clorpromazina para reducir el shock quirúrgico y pronto se pusieron de manifiesto sus efectos en el estado mental de los pacientes (Shen, 1999). La relajación que producía sin ocasionar la pérdida de consciencia llamó la atención del psiquiatra Pierre Denker que empezó a utilizar este fármaco en sus pacientes más difíciles de tratar (J. M. Kane & Correll, 2010). Este fue el primer fármaco de los conocidos como antipsicóticos típicos o de primera generación, entre los que se incluyen también el haloperidol y la flufenazina. Sin embargo, estos fármacos tenían una baja eficacia frente a los síntomas negativos y unos potentes efectos secundarios conocidos como síntomas extrapiramidales (SEP) que incluyen distonias agudas, acatisia, parkinsonismo y discinesia tardía (Divac et al., 2014). Todos los antipsicóticos de primera generación tienen en común que son antagonistas del receptor D2 de dopamina (Lally & MacCabe, 2015), lo que ha propiciado, en parte, el surgimiento de la hipótesis dopaminérgica (**Cuadro 1**).

2.3.2. Antipsicóticos de segunda generación

Años más tarde, los antipsicóticos atípicos o de segunda generación (ASG) propiciaron una nueva revolución con la clozapina a la cabeza (J. Kane et al., 1988) que es efectiva incluso ante el 50-60% de los pacientes resistentes a otros antipsicóticos. Estos parecían tener una mayor eficacia y carecían de los estigmatizantes SEP (Lally & MacCabe, 2015) debido, posiblemente a que también actúan como antagonistas de los receptores de serotonina 5-HT_{2A}. Este efecto permitiría actuar sobre la vía corticolímbica de manera indirecta tal y como postula la hipótesis serotoninérgica (**Cuadro 2**). De esta manera el efecto directo sobre los receptores de dopamina no sería tan potente reduciendo así los SEP derivados del bloqueo de la vía nigrostriatal (Orzelska-Górka et al., 2022). Pronto se unieron nuevos antipsicóticos a esta lista como olanzapina, risperidona, quetiapina y ziprasidona. Sin embargo, a pesar del optimismo inicial, no se ha conseguido un consenso claro sobre las ventajas de los ASG (a excepción de la clozapina) (P. B. Jones et al., 2006; Lieberman et al., 2005) más allá de la eliminación de los SEP en la mayoría de los casos.

Cuadro 1: El papel de la dopamina en la esquizofrenia

Existen 3 vías dopaminérgicas clásicas implicadas en esquizofrenia: vía mesocortical, vía mesolímbica, y vía nigrostriatal.

La vía mesolímbica tiene su inicio en el mesencéfalo (área tegmental ventral) desde donde los cuerpos celulares proyectan sus axones hasta el sistema límbico (núcleo accumbens). La vía mesolímbica está muy relacionada con comportamientos relacionados con procesos de recompensa que median las acciones de estímulos naturales o drogas de abuso (Adinoff, 2004). Se cree que una hiperactivación de esta vía podría provocar los síntomas positivos de la psicosis mientras que una hipoactivación causaría síntomas negativos como anhedonia o apatía.

La vía mesocortical también tiene su origen en el área tegmental ventral, pero proyecta distintas zonas de corteza. Las más importantes para esquizofrenia son, por un lado, la corteza prefrontal dorsolateral, relacionada con funciones cognitivas y ejecutivas y, por otro lado, la corteza prefrontal ventromedial, más implicada en funciones emocionales o afectivas (Koenigs & Grafman, 2009). Se ha propuesto que alteraciones en las neuronas que proyectan a estas regiones podrían estar implicadas en los síntomas cognitivos y negativos respectivamente (Stahl, 2023).

La vía nigrostriatal se proyecta desde la sustancia negra del tronco cerebral hasta el cuerpo estriado y se considera parte del sistema nervioso extrapiramidal. Una de las principales funciones de esta vía es el control de los movimientos motores mediante sus conexiones con el tálamo y la corteza. Alteraciones en esta vía se han propuesto como posibles mecanismos de síntomas extrapiramidales producidos por los antipsicóticos de primera generación (Ward & Citrome, 2018) y, en los últimos años, de síntomas positivos por sus conexiones con el estriado dorsal y medial (McCutcheon et al., 2019).

La **hipótesis dopaminérgica** surgió como posible explicación de las causas de la esquizofrenia debido principalmente a dos razones: la mejora en los síntomas producida por antagonistas de los receptores D2 de dopamina y los estados de psicosis inducidos por anfetaminas (Laruelle, 2014; Shalaby et al., 2022). Esta hipótesis sostiene que la causa de los síntomas positivos es una hiperreactividad en los receptores D2 de dopamina en la vía mesolímbica de la dopamina aunque ha ido sufriendo modificaciones con el paso de los años. Una de las primeras fue que una posible disminución de dopamina en la corteza prefrontal dorsolateral podría estar relacionada con los síntomas cognitivos (Laruelle, 2014). Finalmente, a medida que el estriado dorsal ha ido dejando atrás su exclusividad en las funciones motoras, ha ido creciendo la evidencia de su posible papel en la esquizofrenia (McCutcheon et al., 2019).

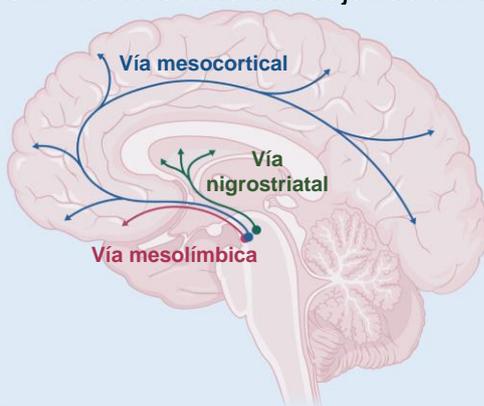


Figura I6. Representación esquemática de las principales vías dopaminérgicas implicadas en esquizofrenia. Se muestran las vías mesolímbica, nigrostriatal y mesocortical con la ubicación de los cuerpos celulares representada por un círculo y las proyecciones mediante flechas. Figura creada con Biorender.

2.3.3. Antipsicóticos de tercera generación

La clozapina, a pesar de ser considerada el *gold standard* para las esquizofrenias resistentes a tratamiento, tiene efectos secundarios importantes como agranulocitosis, miocarditis o cardiomiopatía (Elkis & Buckley, 2016; Gurrera et al., 2022). Esto ha llevado al surgimiento de una tercera generación de antipsicóticos que puedan evitar estos síntomas y ser eficaces en las esquizofrenias que no responden ante clozapina denominadas ultra resistentes. Entre estos encontramos aripiprazol, brexpiprazol o cariprazina. Estos nuevos fármacos, en lugar de actuar como antagonistas de los receptores D2, actúan como agonistas parciales, produciendo una menor activación de estos receptores. De esta manera, son capaces de desplazar a la dopamina y producir una menor activación disminuyendo así la actividad de las neuronas dopaminérgicas y, por tanto, los efectos positivos de la esquizofrenia. Asimismo, el hecho de que permitan cierta activación estaría contribuyendo a la ausencia de SEP permitiendo la función de la dopamina (aunque reducida) en la vía nigrostriatal (Gomes & Grace, 2021) (**Cuadro 1**). Los datos sobre su eficacia son aún insuficientes, pero abren la vía de nuevas soluciones para pacientes con esquizofrenia ultra resistente incluso combinando estos fármacos con clozapina (Vasiliu, 2022).

2.3.4. Futuros tratamientos

En la actualidad se están intentando abrir nuevas vías de tratamiento basándose en maneras indirectas de disminuir la actividad dopaminérgica corticolímbica. Un ejemplo de ello es tratando de mejorar la hipofunción de los receptores NMDA que, según la hipótesis glutamatérgica (**Cuadro 3**), estaría implicada en la patogenia de la esquizofrenia. Se ha propuesto en este sentido el incremento de la D-serina (un coagonista de estos receptores) mediante inhibidores de la enzima D-aminoácido oxidasa que se encarga de metabolizar este aminoácido (C. H. Lin et al., 2018). Otros métodos que se han propuesto para normalizar la actividad de las interneuronas parvalbúmina positivas son la actuación sobre los canales de potasio Kv3.1, incrementar la actividad gabaérgica mediante el receptor GABA_A o disminuir la liberación de glutamato actuando sobre los receptores presinápticos mGluR2/3 (Gomes & Grace, 2021).

Una de las dianas que más atención está recibiendo en los últimos años, son los receptores asociados a trazas de aminas (TAAR). Estos receptores acoplados a proteínas G se expresan en diversas regiones del cerebro y parecen tener una interrelación con el sistema de monoaminas. Existen estudios con agonistas de TAAR1 como SEP-363856 que parecen ser prometedores, aunque son necesarios más estudios para confirmar estos resultados (Dodd et al., 2021).

En cualquier caso, parece claro que el futuro de los tratamientos de la esquizofrenia pasa por una mejora de la selectividad de los fármacos existentes sumada a la combinación de múltiples dianas que estén implicadas en la enfermedad y combinadas con terapias cognitivo-conductuales adecuadas (Morrison, 2017).

Cuadro 2: Hipótesis serotoninérgica

La hipótesis serotoninérgica surgió a raíz del descubrimiento de que antagonistas de los receptores de serotonina 5-HT_{2A} eran capaces de mejorar los síntomas psicóticos en la enfermedad de Parkinson (Stahl, 2016). Lo más importante es que esta mejora se producía sin la necesidad de un antagonista de los receptores D2. De esta manera, un exceso de serotonina, un incremento en la expresión de los receptores 5-HT_{2A} o ambos produciría un aumento en la activación de las neuronas glutamatérgicas corticales que proyectan a VTA causando así las alucinaciones en estos pacientes (Huot et al., 2010). Sin embargo, las evidencias respecto a los antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} aún son preliminares (Romeo et al., 2023).

Estas teorías, además de ser compatibles entre sí, también lo son con la hipótesis del neurodesarrollo. De esta manera, las alteraciones que se producen en el neurodesarrollo podrían implicar tanto receptores de NMDA hipofuncionales como un exceso o hiperfunción en los receptores 5-HT_{2A}, produciendo todos los efectos comentados.

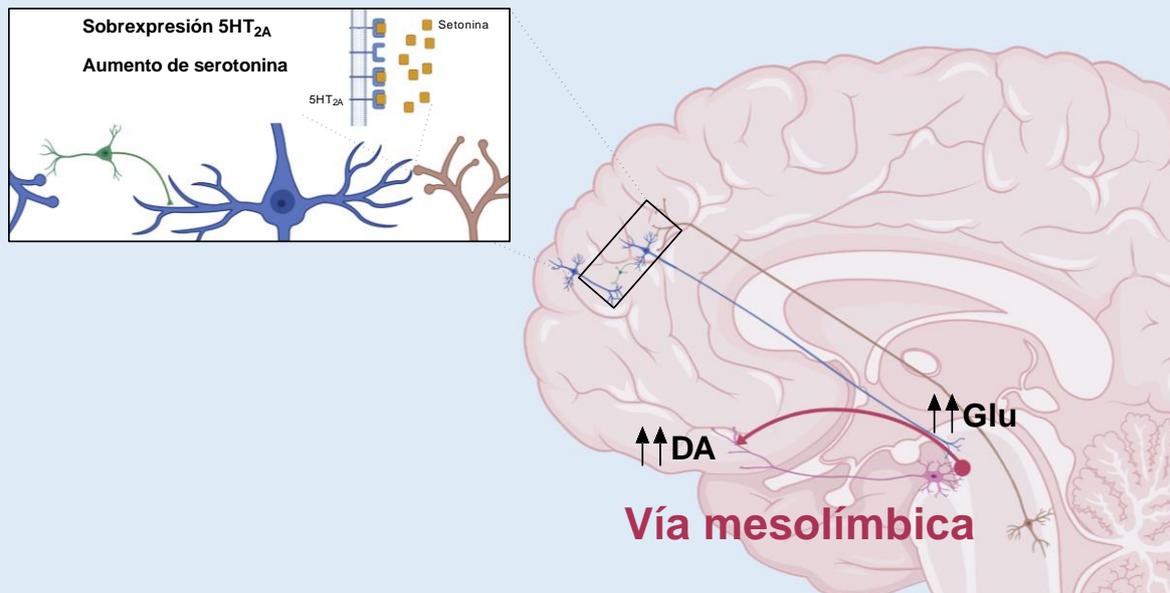


Figura 17. Representación de la hipótesis serotoninérgica. Se muestra como una excesiva liberación de serotonina por parte de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe (neuronas marrones), una sobrexpresión de los receptores de serotonina 5-HT_{2A} en neuronas glutamatérgicas corticales o ambas conducirían a una hiperactivación de las neuronas corticales que proyectan al área tegmental ventral. Esto, a su vez produciría un aumento en la liberación de glutamato (glu) en esa región provocando así un exceso de activación en las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica y una liberación masiva de dopamina (DA) en el estriado que podría estar implicado en los síntomas positivos de la esquizofrenia. Figura creada con Biorender.

Cuadro 3: Hipótesis glutamatérgica

En los años 70, la ketamina y la fenciclidina (PCP, del inglés *phencyclidine*) surgieron como nuevos anestésicos disociativos y años más tarde, se vio que eran capaces de inducir estados psicóticos difícilmente diferenciables de la psicosis producida por la esquizofrenia. Esto junto con el conocimiento de que ambas sustancias eran antagonistas no competitivos de los receptores NMDA, propició la aparición de la hipótesis glutamatérgica (J. T. Coyle, 1996). Esta propone que la hiperreactividad dopaminérgica propuesta por la teoría anterior, en realidad sería secundaria a una hipofunción de los receptores NMDA de corteza prefrontal. En concreto, serían los receptores NMDA de interneuronas gabaérgicas los que estarían alterados. Esto desactivaría una inhibición provocando una activación exagerada de las neuronas piramidales de corteza prefrontal que proyectan al área tegmental ventral y provocarían igualmente una hiperexcitación en las neuronas dopaminérgicas que proyectan al estriado (Stahl, 2018). Esto está respaldado por estudios en los que la administración previa de antagonistas de NMDA a anfetaminas, aumenta la liberación de dopamina.

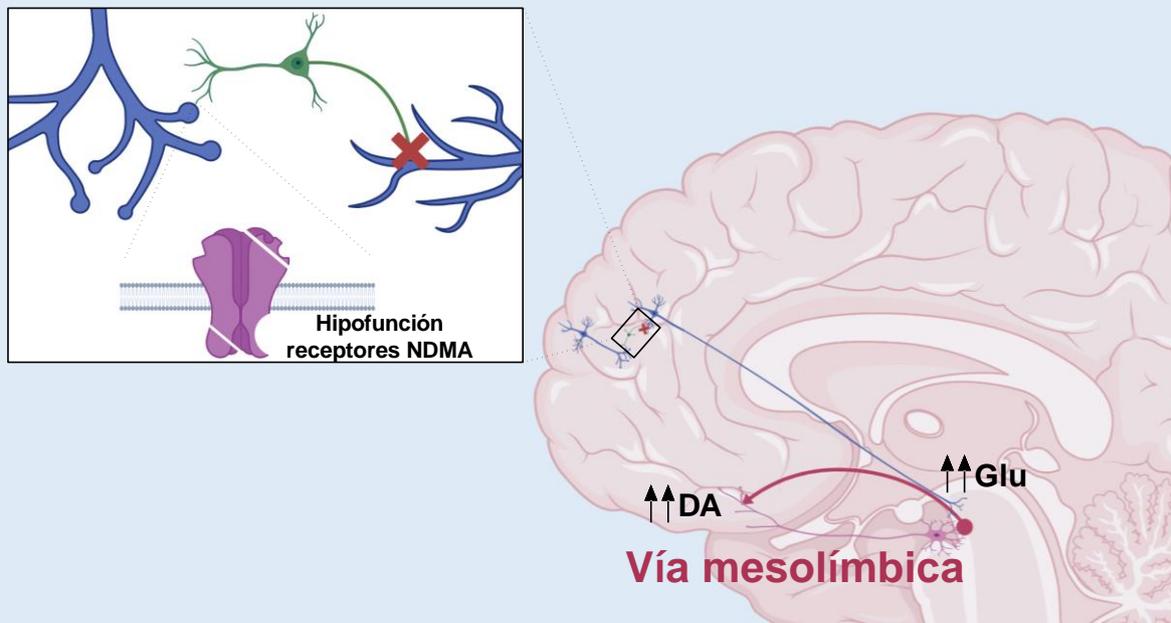


Figura 18. Representación de la hipótesis glutamatérgica. Se ilustra la hipótesis glutamatérgica basada en una hipofunción de los receptores NMDA de las interneuronas gabaérgicas corticales que evitaría la correcta activación de estas neuronas. Esto, a su vez disminuiría la inhibición de neuronas corticales que proyectan hasta el área tegmental ventral provocando un aumento en la liberación de glutamato (glu) en esta región. El exceso de glu provocaría una hiperactivación en las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica causando una excesiva liberación de dopamina (DA) en el estriado que teóricamente estaría implicada en la aparición de los síntomas positivos de la esquizofrenia. Figura creada con Biorender.

2.4. Esquizofrenia y la hipótesis del neurodesarrollo

La hipótesis de que la esquizofrenia esté presente antes de su manifestación clínica es algo que se remonta al inicio de su descubrimiento, cuando Kraepelin catalogaba como una forma leve de *dementia praecox* los comportamientos característicos de niños que luego desarrollarían la enfermedad. Posteriormente, en los años 20 del siglo pasado, se propuso que los cambios neuropatológicos en cerebros de pacientes con esquizofrenia tenían su origen en el desarrollo. En los 60, una serie de estudios reforzaron esta hipótesis reportando una maduración neurológica alterada durante la infancia temprana como característica de niños con alto riesgo de padecer esquizofrenia (Weinberger, 2017). No obstante, la hipótesis del neurodesarrollo es postulada en 1986 por Weinberger y se basa en que, en la esquizofrenia, factores genéticos y ambientales dan lugar a alteraciones en el desarrollo normal del cerebro durante el periodo perinatal dando lugar a los síntomas clínicos en etapas adultas tempranas. Weinberg propone que estas alteraciones afectan a diversos circuitos neuronales sin que ninguno tenga el peso mayoritario que subyace a la patología, siendo este el motivo de la heterogeneidad clínica y biológica de la enfermedad (Schmitt et al., 2022).

2.5. Esquizofrenia y su asociación con las infecciones prenatales

Uno de los factores de riesgo de la esquizofrenia más estudiados es la estación de nacimiento, ya que se ha replicado a lo largo de varios estudios que los individuos nacidos durante el invierno o al inicio de la primavera tienen entre un 5 y un 10% más de probabilidad de padecer esquizofrenia, posiblemente debido al mayor riesgo de infecciones durante la gestación (Bradbury & Miller, 1985; Davies et al., 2003). Otro dato importante de este estudio es el elevado riesgo de sufrir esquizofrenia que tenían las personas nacidas de madres danesas en otros países (hasta un 3,45 más). En otro estudio en el que se analiza a la segunda generación de afrocaribeños emigrados a Londres y se obtuvieron resultados similares, Wessely propone como hipótesis la exposición de la madre a agentes infecciosos poco comunes o ausentes en su lugar de origen (Wessely et al., 1991). Estos hallazgos ayudaron a centrar el foco en un evento que en numerosas ocasiones es causa de teratogénesis en el cerebro del feto: las infecciones durante la gestación. Entre finales del pasado siglo e inicio del presente, diversos estudios han encontrado relación entre la esquizofrenia y numerosas infecciones como la gripe (Brown, Begg, et al., 2004), la rubéola (Brown et al., 2001), toxoplasmosis (Mortensen et al., 2007; Xiao et al., 2009) y otras como poliomielitis, varicela y sarampión (Brown, 2000).

El amplio abanico de infecciones que se han relacionado con el desarrollo de la esquizofrenia parece apuntar hacia un mecanismo en común: la activación inmune materna (AIM). Esto se ve reforzado por varios estudios que relacionan una expresión aumentada de citoquinas como TNF- α (Buka et al., 2001), CXCL8 (Brown, Hooton, et al., 2004) o proteína C reactiva (Canetta et al., 2014) durante el embarazo con un mayor riesgo de esquizofrenia en la descendencia. También podría explicar la asociación que se ha encontrado entre esquizofrenia y enfermedades autoinmunes (Benros et al., 2012; Eaton et al., 2006) debido al importante componente genético

que tienen estas últimas. Es decir, es probable que en esta asociación lo importante sea la mayor probabilidad que tienen estos individuos de tener una madre con enfermedad autoinmune y, por tanto, de mayores concentraciones circulantes de citoquinas durante el embarazo. La exposición a estas infecciones o AIM podría contribuir a alteraciones estructurales como la elongación del *cavum septum pellucidum* que se da en pacientes con esquizofrenia. También se ha observado un menor volumen de las cortezas entorrinal y cingulada, en adultos con esquizofrenia, asociado a la exposición prenatal a CXCL8 (Knuesel et al., 2014).

A pesar del gran esfuerzo de la comunidad científica por desentrañar la relación entre la AIM y la esquizofrenia o las enfermedades del neurodesarrollo, los mecanismos que subyacen esta asociación aún no se conocen con exactitud. Parece que las infecciones durante la gestación podrían provocar una desregulación de las citoquinas que inclinaría la balanza hacia un estado proinflamatorio, afectando así al feto. Algunas de las más estudiadas son IL-6, IL-1 β e IL-17 (Zawadzka et al., 2021). Aunque IL-6 es necesaria para la implantación, se ha visto tanto en modelos animales como en humanos que concentraciones elevadas de esta citoquina están relacionadas con alteraciones en la descendencia o autismo (Jiang et al., 2018; Vargas et al., 2005).

Uno de los mecanismos propuestos es que las infecciones durante la gestación produzcan una liberación excesiva de citoquinas proinflamatorias. IL-6 podría conducir a la activación de los T_h17 maternos que liberarían IL-17A (**Figura I9**). Esta citoquina, en conjunto con IL-6 y TNF- α podrían activar las células inmunes residentes en la placenta activando así la liberación de citoquinas proinflamatorias por la placenta. Además, los T_h17 maternos podrían migrar a la placenta potenciando aún más la liberación de citoquinas, dañando la placenta y comprometiendo su impermeabilidad. De esta manera, más citoquinas podrían cruzar la placenta y algunas de ellas, cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) debido a su inmadurez e iniciar una cascada de neuroinflamación mediante la activación de la microglía (Choi et al., 2016; Zawadzka et al., 2021). Esta activación de la microglía podría retroalimentar un estrés oxidativo ya presente produciendo así alteraciones en el desarrollo normal del cerebro (Khandaker et al., 2015; Perkins et al., 2020).

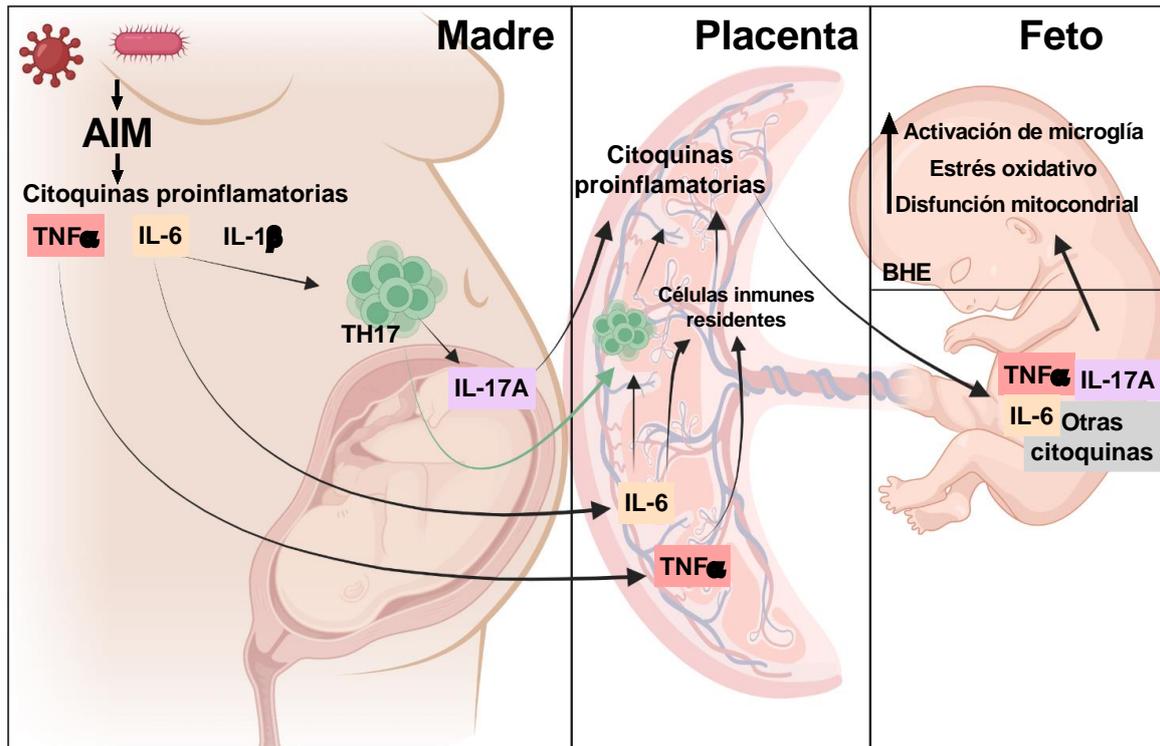


Figura I9. Mecanismo propuesto para la relación entre la activación inmune materna y TEA. Las infecciones durante la gestación producirían una activación del sistema inmune y una liberación de citoquinas como TNF α , IL-6 o IL-1 β . El aumento de IL-6 activa los linfocitos T_H17 que liberan IL-17A. Esta citoquina junto a TNF α e IL-6 pueden llegar a la placenta y activar a las células inmunes residentes que, a su vez liberarán más citoquinas proinflamatorias. Además, los linfocitos T_H17 podrían migrar a la placenta y contribuir al aumento de citoquinas inflamatorias. Este estado inflamatorio podría dañar la placenta permitiendo el paso de las citoquinas hacia el feto y, gracias a una barrera hematoencefálica inmadura (BHE) hacia el cerebro fetal. En el cerebro se produce una activación de la microglía causando una cascada de neuroinflamación y aumento del estrés oxidativo. Esto podría ocasionar disfunción mitocondrial retroalimentando aún más los daños y ocasionando alteraciones en el desarrollo de las neuronas y en las sinapsis que en el futuro podrían dar lugar a enfermedades como TEA. Adaptado de Zawadzka et al., 2021.

2.6. Esquizofrenia y su asociación con el cannabis

Uno de los factores ambientales que más atención ha recibido a lo largo de la historia ha sido el cannabis. El cannabis o marihuana se extrae de la planta *Cannabis sativa* (y otras variantes) que ha sido históricamente cultivada por el ser humano con fines artesanales, recreativos y medicinales (Crocq, 2020; Skoglund et al., 2013). Sus principales componentes actúan sobre un sistema de señalización endógeno denominado sistema endocannabinoide (**Cuadro 4**).

Mientras Emil Kraepelin popularizaba el término *Dementia Praecox*, la Indian Hemp Drug Commission declaraba, en 1894, que un uso excesivo del cannabis “indica e intensifica la inestabilidad mental”. Desde finales de los años 60, existen numerosos casos clínicos que reportan lo que se denominó como “psicosis cannábica”, un conjunto de síntomas desencadenados por un efecto agudo del cannabis que serían similares a los producidos por trastornos psicóticos como confusión, delirios, alucinaciones, amnesia, etc. Sin embargo, el término “psicosis cannábica” está en

entredicho ya que estos efectos se producen en algunos casos de consumos muy elevados y cesan cuando se interrumpe el consumo (Castle & Murray, 2004).

Entre 1969 y 1971 se realizó uno de los primeros estudios en humanos analizando el efecto del hachís en 720 soldados estadounidenses destinados en Europa durante 5 años (Tennant & Groesbeck, 1972). De estos, 115 sufrieron psicosis aguda, análoga síntomas de esquizofrenia, que acabó siendo crónica. Sin embargo, 112 de ellos admitieron consumir además otras drogas como alucinógenos, anfetaminas o alcohol. Cabe destacar que todos estos hombres tenían historiales indicativos de esquizofrenia premórbida. Además, del total de los 36.000 soldados destinados en Europa, el 46% declaró ser consumidor de hachís, pero solo 18 sufrieron psicosis inducida por cannabis. Este es uno de los primeros estudios que establece un principio de relación entre las drogas y la psicosis.

Posteriormente, en 1987, Andréasson tratando de esclarecer la relación iniciada por Tennant y Groesbeck, llevó a cabo uno de los mayores estudios en este campo en una cohorte de militares suecos (Andréasson et al., 1987). Se evaluaron, mediante cuestionarios, las circunstancias personales y el consumo de drogas de hasta 45.500 hombres de unos 20 años nacidos entre 1949-1951. Además, se llevó a cabo una evaluación psicológica mediante pruebas y una entrevista con un profesional. Durante los 15 años siguientes se siguieron los ingresos en el registro nacional de atención psiquiátrica con un diagnóstico de esquizofrenia. Los resultados fueron que el riesgo relativo de desarrollar esquizofrenia es 2,4 veces mayor en personas que consumen cannabis y que éste se va incrementando de manera proporcional al consumo, llegando a un riesgo 6 veces mayor en aquellos que, a la edad de 20 años, habían consumido más de 50 veces en su vida. Sin embargo, este estudio, a pesar de tener en cuenta el consumo de alcohol y narcóticos, fue criticado por no tener en cuenta otras drogas como las anfetaminas que han sido implicadas en el desarrollo de la esquizofrenia (Johnson et al., 1988; Negrete, 1989).

Zammit trató de resolver estos problemas analizando los datos de la misma cohorte, pero aumentando el seguimiento de ingresos en hospitales psiquiátricos hasta 27 años (Zammit et al., 2002). A pesar de corregir los datos por diversos factores como abuso de alcohol, historial familiar de enfermedades mentales, situación financiera familiar, comportamientos problemáticos en la infancia y ocupación de la figura paterna; los autores vuelven a encontrar una relación entre el nivel de consumo y el riesgo llegando a ser hasta 3,1 veces mayor en altos consumidores (más de 50 veces a los 20 años). También encuentran que la asociación entre consumidores e ingresados en centros psiquiátricos en los 5 años posteriores a la cumplimentación de los cuestionarios es más fuerte que entre consumidores e ingresados a partir de los 5 años. Esto podría explicarse con la hipótesis de la automedicación, basada en que los pacientes de esquizofrenia inician el consumo de cannabis debido al alivio que este produce en los síntomas. Sin embargo, los autores lo atribuyen a un fallo en el diseño del estudio ya que el consumo de cannabis solo fue analizado a los 20 años y en años posteriores algunos sujetos pudieron interrumpir el consumo.

Finalmente, Manrique García llevó a cabo un tercer análisis de los datos de esta cohorte aumentando el seguimiento hasta 35 años (Manrique-García et al., 2012).

Nuevamente, los autores vuelven a confirmar que existe un riesgo dependiente del consumo de desarrollar esquizofrenia (3-3,7 veces mayor). Destacan también que observan una asociación dosis-respuesta más fuerte con esquizofrenia (3,7 veces más riesgo en grandes consumidores) que con otras psicosis no relacionadas con drogas (2,6 veces más riesgo como máximo).

Estos tres estudios realizados en cohortes de militares suecos supusieron aportaciones de valor incalculable en el estudio de la relación entre el cannabis y la esquizofrenia. Sin embargo, todos adolecen de los mismos problemas: el consumo solo fue analizado una vez a los 20 años y no se preguntó por drogas como anfetaminas o LSD que son importantes en esta relación.

En 2002, se realizó un estudio teniendo en cuenta la predisposición a desarrollar esquizofrenia, en niños y niñas, entendida como la presencia de síntomas psicóticos en edades tempranas (Arseneault et al., 2002). Este estudio estableció que, incluso corrigiendo por la presencia de psicosis a los 11 años, los consumidores de cannabis tenían más síntomas de esquizofrenia que los no consumidores. Posteriormente, esta cohorte fue revisada utilizando un polimorfismo funcional de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) como biomarcador de una posible interacción genética-ambiente. Este gen está ubicado en una región del genoma muy implicada en esquizofrenia (22q11) cuya delección está asociada con una alta incidencia de esquizofrenia (Caspi et al., 2005). El estudio concluyó que los consumidores con un polimorfismo de funcionalidad alta e intermedia tenían mayor riesgo (10 y 2,5 veces respectivamente) que los no consumidores. Sin embargo, los participantes con el polimorfismo de funcionalidad baja no veían incrementado su riesgo al consumir.

Otro estudio en 2005 analizó la relación entre el cannabis y la predisposición de sufrir esquizofrenia medida mediante puntuaciones en las subescalas de ideación paranoide y psicoticismo del test SCL-90 (Henquet et al., 2005). De nuevo, demostró que, en individuos vulnerables, el consumo de cannabis aumentaba el riesgo de desarrollar síntomas psicóticos de un 6,3% (no consumidores) a un 23,8%. Más tarde, se reanalizó la misma cohorte aumentando el tiempo de seguimiento hasta un total de 10 años (Kuepper et al., 2011). Lo más relevante de este estudio es que posee datos de cuestionario a lo largo de todo el estudio (tras 1,6; 3,5 y 8,4 años) y esto permitió arrojar evidencia en contra de la hipótesis de automedicación ya que las experiencias psicóticas tempranas no predecían el consumo de cannabis. A su vez, ayudó a clarificar el problema de la causalidad entre las experiencias psicóticas y el consumo de cannabis debido a que excluyó a todos los individuos con experiencias psicóticas preexistentes. También evidenciaron que una exposición a cannabis prolongada en el tiempo se asociaba con un mayor riesgo de experiencias psicóticas.

A lo largo de las últimas cuatro décadas, tanto los estudios comentados como muchos otros han intentado arrojar luz sobre la compleja relación que existe entre la esquizofrenia y el consumo de cannabis. En todo este tiempo se ha llegado a varias conclusiones generalmente aceptadas: el consumo de cannabis aumenta el riesgo de padecer trastornos psicóticos en personas sin historial de psicosis, este riesgo se incrementa con la dosis y el tiempo de consumo y, en individuos vulnerables a desórdenes psicóticos empeora la prognosis.

Cuadro 4: El sistema endocannabinoide

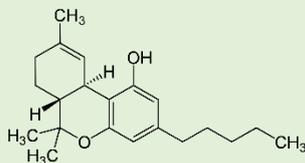
El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de señalización capaz de interactuar con múltiples vías celulares para modular la actividad neuronal. La mayoría de los efectos psicoactivos del cannabis están mediados por la interacción del Δ^9 -tetrahidrocannabinol o THC con los receptores de este sistema (Lu & Mackie, 2021).

Receptores. Los principales receptores del SEC son CB₁R y CB₂R, ambos son receptores acoplados a proteínas G, inhibitoras en este caso. Sin embargo, CB₁R se localiza mayoritariamente en el sistema nervioso central, más abundantemente en interneuronas gabaérgicas, aunque también se encuentra en neuronas glutamatérgicas, serotoninérgicas, etc. Entre sus funciones destacan funciones cognitivas, locomotoras o de regulación de la temperatura. En cambio, CB₂R se expresa principalmente en tejidos y células del sistema inmune como bazo o microglía, aunque también se encuentra en menor proporción neuronas. Tiene una función importante como modulador del sistema inmune (Cabral et al., 2008; Howlett et al., 2002).

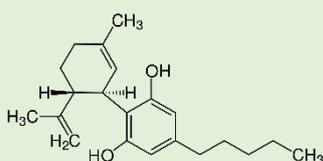
Endocannabinoides. El 2-araquidonilglicerol (2-AG) y la N-araquidoniletanolamina (o anandamida, AEA) son los principales ligandos endógenos de los receptores del SEC. Son de carácter lipídico y se sintetizan a partir del ácido araquidónico. La AEA es un agonista parcial de ambos receptores, aunque funcionalmente es prácticamente inactivo para CB₂R. En cambio 2-AG es un agonista completo y tiene una mayor afinidad por ambos (Di Marzo et al., 2005).

Síntesis y degradación. Las principales enzimas de síntesis son la fosfolipasa D de N-acil-fosfatidiletanolaminas (NAPE-PLD) en el caso de AEA y la diacilglicerol lipasa (DAGL) para 2-AG. Por otro lado, las enzimas encargadas de la degradación de estos endocannabinoides son amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amide hydrolase*) para AEA y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) para 2-AG (Di Marzo et al., 2005).

Fitocannabinoides

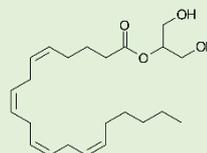


Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC)

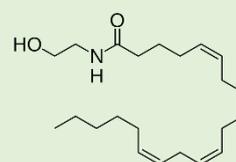


Cannabidiol (CBD)

Endocannabinoides



2-araquidonilglicerol (2-AG)



N-araquidoniletanolamina (AEA)

2.6.1. Alteraciones del SEC en esquizofrenia

En medidas periféricas parece existir una sobreactivación del sistema endocannabinoide evidenciada por elevaciones de los niveles de expresión génica de CB₁R y CB₂R en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cell*) en pacientes de esquizofrenia. Se han documentado también disminuciones en los niveles de proteína de los principales enzimas de síntesis (NAPE-PLD y DAGL) y aumentos de los enzimas de degradación (MAGL y FAAH) (Bioque et al., 2013; Chase et al., 2016). En líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia se han observado principalmente aumentos en los niveles de anandamida, aunque desaparecían en los individuos con un consumo más elevado de cannabis (Leweke et al., 2007; Reuter et al., 2017). Estos cambios no han sido observados en pacientes tratados con antipsicóticos típicos (Giuffrida et al., 2004). En cuanto a los cambios en la expresión génica de CB₁R en corteza prefrontal, existe una falta de consenso ya que algunos estudios encuentran incrementos (Muguruza et al., 2019) en pacientes con esquizofrenia mientras que otros observan disminuciones (Eggan et al., 2008) o no reportan cambios (Dalton et al., 2011). Sin embargo, en corteza cingulada se encuentra un aumento de la unión a estos receptores (Newell et al., 2006; Zavitsanou et al., 2004). En CB₂R no se han hallado cambios en su expresión génica en función del diagnóstico, aunque sí se ha relacionado un polimorfismo del gen (*CNR2*) con un mayor riesgo de esquizofrenia y menores niveles de expresión. Respecto a las enzimas más importantes de este sistema, se han encontrado aumentos en la expresión génica de 2-AG en corteza prefrontal, giro frontal superior e hipocampo (Muguruza et al., 2013; Yu et al., 2020).

También se han realizado análisis de actividad mediante estudios de tomografía por emisión de positrones encontrando nuevamente resultados contradictorios entorno a CB₁R. Algunos autores reportan aumentos en la actividad de este receptor (Ceccarini et al., 2013; Wong et al., 2010), mientras que otros han encontrado disminuciones de su actividad (Borgan et al., 2019; Ranganathan et al., 2016) en pacientes con esquizofrenia. También se han realizado estudios de actividad de FAAH, aunque no se han encontrado cambios significativos por efecto del diagnóstico (Watts et al., 2020).

El consumo de cannabis, especialmente durante la adolescencia, produce alteraciones en el desarrollo y funcionamiento normal del cerebro en individuos sanos (Lubman et al., 2015). Parece que estas alteraciones podrían influir en las que produce la esquizofrenia. Se ha documentado que el consumo de cannabis durante la adolescencia reduce algunos déficits cognitivos en pacientes de esquizofrenia como los relacionados con la velocidad de procesamiento, la memoria de trabajo y la memoria verbal (Hanna et al., 2016). Estudios de resonancia magnética han demostrado una mayor reducción del volumen y la densidad de materia gris en la corteza cingulada posterior de pacientes de esquizofrenia consumidores de cannabis comparados con pacientes no consumidores (Bangalore et al., 2008). También se ha observado un mayor incremento del volumen de los ventrículos y un mayor adelgazamiento de corteza prefrontal dorsolateral, corteza cingulada anterior y el lóbulo izquierdo occipital en los pacientes de esquizofrenia que tras el primer episodio psicótico continúan el consumo de cannabis (Malchow et al., 2013).

2.7. Hipótesis del doble impacto

Cómo se ha visto hasta ahora, existen numerosos factores capaces de alterar el neurodesarrollo y tras el desarrollo de la hipótesis del neurodesarrollo, pronto se hace evidente la importancia de la combinación de factores capaces de alterar el neurodesarrollo. De esta manera surge la hipótesis del doble impacto que propone que dos factores pueden actuar de manera sinérgica y producir alteraciones en el neurodesarrollo que darán lugar a la enfermedad. En un primer momento, esta hipótesis surge como una manera de unificar la hipótesis del neurodesarrollo con un posible origen genético, aunque pronto se hace extensiva a cualquier combinación de los factores comentados (Bayer et al., 1999). La influencia genética en esta enfermedad no es algo nuevo, ya que desde principios del siglo pasado se tiene en cuenta el componente hereditario. En el momento del surgimiento de esta hipótesis se tiene evidencia tanto de diversos loci asociados a la esquizofrenia (Bassett, 1991; Kendler & Diehl, 1993) como de estudios de gemelos (Kendler, 1983). Los avances en las técnicas de secuenciación han permitido un crecimiento exponencial en el tamaño de los estudios, que ha pasado en las últimas décadas de cientos de individuos a cientos de miles de casos estudiados. El último y más grande de estos GWAS (del inglés *genome-wide association study*; estudio de asociación del genoma completo), realizado por el consorcio de genómica psiquiátrica, incluye 76.755 paciente de esquizofrenia y 243.649 controles (Trubetskoy et al., 2022). En este estudio se encontraron variantes comunes en esquizofrenia asociadas a 287 loci distintos. Estas asociaciones estaban enriquecidas con genes expresados en neuronas glutamatérgicas de corteza e hipocampo (piramidales CA1 y CA3 y granulosas del giro dentado) y en interneuronas inhibitoras de corteza. Entre los genes más importantes se encontraron varios que codifican receptores y canales de calcio como receptores metabotrópicos de glutamato (*GRM1*) y GABA (*GABBR2*), subunidades del receptor NMDA (*GRIN2A*) y canales de calcio y cloro activados por voltaje (*CACNA1C* y *CLCN3*). También se hallaron genes implicados en la organización sináptica y la diferenciación (*DLGAP2*, *LRRC4B*, *GPM6A*, *PAK6*) y la modulación de la transmisión química (*MAPK3*, *DCC*, *CLCN3*, *DLGAP2*). La amplia variabilidad de genes implicados en las sinapsis encontrados en este estudio sugiere un papel importante de esta función en el riesgo de padecer esquizofrenia.

De esta manera, esta hipótesis propone que un primer impacto (o requisito), como factores genéticos o infecciones durante el parto, produciría una vulnerabilidad en el individuo y que sería un segundo (o múltiples) impacto, como estrés o consumo de drogas durante la vida del individuo, el que desencadenaría los síntomas de la enfermedad. Estudios posteriores no han hecho más que confirmar la complejidad de los factores de riesgo de la esquizofrenia (Davis et al., 2016), siendo lo más probable que en muchos casos sean necesarios más de un impacto y que cada uno de ellos contribuya de manera diferente a la enfermedad.

3. Modelos animales

La esquizofrenia, es una enfermedad inherentemente humana y, por tanto, imposible de reproducir en su totalidad en animales. No obstante, los modelos animales, desde el máximo respeto a los criterios éticos como las 3 R, es la mejor manera que tenemos de avanzar en el conocimiento de este tipo de enfermedades. Aunque los criterios de validez Willner (Willner, 1984) siguen siendo la base sobre la que se sustentan los modelos actuales, estos están siendo ampliados precisamente a causa de la complejidad sintomática y patogénica de las enfermedades que tratamos de modelizar (Belzung & Lemoine, 2011). De este modo, un buen modelo animal debe de cumplir el criterio de constructo que puede dividirse en 3 criterios. La validez homóloga tiene en cuenta la importancia de la especie y la cepa elegida, la validez patogénica valora la similitud de los procesos (genéticos, AIM, consumo de drogas, etc.) que dan lugar a la enfermedad mientras que la validez mecánica se refiere a los mecanismos cognitivos o neurobiológicos que dan lugar a los síntomas de la enfermedad. El segundo criterio, el de validez aparente, tiene en cuenta lo observado en un organismo patológico, valorando especialmente el significado abstracto más que el concreto. Por ejemplo, en roedores la construcción del nido puede entenderse como analogía de la actividad diaria en humanos. Finalmente, la validez predictiva, evalúa tanto el desencadenamiento de los síntomas como la efectividad de agentes terapéuticos.

La dimensión positiva de los síntomas de esta enfermedad hace que sea especialmente complejo cumplir algunos de estos criterios de validez en modelos animales. Tradicionalmente y debido al peso de la hipótesis dopaminérgica, se ha utilizado la hiperactividad locomotora en respuesta a anfetamina como una aproximación a los síntomas positivos de esta enfermedad. Esto se debe a que lesiones en el núcleo accumbens eliminan este tipo de respuesta, por lo que se ha utilizado como medida del funcionamiento de la neurotransmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico (Van Den Buuse, 2010).

No obstante, en la última década han surgido nuevos procedimientos que tratan de medir procesos que subyacen a los síntomas positivos como la exactitud de las representaciones mentales de la realidad (Busquets-Garcia et al., 2017; M. A. McDannald et al., 2011; M. McDannald & Schoenbaum, 2009; Wheeler et al., 2013). Estos procedimientos se basan en las similitudes que podrían mostrar las alucinaciones y delirios en pacientes con procesos de alteración mediada del valor de la respuesta en animales. Las personas con esquizofrenia malinterpretan la información procedente de su entorno para que se adapte a las creencias propias (representación mental de la realidad) que van en contra de la realidad. En roedores, este proceso puede modelizarse a través de modificaciones del fenómeno de condicionamiento mediado. En el condicionamiento clásico, el animal puede asociar un estímulo aversivo como malestar gástrico con un olor agradable. Para ello, tras unas sesiones, el olor evocará de alguna manera, en su mente, las propiedades negativas del malestar, devaluando así el valor inicial del estímulo. Con el condicionamiento mediado, se descubrió que esta “evocación” de propiedades causadas por un estímulo devaluado podía afectar a otros que nunca habían estado en contacto con el estímulo aversivo (Holland, 1981). De esta manera si el olor

condicionado era asociado previamente (precondicionamiento sensorial) a otro estímulo como por ejemplo un sabor, este otro estímulo era capaz de adquirir las propiedades del condicionamiento (en este caso negativas). Este fenómeno es conocido como aversión al gusto mediada por representación y, en animales normales, solo se da cuando el precondicionamiento sensorial es corto. Esto podría indicar que, con un entrenamiento corto, el estímulo condicionado evoca una representación del estímulo gustativo (no condicionado) altamente realista y difícilmente distinguible del estímulo real que podría asemejarse a una alucinación de dicho estímulo (**Figura 110**). Sin embargo, con un entrenamiento prolongado, la representación evocada es sustituida por una menos sensorial y más distinguible del estímulo real. En este caso, la presencia de condicionamiento mediado incluso en entrenamientos prolongados, podría indicar alteraciones en los procesos que guían las representaciones internas de la realidad. (H. J. Kim & Koh, 2016).

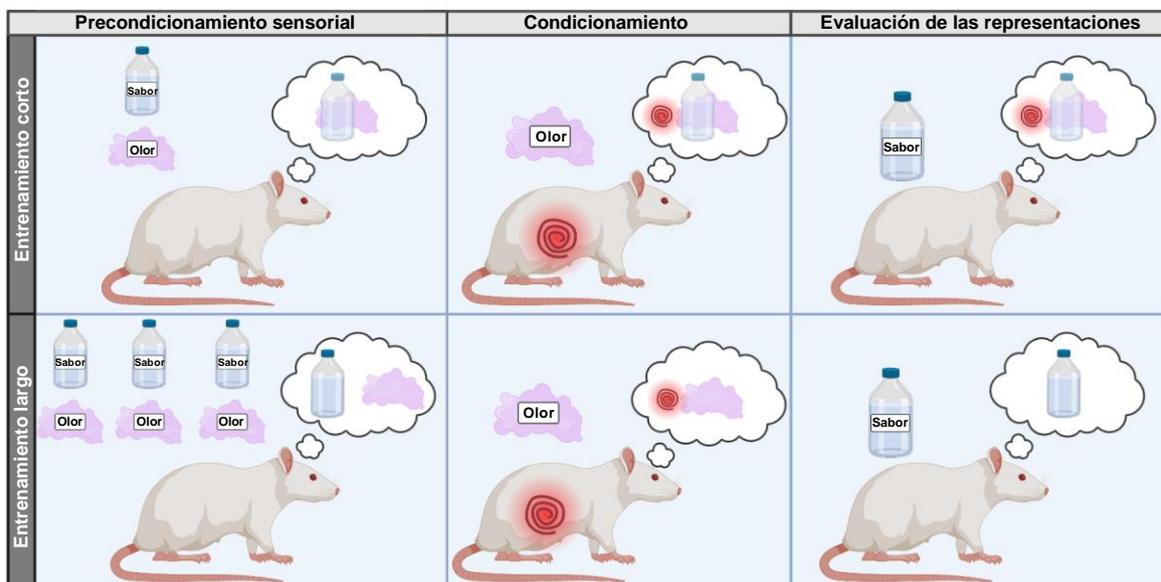


Figura 110. Procedimiento de evaluación de las representaciones mentales. Se representa la hipótesis de la “representación unificada” para explicar el posible mecanismo del precondicionamiento sensorial. En caso de un entrenamiento corto (arriba), el animal no sería capaz de separar con claridad las representaciones mentales asociadas a cada uno de los estímulos que han sido presentados en conjunción durante el precondicionamiento sensorial. De esta manera, tras condicionar uno de los dos estímulos, este fenómeno será asociado a la representación difusa de ambos estímulos produciéndose así un condicionamiento mediado. Sin embargo, ante un precondicionamiento sensorial largo (abajo), el animal debería ser capaz de producir representaciones mentales de los dos estímulos diferenciables entre sí. Así, al condicionar uno de los dos estímulos, la representación mental del otro no se verá afectada y no se producirá condicionamiento mediado.

3.1. Genéticos

Tradicionalmente han existido una serie de genes que se han asociado a la esquizofrenia. Sin embargo, el paso de los años y la llegada de las técnicas de secuenciación masiva los han relevado a un segundo plano. Actualmente, las evidencias existentes apuntan a que ningún gen por sí solo tiene un peso mayoritario en el desarrollo de esta enfermedad (Farrell et al., 2015). En la actualidad, está generalmente aceptado que la esquizofrenia surge de complejas interacciones entre numerosos factores ambientales y diversas alteraciones genéticas (Legge et al., 2021; Stilo & Murray, 2019). Sin embargo, parte del avance en el conocimiento de esta enfermedad se debe a la utilización de modelos basados en estos genes considerados como candidatos históricos.

Un ejemplo de ello son los modelos que utilizan DISC1 (Jaaro-Peled, 2009; Juan et al., 2014), un gen cuya mutación por traslocación fue descubierta en una familia escocesa con numerosos miembros afectados por enfermedades mentales (Millar et al., 2000). Aunque este gen codifica una proteína sináptica implicada en el desarrollo prenatal y postnatal de neuronas, su consideración actual como factor de riesgo en la esquizofrenia es materia de debate (Farrell et al., 2015; Mathieson et al., 2012; H. Y. Wang et al., 2018). Otro modelo de este tipo son los animales con una deleción en el cromosoma 22q11.2 (Ellegood et al., 2014) y trata de replicar el síndrome de deleción de 22q11.2 (22qDS). En esta región se encuentra el gen que codifica para COMT, una enzima involucrada en la degradación de la dopamina. Este síndrome tiene una prevalencia de aproximadamente el 1% en pacientes de esquizofrenia y se caracteriza por leves dismorfias faciales, dificultades en el aprendizaje y anomalías congénitas en aquellos que lo sufren (Bassett & Chow, 2008). Finalmente, otros genes utilizados en el estudio de la esquizofrenia mediante modelos animales son la neuroregulina1 (NRG1) (Chen et al., 2008), disbindina (Cox et al., 2009), reelina (Krueger et al., 2006) y otros relacionados con la D-serina (Labrie et al., 2009) como DAOA, DAO y SRR. La NRG1 es una molécula de adhesión implicada en el desarrollo del sistema nervioso mientras que la disbindina y la reelina están relacionadas con la sinapsis y la plasticidad (Winship et al., 2019). En cambio, la D-serina es un importante modulador de los receptores NMDAR, que han sido implicados en la fisiopatología de la esquizofrenia (J. T. Coyle, 2006).

3.2. Modelos inducidos por drogas

Como se ha comentado, las drogas se han relacionado en numerosas ocasiones con el desarrollo de la esquizofrenia. Los modelos más frecuentes de este tipo son los que se basan en la hipótesis dopaminérgica y tratan de aumentar su concentración en el cuerpo estriado. Entre las drogas más utilizadas están la anfetamina y algunos antagonistas no competitivos de los receptores NMDA (fenilciclidina, ketamina y MK-801).

En el primer caso, se ha utilizado una sensibilización a anfetamina causada mediante su administración intermitente. Sin embargo, a pesar de que este modelo es capaz de replicar algunos síntomas como déficits en el filtrado preatencional (Murphy et al., 2001), no parece capturar la totalidad de los síntomas cognitivos (Featherstone et al., 2008) ni síntomas de la dimensión social (Sams-Dodd, 1995).

En el caso de los antagonistas no competitivos de los receptores NMDA, estos producen, en roedores, hiperlocomoción (Kalinichev et al., 2008), retraimiento social (Sams-Dodd, 1998) y déficits cognitivos y en el filtrado preatencional (Mansbach & Geyer, 1989).

Otros modelos menos extendidos son la inyección directa en regiones específicas del cerebro de algunos fármacos. Se han encontrado, en cerebros *post mortem* de pacientes con esquizofrenia, alteraciones en las interneuronas pavalbúmina positivo de corteza prefrontal (Gonzalez-Burgos et al., 2015). Algunos estudios han inyectado directamente antagonistas de los receptores GABA_A en corteza prefrontal con el fin de replicar estas observaciones y consiguiendo, de esta manera, reproducir alteraciones cognitivas, emocionales y dopaminérgicas similares a las de la esquizofrenia (Tse et al., 2015).

3.3. Modelos del neurodesarrollo

Basándonos en los criterios comentados, los modelos de desarrollo son los únicos que tratan de replicar la hipótesis más aceptada por la comunidad científica, la hipótesis del neurodesarrollo (Eyles, 2021; Schmitt et al., 2022). En estos modelos se utilizan factores ambientales o fármacos que sean capaces de provocar disrupciones en el neurodesarrollo durante la etapa perinatal para luego estudiar posibles alteraciones durante la etapa adulta, cumpliendo así con el criterio de validez patogénica.

3.3.1. Modelos de un impacto

3.3.1.1. Modelos de activación inmune prenatal

Los modelos más comúnmente utilizados en el estudio de la esquizofrenia son los de activación inmune materna. Como se ha comentado, hay una amplia diversidad de infecciones durante el embarazo que están relacionadas con el mayor riesgo de sufrir esquizofrenia. La hipótesis de que el mecanismo que compartirían es la activación del sistema inmune materno es la base que sustenta estos modelos. En un principio, se utilizaron virus de la gripe humanos adaptados para roedores (Shi et al., 2003). No obstante, a medida que creció la evidencia de que es el sistema inmune materno y no el virus en sí (Shi et al., 2005) el que provoca las alteraciones, los virus se sustituyeron por dos agentes no infecciosos inductores del sistema inmune.

El primero es el lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas y conocido inductor del sistema inmune (Andersson et al., 1992) que empezó a utilizarse como modelo a principios de este milenio (Borrell et al., 2002; Fortier et al., 2004). El LPS induce una activación de la respuesta inmune mediante su unión al receptor tipo Toll 4 (Cuadro 5) que, en última instancia, provoca la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1b, IL-6, TNF α , IFN α e INF β (Bao et al., 2022). El tipo de LPS, el lote, la ventana de inyección, la vía de administración y las especies utilizadas son factores que influyen en gran medida en las alteraciones producidas en la descendencia (Kentner et al., 2019; Parusel et al., 2017). El más utilizado es el procedente de *Escherichia coli* y suele administrarse, en ratas, entre los

días de gestación (DG) 12-17 que se corresponden de manera aproximada con el segundo trimestre de gestación humana (Bao et al., 2022; Boksa, 2010).

La administración prenatal de LPS provoca una activación de la microglía, neuroinflamación, cambios en el volumen total del cerebro, daños en el cerebro fetal y la sustancia blanca (Capellán et al., 2023; Domínguez Rubio et al., 2017; J. Y. Lee et al., 2019; Rousset et al., 2006; Vojtechova et al., 2021). En el caso de la neurogénesis, la mayoría de estudios reportan déficits en el hipocampo (Cui et al., 2009; Graciarena et al., 2010; Hester et al., 2018; Y. L. Lin & Wang, 2014; Mouihate et al., 2019; Okano et al., 2023), aunque existen estudios que reportan aumentos tanto en el hipocampo como en la zona subventricular (Pang et al., 2016). En relación a los receptores, se han observado disminuciones de la afinidad por receptores D2 de dopamina en corteza prefrontal (Baharnoori et al., 2013), aumentos de los niveles de proteína de D1 en el estriado (Zager et al., 2012). También se ha reportado una hipofunción en los receptores NMDA del hipocampo (Escobar et al., 2011) y un aumento, en machos, de los receptores de 5-HT_{2A} en corteza prefrontal (Wischhof, Irrsack, Dietz, et al., 2015). Asimismo, alteraciones del conectoma importantes en esquizofrenia como un menor número de células parvalbúmina positivas en corteza prefrontal medial, hipocampo y corteza entorrinal han sido replicadas en estos modelos (Wischhof, Irrsack, Osorio, et al., 2015).

Respecto al comportamiento, este modelo es capaz de producir alteraciones en conductas relacionadas con la sintomatología negativa de la esquizofrenia como el retraimiento social o la anhedonia. En este sentido se han observado déficits sociales como una reducción de la interacción social (Fortunato et al., 2017; Kirsten et al., 2010; Xu et al., 2017) o una reducción en el número y la duración de vocalizaciones (Baharnoori et al., 2012). No obstante, otros autores no han encontrado cambios en este ámbito (Batinić et al., 2016; Santos-Toscano et al., 2016) o reportan comportamientos sociales aumentados con extraños (Harvey & Boksa, 2014). En cuanto a la posible anhedonia, no hay un consenso claro, ya que solo hay un estudio que describe disminuciones en la preferencia por sacarosa (Ranaei et al., 2020) y en otro no se encuentran cambios (Rahimi et al., 2020). En cuanto a la dimensión cognitiva, numerosos estudios reportan déficits en diferentes ámbitos de la memoria (P. Coyle et al., 2009; Santos-Toscano et al., 2016; F. Wang et al., 2020; H. Wang et al., 2010). Sin embargo en la prueba de inhibición por prepulso de la respuesta a sobresalto (PPI, del inglés *prepulse inhibition test*) aunque muchos autores observan déficits en esta prueba (Basta-Kaim et al., 2012; Basta-Kaim, Budziszewska, et al., 2011; Lotter et al., 2020; Romero et al., 2007; Santos-Toscano et al., 2016, 2020), otros no encuentran cambios en este sentido o solo en algunas edades (Capellán et al., 2022; Chamera et al., 2020). Entre las alteraciones que podrían estar presentes en procesos que subyacen a los síntomas positivos, en este modelo se han encontrado alteraciones en la respuesta locomotora inducida por anfetamina (Basta-Kaim, Fijał, et al., 2011; Batinić et al., 2017; Zager et al., 2012). En cuanto a las diferencias entre sexo algunos estudios han observado mayores alteraciones en los machos, especialmente en la prueba de PPI (Foley et al., 2015; Wischhof, Irrsack, Osorio, et al., 2015) y en la memoria (Alizadeh et al., 2020; Batinić et al., 2016; Santos-Toscano et al., 2016).

Cuadro 5: Receptores tipo Toll

¿Qué son? Los receptores tipo Toll o TLR son una familia de receptores englobada dentro de los receptores reconocedores de patrones. Estos son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos e inducir una respuesta inmune. Fueron descubiertos en un primer momento buscando genes homólogos a la proteína Toll, un regulador central de la respuesta antimicrobiana en *Drosophila melanogaster* (Lemaitre et al., 1996).

¿Cómo son? Todos los TLR son receptores transmembrana tipo I con un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio TIR citosólico. Sin embargo, cada organismo puede expresar un número distinto de variantes TLR, en el caso de los humanos se expresan hasta 10 (Fitzgerald & Kagan, 2020) mientras que las ratas llegan hasta 13 (Biswas et al., 2009). Además, las distintas variantes de TLR están especializadas en distintas detecciones en función de su ubicación (**Tabla I1**).

¿Cómo actúan? Cuando los TLR interactúan con su ligando (**Figura I5**), se produce la dimerización de su dominio citosólico y este a su vez, induce una cascada de señalización que activa el complejo quinasa IκB (IKK, del inglés *IκB kinase*). Este complejo fosforila los inhibidores de la familia IκB provocando su eliminación y permitiendo la expresión, mediada por el complejo NF-κB, de toda una serie de genes de la respuesta inmune (Fitzgerald & Kagan, 2020).

Variante	Ubicación	Ligando
TLR4	Membrana plasmática	LPS
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteínas
TLR2		Lipoproteínas
TLR5		Flagelina
TLR6	Membrana plasmática	Lipoproteínas
TLR3		Endosomas
TLR7	Endosomas	ARN
TLR8		ARN
TLR9		ADN
TLR13		ARNr

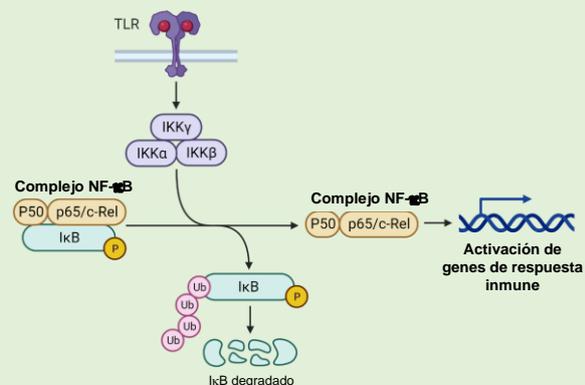


Figura I11. Señalización de los receptores tipo Toll.

Tabla I3. Variantes TLR. Se recogen distintas variantes de los receptores tipo Toll así como su ubicación en la célula (receptores rojos) y sus correspondientes ligandos como LPS, lipoproteínas, flagelina, ARN de cadena doble, simple o ribosómico y ADN no metilado rico en islas CpG.

El segundo de ellos es el ácido polinosínico:policitídílico (poli I:C), un análogo del ARN de doble cadena (Meyer, 2014). El ARN de doble cadena es un intermediario generado en la replicación viral o en la transcripción de virus de ADN e induce una respuesta mediada por TLR3 que acaba activando las mismas vías de señalización que el LPS (NF- κ B, AP-1 e IRF3) dando lugar a la expresión de citoquinas inflamatorias como las comentadas anteriormente (Bao et al., 2022; Matsumoto & Seya, 2008) (**Cuadro 5**).

Este modelo ha sido capaz de reproducir, a nivel neuropatológico un mayor volumen de los ventrículos y una disminución en número de interneuronas parvalbúmina positivas y del volumen en el hipocampo (Maleninska et al., 2022; Piontkewitz et al., 2012).

Entre las alteraciones de comportamiento, este modelo ha demostrado ser capaz de mimetizar síntomas negativos como alteraciones en la interacción social (Lins et al., 2019; Malkova et al., 2012; Osborne, Solowij, Babic, Lum, Huang, et al., 2019) y síntomas cognitivos como perturbaciones en la memoria (Chang et al., 2020; Murray et al., 2017) o en la PPI (Ding et al., 2019; Weber-Stadlbauer et al., 2017). Sin embargo, parece que estos déficits en la PPI dependen de la ventana de administración del inmunógeno ya que no se reportan cuando poli I:C se administra a DG15, pero sí a DG9 (Guerrin et al., 2022; Haddad et al., 2020). En cuanto a los síntomas positivos se han encontrado alteraciones en la actividad locomotora inducida por anfetaminas (García-Partida et al., 2022; Lins et al., 2018). En este modelo también existen diferencias entre sexos, con mayores déficits en los machos tanto en interacción social (Gzielo et al., 2021; Rieger et al., 2023) como en memoria (Dabbah-Assadi et al., 2019; Gogos et al., 2020) o PPI (Meehan et al., 2017).

Las principales diferencias entre ambos inmunógenos son, en primer lugar, el animal utilizado ya que el LPS es más utilizado en rata y poli I:C en ratón. En cuanto a los efectos, poli I:C produce retraso en el crecimiento y una inflamación a largo plazo en la descendencia no observados con LPS, donde sí se aprecia una menor supervivencia de las crías (Arsenault et al., 2014; A. J. Lee et al., 2013). Ambos inmunógenos permiten generar modelos con una excelente validez en los criterios comentados, incluido el predictivo, ya que se ha demostrado una atenuación de los síntomas en respuesta a antipsicóticos (Chamera et al., 2022; Lotter et al., 2020; MacDowell et al., 2021). No obstante, el hecho de que el LPS produzca déficits en la PPI en una ventana más similar al segundo trimestre humano y de que produzca también complicaciones obstétricas (como se observa en esquizofrenia) le aporta una mayor validez aparente. Entre las principales limitaciones de este modelo se encuentran problemas en la reproducibilidad, ya que a las diferencias entre inmunógenos se suman las existentes dentro los propios inmunógenos que varían en función del tipo de poli I:C (alto o bajo peso molecular) o LPS utilizados (Kentner et al., 2019; Mueller et al., 2019; Parusel et al., 2017).

3.3.1.2. Lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV)

Este modelo es uno de los más invasivos, ya que se lesiona el hipocampo ventral mediante la inyección de la excitotoxina ácido iboténico o la inactivación temporal mediante tetrodotoxina el día postnatal 7 (Lipska & Weinberger, 1993; Tseng et al., 2009). La importancia de este modelo se debe a que la lesión es capaz de generar un conjunto de síntomas similares a los que se dan en esquizofrenia como déficits en comportamientos sociales (Becker et al., 1999), en la memoria espacial y de trabajo (Chambers et al., 1996), hiperreactividad a estrés y anfetaminas (Lipska et al., 1993) o alteraciones en el filtrado sensorimotor (Mitazaki et al., 2020). Además, algunos de estos síntomas pueden ser revertidos mediante el uso de antipsicóticos (Lipska & Weinberger, 1994). Es importante destacar que estos déficits surgen a partir de la pubertad y que no ocurren cuando la lesión se produce en la etapa adulta (Becker et al., 1999; Chambers et al., 1996). Además, este modelo no solo es capaz de replicar los síntomas, sino que también se han observado alteraciones en el desarrollo y función de otros sistemas como los lóbulos frontales y temporales, el estriado ventral y el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Tseng et al., 2009).

3.3.1.3. Otros modelos de un impacto

Los modelos del desarrollo también se puede conseguir mediante la inducción de actividad anormal en los circuitos corticolímbicos a través de la administración de MK-801 o ácido kaínico en la misma ventana de tiempo (Howland et al., 2004; Wiseman Harris et al., 2003). Sin embargo, el hecho de que el método de alteración del neurodesarrollo sea una lesión tan directa disminuye notablemente su validez patogénica y mecánica.

Otro de los modelos que comparte la acción directa sobre las neuronas es el acetato de metilazometanol (MAM). Este agente antimitótico metila el ADN específicamente en los neuroblastos, evitando su proliferación, sin producir efectos teratogénicos en otros órganos o en la glía (Cattabeni & Di Luca, 1997). La utilización de este modelo permite replicar tanto alteraciones en el comportamiento (Flagstad et al., 2004; Le Pen et al., 2006) como neuroanatómicas (Moore et al., 2006).

Finalmente, también existen los modelos que utilizan los factores ambientales para, de manera indirecta, producir alteraciones en el neurodesarrollo. Un ejemplo de ello, serían los que utilizan estrés perinatal como manipulación neonatal, privación materna, aislamiento postdestete o diversos tipos de estrés (Buuse et al., 2005; Capellán et al., 2022; Lapis et al., 2003).

3.3.2. Modelos de doble impacto

El elevado número de factores de riesgo de enfermedades como la esquizofrenia y su compleja relación entre ellos hace poco probable la visión simplista de que un solo evento es el responsable de la patogénesis (Davis et al., 2016). Así, la hipótesis del neurodesarrollo pronto se ve complementada con la hipótesis de doble impacto. De esta manera, también han surgido modelos animales que tratan de adaptar esta visión

utilizando un impacto para producir alteraciones durante el neurodesarrollo y un segundo impacto ya durante la vida del individuo que sea capaz de desencadenar los síntomas. El uso de estos modelos permite incrementar aún más la validez patogénica y mecánica respecto a los de un solo impacto. En este sentido, los más extendidos son los que combinan la AIM para alterar el desarrollo y el estrés o los cannabinoides para desencadenar los síntomas, especialmente en etapas vulnerables como la adolescencia.

3.3.2.1. Activación inmune materna y estrés

En estos modelos, tras la activación inmune materna se utilizan diversos tipos de estrés en la descendencia para desencadenar los síntomas. La ventana de exposición suele ser entre DP27 y DP40 englobando así un periodo tan crítico como es el peripuberal. El tipo de estrés más utilizado es el protocolo de estrés impredecible peripuberal establecido por Giovanoli (Giovanoli et al., 2013). Este protocolo incluye 5 estresores diferentes como shock eléctrico en las patas, inmovilización, natación forzada, privación de agua y cambios de caja repetidos. Estos modelos han sido capaces de mostrar las alteraciones potenciadas o solo reveladas en presencias de los dos impactos que se relatan a continuación.

A nivel estructural, la combinación de los dos impactos ha demostrado un aumento del volumen y función del estriado (Capellán et al., 2023). También se han observado, en corteza y estriado, un incremento de los niveles de expresión y de proteína del receptor D2 y una reducción en los de la descarboxilasa del ácido glutámico de 67 kDa (GAD67) (Deslauriers et al., 2013). En hipocampo, se han hallado notables aumentos tanto de marcadores de microglía activada (CD68 y CD11b) como de citoquinas inflamatorias (IL-1 β y TNF α) aunque solo en la etapa peripuberal, no en la adulta. Esto parece estar mediado por alteraciones en receptores (CD200 y CD200R) que se encargan de mantener a la microglía en un estado quiescente. Es importante destacar que este estado inflamatorio no fue reflejado en plasma (Giovanoli et al., 2013).

En la conducta, la combinación de ambos impactos ha sido capaz de producir defectos en la PPI o la hipersensibilidad locomotora inducida por anfetaminas que no se producían con ninguno de los dos impactos por separado (Deslauriers et al., 2013, 2014; Giovanoli et al., 2016). La escasez de estudios con hembras no permite esclarecer las posibles diferencias entre sexos.

La ventana de tiempo de aplicación del estrés parece tener un gran peso sobre los efectos sinérgicos de estos modelos. Estudios que han realizado los protocolos de estrés antes del DP30 no han hallado este tipo de efectos (Desbonnet et al., 2022; Yee et al., 2011).

3.3.2.2. Activación inmune materna y cannabinoides

Parece claro que, además de las infecciones y activación del sistema inmune materno, el consumo de cannabinoides es otro de los factores más importantes en el desarrollo de la esquizofrenia. De manera similar a los modelos anteriores, en los últimos años se han ido perfeccionando los modelos que combinan estos dos impactos. Estos modelos utilizan una exposición a cannabinoides sintéticos (generalmente HU210), THC o CBD en un periodo peripuberal de la descendencia similar al de los modelos de estrés (DP28-DP45).

El primero de ellos fue establecido por Victoria S. Dalton utilizando ratas Wistar a las que durante la gestación se les administró poli I:C y, a su descendencia, un cannabinoide sintético (HU210) durante la adolescencia (Dalton et al., 2012). En este caso, pudieron observar como la combinación de los dos impactos, pero no el cannabinoide por sí solo, aumentaba la cantidad de receptores 5-HT_{1A} en la región CA1 del hipocampo. Otro estudio utilizando estos dos compuestos encontró cambios en la expresión de microARN (miARN) no codificantes que tienen una importante función reguladora de la expresión génica. Concretamente en la corteza entorrinal del hemisferio izquierdo, algunos de los cuales, enmarcados en regiones análogas a locus humanos en esquizofrenia, como es el 6q32 (Hollins et al., 2014, 2016).

Sin embargo, los estudios con cannabinoides sintéticos tienen menos validez ecológica debido a la elevadísima potencia y duración de estos compuestos, pocas veces comparable a los naturalmente presentes en la planta (Devane et al., 1992). Por ello, se han realizado también estudios con cannabidiol (CBD), uno de los principales cannabinoides de la planta. Sin embargo, este cannabinoide no parece potenciar los efectos de la AIM, sino que existen evidencias de que podría revertirlos. Estudios de autorradiografía han demostrado que el CBD evitó los déficits en la unión (*binding*) a receptores muscarínicos, NMDA y CB₁R en corteza prefrontal y la disminución de los niveles de proteína de GAD67 y acetiltransferasa de colina en hipocampo (Jimenez Naranjo et al., 2019; Osborne, Solowij, Babic, Lum, Huang, et al., 2019; Osborne, Solowij, Babic, Lum, Newell, et al., 2019). Respecto al comportamiento, se ha visto que el CBD produce una atenuación en los déficits cognitivos y sociales como memoria y sociabilidad en machos y hembras (Osborne et al., 2017; Osborne, Solowij, Babic, Lum, Huang, et al., 2019). La administración de CBD lejos del periodo peripuberal (iniciada en DP56), cuando las alteraciones ya deberían estar presentes, junto con estudios que sugieren efectos antipsicóticos de este cannabinoide (Hahn, 2018; Mandolini et al., 2018), parecen inclinar la balanza hacia un efecto terapéutico y no protector del mismo. Es importante destacar que, en hembras, el CBD afectó negativamente a los animales que no fueron expuestos a AIM en las pruebas de interacción social y la densidad de unión a receptores CB₁R y NMDA en la corteza prefrontal.

El THC es el principal cannabinoide de la *Cannabis sativa* y responsable además de la mayoría de sus efectos psicoactivos. Es por esto que hay un creciente interés en su uso para modelar el segundo impacto en este tipo de modelos. En línea con los resultados de CBD, se ha visto que una exposición a THC durante la adolescencia es capaz de atenuar alteraciones en la actividad dopaminérgica del área tegmental

ventral inducidas por la AIM (Lecca et al., 2019). Sin embargo, en otros estudios, a pesar de apreciar alteraciones en el comportamiento debidas a los impactos por separado, no se observaron efectos sinérgicos positivos o negativos (Stollenwerk & Hillard, 2021) o las diferencias apreciadas fueron sutiles (Guma et al., 2023). Esto podría deberse a las dosis más bajas utilizadas en estos últimos estudios.

Debido al reducido número de este tipo de estudios, no existen datos concluyentes sobre las diferencias que presentan los sexos a los dos impactos. En primer lugar, porque la mayoría utilizan únicamente machos y, en segundo lugar, porque las diferencias encontradas en alguno de los estudios surgen del dimorfismo sexual inherente a la AIM ya comentado.

Por los resultados contrapuestos que estos estudios están demostrando es necesario continuar investigando en este sentido para, en primer lugar, establecer un modelo de estos dos impactos reproducible y, en segundo lugar, tratar de profundizar en los mecanismos que subyacen al aumento de riesgo de padecer esquizofrenia que estos dos factores causan. Esta es la premisa que ha motivado y orientado la presente tesis doctoral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos han demostrado que existe una relación dosis-dependiente entre el consumo de cannabis y un mayor riesgo de desarrollar esquizofrenia en humanos (Manrique-García et al., 2012). Las infecciones durante la gestación también están aceptadas como un factor de riesgo en esta enfermedad (Brown & Derkits, 2010). El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar los posibles efectos combinados de la activación inmune materna que ocurre durante las infecciones y la exposición al THC durante la adolescencia, que aumentaría tanto el riesgo como la gravedad de los síntomas de la esquizofrenia. Además, suponemos que la gravedad de estos efectos será dependiente de la dosis de THC.

Considerando el objetivo general citado anteriormente, el propósito esencial de esta tesis doctoral fue estudiar, en ratas de ambos sexos, alteraciones en la conducta, actividad cerebral o expresión génica surgidas de la combinación de una activación inmune prenatal y una exposición a diferentes dosis de THC durante la adolescencia.

Hipótesis 1. Dado que los receptores CB1 se encuentran alterados en diferentes regiones cerebrales en animales que han sido expuestos a AIM (Verdurand et al., 2014) y en humanos con esquizofrenia (Dalton et al., 2011; Wong et al., 2010), hipotetizamos que una dosis baja de THC en combinación con la AIM será capaz de producir alteraciones sutiles en conductas relacionadas con los diferentes tipos de síntomas de la esquizofrenia. Además, debido a que existen evidencias de que las alteraciones causadas por las infecciones durante la gestación están mediadas por el sistema inmune materno (Estes & McAllister, 2016), suponemos que algunos parámetros del sistema inmune de las madres podrían estar relacionados con las alteraciones de la descendencia.

Objetivo 1. Explorar posibles efectos derivados de la combinación de una activación inmune materna y una exposición a una dosis baja de THC durante la adolescencia.

Objetivo 1.1. Evaluar la potencia de los impactos mediante cambios de temperatura y/o peso en las madres y la descendencia.

Objetivo 1.2. Encontrar alteraciones conductuales similares a los síntomas cognitivos, negativos y positivos de la esquizofrenia debidas a la combinación de AIM y la exposición a una dosis baja de THC durante la adolescencia.

Objetivo 1.3. Explorar posibles marcadores tempranos en la madre que puedan predecir la gravedad o algunos de los síntomas de la descendencia.

Hipótesis 2. Debido a la relación dosis-dependiente entre el consumo de cannabis y el riesgo de desarrollar esquizofrenia (Manrique-García et al., 2012), es razonable pensar que la exposición a una administración de THC similar a un consumo abusivo durante la adolescencia provocará mayores cambios en la conducta que la dosis baja. Dado que la corteza orbitofrontal tiene un papel fundamental en la codificación de asociaciones sensoriales, incluso en las que carecen de valor reforzador (Hart et al., 2020; Sadacca et al., 2018), es posible que cambios transcriptómicos en esta región

podrían ayudar en la comprensión de hipotéticas alteraciones producidas por los dos impactos.

Objetivo 2. Explorar posibles efectos surgidos de la combinación de una activación inmune materna y una administración similar a un consumo abusivo de THC durante la adolescencia.

Objetivo 2.1. Evaluar la potencia de los impactos mediante cambios de temperatura y/o peso en las madres y la descendencia.

Objetivo 2.2. Encontrar alteraciones conductuales similares a los síntomas cognitivos, negativos y positivos que ocurren en esquizofrenia.

Objetivo 2.3. Encontrar cambios en la actividad de diferentes regiones cerebrales debidas a la combinación de los dos impactos.

Objetivo 2.4. Analizar cambios en la expresión génica en corteza orbitofrontal causadas por la combinación de ambos impactos.

Objetivo 2.5. Explorar posibles marcadores tempranos en la madre que puedan predecir la gravedad de algunos de los síntomas en la descendencia.

Para contrastar estas hipótesis, llevamos a cabo 2 experimentos:

Experimento 1. Expusimos a ratas Sprague-Dawley a una activación inmune materna durante la gestación y a una administración pasiva durante la adolescencia de una dosis baja de THC (3 mg/Kg). Se midió la temperatura corporal tras las inyecciones de LPS y se registró el peso corporal durante la gestación y la exposición a THC. En la etapa adulta (PD70), la conducta de estas ratas fue analizada en pruebas de memoria de trabajo y filtrado preatencional (dominio cognitivo), interacción social y preferencia por sacarosa (dominio negativo) y asociaciones incidentales (dominio positivo). Finalmente, los datos obtenidos en las pruebas de conducta fueron correlacionados con datos referentes a la respuesta inmune y a la conducta espontánea previa a la gestación.

Experimento 2. Expusimos a ratas Sprague-Dawley a una activación inmune materna durante la gestación y a una administración de THC en dosis crecientes (2,5; 5; 10mg/Kg) similares a un patrón de consumo abusivo durante la adolescencia. Se registraron los cambios de temperatura tras las inyecciones de LPS y el peso corporal durante la gestación y la exposición a THC. Estas ratas fueron divididas en 3 grupos. En el primero de ellos se analizó la conducta en pruebas de memoria de trabajo y filtrado preatencional (dominio cognitivo), interacción social y preferencia por sacarosa (dominio negativo) y asociaciones incidentales (dominio positivo). En el segundo grupo se midió la actividad cerebral mediante PET mientras que en el último se realizó una secuenciación masiva de la corteza orbitofrontal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y procedimiento experimental

Todos los experimentos de esta tesis doctoral fueron aprobados por el Comité Ético de la UNED y de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 177.4/20). Los animales siempre fueron mantenidos y tratados de acuerdo con las Reglas de Cuidado de Animales de Laboratorio de la Unión Europea (Directiva EU 2010/63/EU) y los “Principios de bienestar animal” fueron seguidos minuciosamente.

Todos los animales utilizados en esta tesis doctoral fueron ratas de la cepa Sprague-Dawley (SD) OFA y CD obtenidos en la casa comercial Charles-River. Los animales siempre fueron mantenidos a una temperatura ($23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50\%\pm 10$) constantes y en un ciclo de luz invertido de 12 horas (encendido de luces a las 20:00h). Si no se especifica lo contrario, los animales siempre tuvieron acceso “*ad libitum*” a la comida (dieta comercial para roedores Rod14; Sodispan Research; Madrid), agua del grifo y enriquecimiento ambiental. Los experimentos de conducta descritos en la presente tesis doctoral siempre fueron realizados durante el ciclo de actividad de los animales, entre las 9:00 y las 19:00h, con una iluminación de entre 20 y 50 luxes.

1.1. Tandas experimentales

El experimento 1 se realizó con ratas SD OFA y el experimento 2 con ratas SD CD (**Figura M1**). En primer lugar, se llevó a cabo el experimento 1 con una sola tanda experimental (tanda 1) y una dosis baja de THC (3 mg/Kg). En el experimento 2, se incrementó la dosis de THC simulando un patrón de consumo abusivo y se llevaron a cabo 3 tandas experimentales para distintos fines: obtención de muestras (tanda 2), pruebas de conducta e imagen (tandas 3 y 4). El número de animales por grupo de cada tanda puede consultarse en la **tabla M1**.

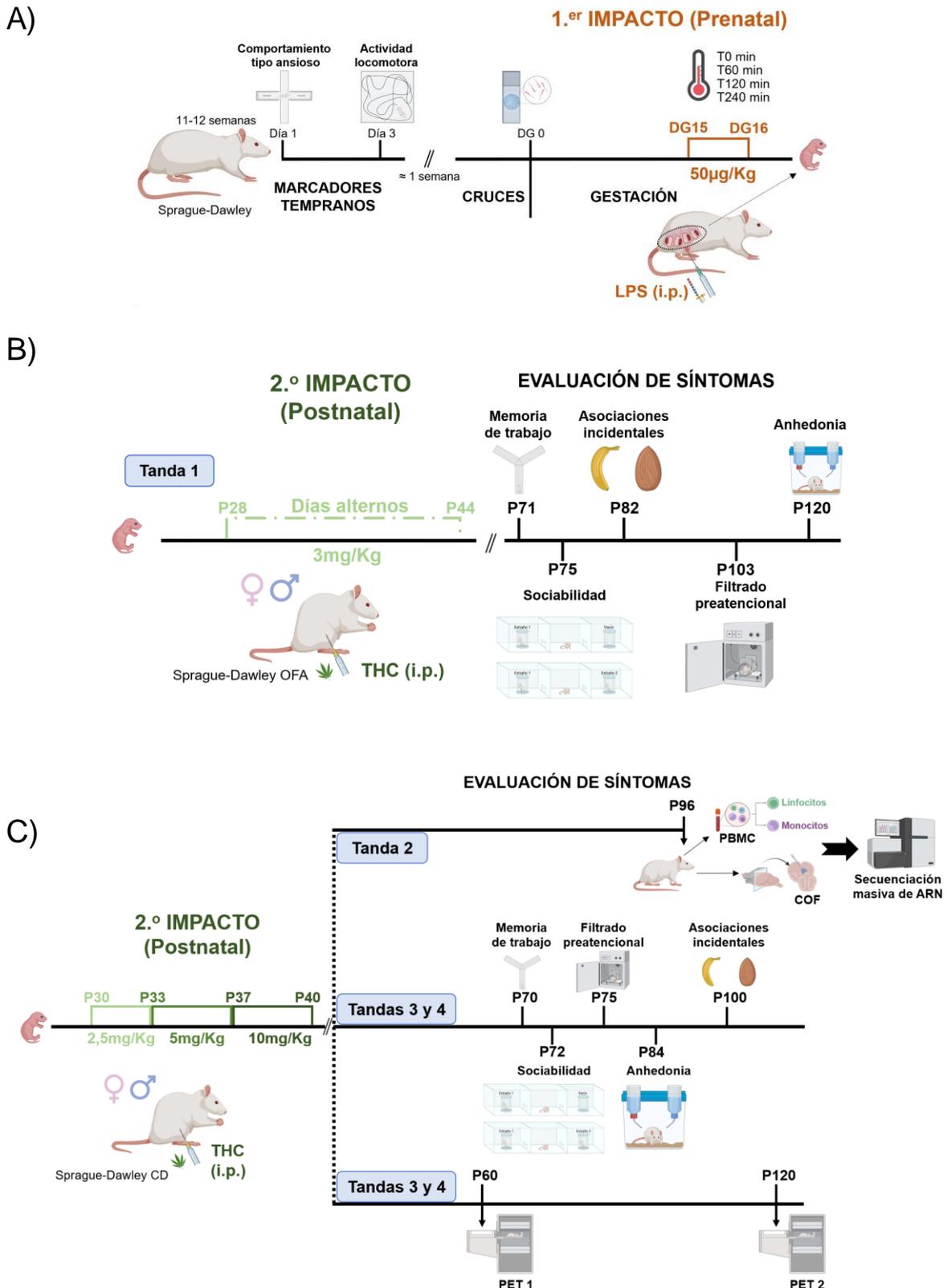


Figura M1. Representación gráfica de los experimentos realizados en cada tanda. A) En todas las tandas se realizaron pruebas de conducta (laberinto en cruz elevado y campo abierto) a ratas Sprague-Dawley de manera previa a los cruces. El día de gestación 0 fue establecido mediante la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal y la administración de LPS (50µg/Kg) o suero salino (0,9% NaCl) se llevó a cabo en DG15 y 16. La temperatura rectal durante la administración fue monitorizada en distintos tiempos (0, 60, 120 y 240 minutos). B) En la tanda 1, la descendencia de ratas Sprague-Dawley OFA fue expuesta a una administración, en días alternos, de THC (3mg/Kg) entre los días postnatales

28 y 44. Aproximadamente el día postnatal 71 se realizaron las pruebas de conducta en el siguiente orden: laberinto en Y, laberinto de 3 salas, test de asociaciones incidentales, y prueba de preferencia por sacarosa. B) En las tandas 2,3 y 4, la descendencia de ratas Sprague-Dawley CD fue expuesta a una administración de THC en dosis crecientes (2,5; 5 y 10 mg/Kg) entre los días postnatales (P) 30-32, 33-36, 37-40 respectivamente. De la tanda 2, se diseccionó la corteza orbitofrontal (COF) y se extrajeron los linfocitos y los monocitos a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre troncal. A continuación, se realizó una secuenciación masiva de ARN de ambas muestras. Las tandas 3 y 4 fueron divididas en dos grupos contrabalanceados. En uno de ellos se realizaron todas las pruebas de conducta en el siguiente orden: laberinto en Y, laberinto de 3 salas, prueba de inhibición por prepulso de la respuesta a sobresalto, prueba de preferencia por sacarosa y test de asociaciones incidentales. El otro grupo fue sometido a dos tomografías por emisión de positrones en los días postnatales 60 y 120.

		Tanda 1		Tanda 2		Tanda 3		Tanda 4	
Pre	Post	M	H	M	H	M	H	M	H
sal	veh	15	18	13	13	6	9	18	19
LPS	veh	13	13	10	5	11	10	12	13
sal	THC	14	18	12	12	6	8	16	14
LPS	THC	14	12	9	5	8	9	14	15
Total por sexo		56	61	44	35	31	36	60	61
Crías totales		117		66		67		121	
Madres salino		5		4		3		5	
Madres LPS		5		3		3		5	

Tabla M1. Número de crías y madres por grupo. Se recogen el número de animales (tanto madres como crías) que hubo en cada tanda distribuidas por sexo y grupos experimentales. Estos datos se refieren a los animales que completaron la exposición a THC. M: Machos; H: Hembras.

1.2. Cruces e impacto prenatal (LPS)

Los animales tuvieron un periodo de cuarentena al llegar al animalario y, una vez finalizada, unos 4 días de adaptación al ciclo de luz invertido. Los machos fueron individualizados aproximadamente 2 días antes de los cruces. Después, se colocaron las hembras en las cajas de los machos en una proporción 1:1. De manera diaria, se tomaron frotis vaginales para analizar la presencia de espermatozoides y establecer el día gestacional 0, momento en el cual la hembra fue separada del macho. Desde este momento y hasta el día del parto, los pesos fueron registrados diariamente para monitorizar el desarrollo de la gestación.

Durante los días DG15 y DG16 se llevó a cabo la administración de LPS. Para ello, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente, cada uno de los días, con una dosis de 50 µg/Kg de LPS 0111:B4 (Sigma-Aldrich) disuelto en suero salino estéril (0,9% solución NaCl; Braun) o con suero salino, en ambos casos a un volumen de 1mL/Kg. Los lotes de LPS utilizados fueron 114M4009V para la tanda 1 y 2 y 0000115517 para las tandas 3 y 4. Se registraron las temperaturas rectales en el momento inmediatamente anterior a las inyecciones y 60, 120 y 240 minutos después como marcador de AIM.

Todos los partos ocurrieron entre los días DG21 y DG23, tras los cuales las crías fueron marcadas mediante un tatuaje con tinta china en las patas traseras para identificar la exposición prenatal. Todas las camadas fueron redistribuidas entre

madres LPS y salino para asegurar que cada una criaba a un número similar de crías de cada grupo. Para la redistribución de crías no se permitió mezclar camadas que tuvieran más de 1 día de diferencia entre sus nacimientos. Además, se tuvo en cuenta que cada camada no tuviera más de 2 crías de diferencia entre machos y hembras y un máximo de 12 ± 2 crías.

Todas las crías fueron destetadas el DP22 agrupadas en función del sexo y la exposición prenatal. Posteriormente se asignaron a los grupos THC y vehículo tratando, en la medida de lo posible, que cada uno de los grupos tuviera crías de todas las madres.

1.3. Impacto postnatal (THC)

El Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC) se obtuvo de THCPharm (Frankfurt, Alemania). La resina se disolvía en etanol puro (30 mg/mL) y se almacenaba como solución madre a -30° . Las disoluciones de trabajo se preparaban a diario mezclando la disolución con aceite de ricino PEG-35 (Kolliphor; Merck) y suero salino en una proporción 1:1:18. Todas las disoluciones fueron preparadas en viales siliconados (Sigmacote; Sigma) con una atmósfera saturada de nitrógeno y protegidos de la luz. Las alícuotas del grupo vehículo se prepararon de igual manera, pero sin añadir THC a la disolución madre. En todos los casos, el etanol administrado conjuntamente con el THC estuvo por debajo de 0,1 g/Kg, dosis que no tiene efectos significativos en el comportamiento (Frye & Breese, 1981).

En la tanda 1 se administró de manera intraperitoneal una dosis de 3 mg/Kg a un volumen de 2 mL/Kg entre DP28 y DP44 de manera alterna. El peso corporal fue registrado desde el inicio de la administración hasta 5 días después de su finalización. Esta dosis se eligió tratando de replicar el uso intermitente del cannabis realizado por adolescentes humanos (Ellgren et al., 2007; Orihuel, Capellán, et al., 2021; Orihuel, Gómez-Rubio, et al., 2021).

En las tandas 2, 3 y 4 se utilizaron dosis crecientes de THC administradas por la misma vía (intraperitoneal) y al mismo volumen (2 mL/Kg). Entre DP30 y DP32 se administró una dosis de 2,5 mg/Kg; entre DP33 y DP36 la dosis se incrementó hasta 5 mg/Kg y, por último, entre DP37 y DP40 la dosis fue de 10 mg/Kg (Rubino et al., 2008). Estas dosis recrean un uso intensivo de la marihuana, así como el patrón creciente de consumo que se produce en adolescentes humanos (Zamberletti et al., 2014).

2. Obtención de muestras

2.1. Cerebro y PBMC

Los animales de la tanda 2 fueron sacrificados entre DP96 y DP98 mediante decapitación y bajo anestesia ligera con isoflurano. De aquí en adelante, todo el material que fuera a entrar en contacto con los cerebros o regiones fue tratado con RNaseZap™ para prevenir la degradación del ARN causada por ribonucleasas (ARNasas). Inmediatamente después, se extrajeron los cerebros que fueron congelados instantáneamente utilizando isopentano (VWR) refrigerado con hielo seco y almacenados a -80°C. Además, se obtuvo sangre troncal en tubos Vacutest® con EDTA K₂ (VWR) y plasma mediante su centrifugación a 1500 g, 10 min, RT.

Para la obtención de las PBMC, el plasma recogido fue sustituido por HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*). Posteriormente, la sangre resultante se diluyó 1:1 con HBSS y se obtuvieron las PBMC mediante el método de separación por densidad utilizando Histopaque® (Merck). Se contaron las células utilizando el contador Scepter™ 3.0 Automated Cell Counter (Merck) o de manera manual con una cámara de contaje Neubauer y Trypan blue. Una vez obtenidas, se dividieron en 3 tubos diferentes. Uno de ellos contenía 700 µL de QIAzol (Qiagen), el volumen equivalía a 1 millón de células y fue utilizado para la secuenciación masiva de ARN. El volumen restante se repartió en 2 tubos vacíos para Western blot y PCR. Todos los tubos fueron almacenados a -80°C. En las tandas 3 y 4, se obtuvo sangre de la cola de las madres tras la inyección de LPS o salino (después del destete) para analizar su respuesta inmune. Para ello, se extrajeron unos 500 µL de sangre de la cola, justo después de la última toma de temperatura, utilizando agujas de 23G y jeringas de 1 mL. La sangre fue procesada el mismo día de la extracción por el mismo método comentado anteriormente.

2.2. Extracción de ARN

Los cerebros fueron descongelados pero mantenidos en frío para su disección. Las rodajas se obtuvieron utilizando matrices acrílicas para ratas de entre 300 y 600g y cuchillas de afeitar. Utilizando el atlas de Paxinos & Watson, 2007 como referencia, se diseccionó en las rodajas correspondientes la corteza orbitofrontal (COF) que fue pesada y mantenida en hielo seco hasta su almacenamiento a -80°C.

Las muestras fueron homogenizadas utilizando un tampón de homogenización (50mM HEPES, pH 7,5, 320mM sacarosa, 20mM butirato de sodio, inhibidores de proteínas y fosfatasa en agua DEPC). La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando una extracción en columna con RNeasy Mini Kit (Qiagen) y RNase-Free DNase Set (Qiagen) para digerir el ADN en la propia columna. La concentración y el RIN (número de integridad de ARN, del inglés *RNA integrity number*) se obtuvieron utilizando el Agilent Bioanalyzer 2100 con los kits RNA 6000 nano (Agilent).

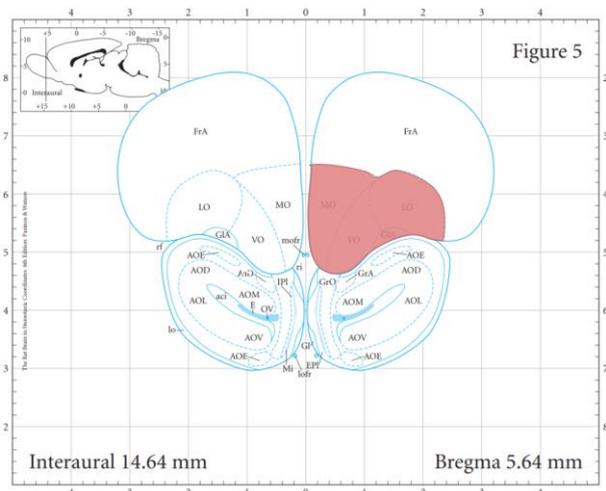
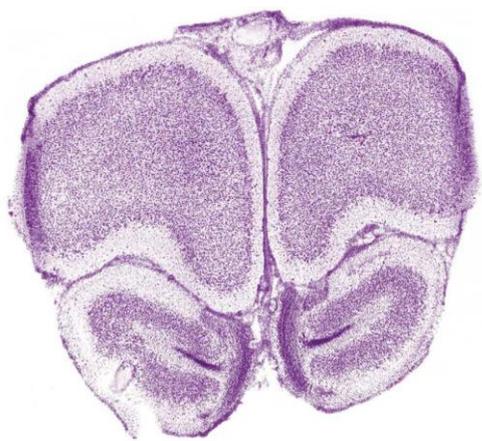


Figura M2. Región de corteza orbitofrontal diseccionada. Se muestran las áreas aproximadas que se diseccionaron junto a un corte representativo. Aci: comisura anterior intrabulbar; AOD: núcleo olfatorio anterior dorsal; AOE: núcleo olfatorio anterior externo; AOL: núcleo olfatorio anterior lateral; AOM: núcleo olfatorio anterior medial; AOV: núcleo olfatorio anterior ventral; E: epéndimo y subependimario; EPI: capa plexiforme externa del bulbo olfatorio; FrA: corteza frontal asociativa; Gl: capa glomerular del bulbo olfatorio; GIA: capa glomerular del bulbo olfatorio accesorio; GrA: capa de células granulares del bulbo olfatorio accesorio; GrO: capa de células granulares del bulbo olfatorio; IPI: capa plexiforme interna del bulbo olfatorio; **LO: corteza orbital lateral**; lo: tracto olfatorio lateral; lofr: arteria orbitofrontal lateral; Mi: capa de células mitrales del bulbo olfatorio; **MO: corteza orbital medial**; mofr: arteria orbitofrontal medial; OV: ventrículo olfatorio; rf: fisura rinal; ri: incisión rinal; **VO: corteza orbital ventral**. Imagen modificada del atlas de Paxinos & Watson, 2007.

3. Marcadores tempranos

Con el fin de encontrar marcadores tempranos que puedan ayudar a la predicción de alteraciones en la descendencia se realizó, de manera previa a la gestación, una aproximación a conductas relacionadas con ansiedad y reactividad en ambientes nuevos, lo que ha sido equiparado al constructo “búsqueda de nuevas sensaciones”. Además, se exploró a la reactividad inmune de las madres durante la gestación y también tras el destete.

3.1. Laberinto en cruz elevado

La conducta similar a ansiedad se evaluó aproximadamente una semana antes de los cruces, a una edad de aproximadamente 10-12 semanas. Para ello, en primer lugar, se utilizó el laberinto en cruz elevado (LCE). Esta prueba es una de las más utilizadas para analizar comportamientos de este tipo y se basa en la tendencia innata de los roedores a explorar su entorno, evitando lugares abiertos, luminosos y con altura (Campos et al., 2013; Handley & Mithani, 1984). Para ello, se utilizó un laberinto en forma de cruz hecho de metacrilato negro y PVC expandido (Forex®), elevado 50 cm del suelo que consistía en 2 brazos, con paredes altas, conocidos como cerrados (50x10x50cm) y dos brazos sin paredes denominados abiertos (50x10cm). El tiempo de la prueba fue de 5 minutos y se llevó a cabo tal y como se describe en Higuera-

Matas et al., 2009. Los datos se analizaron utilizando una fórmula similar al protocolo validado por Pellow et al., 1985:

$$\text{Índice LCE: } \frac{\text{Tiempo en brazos abiertos} - \text{Tiempo en brazos cerrados}}{\text{Tiempo en brazos abiertos} + \text{Tiempo en brazos cerrados}}$$

3.2. Actividad locomotora

En segundo lugar, dos días después del LCE, se analizó la “búsqueda de nuevas sensaciones” mediante la actividad locomotora en un entorno novedoso utilizando un laberinto de campo abierto (50x50x50cm) hecho de metacrilato (Himanshu et al., 2020). Las ratas fueron colocadas en el centro del laberinto y se les permitió explorar durante 40 minutos. Se utilizó la distancia total recorrida como medida de la actividad locomotora.

3.3. Prueba de reactividad inmune y citometría

En las tandas 3 y 4 se analizó la magnitud de respuesta a LPS de todas las madres, unas dos semanas después del destete. Para ello, el primer día se inyectó LPS (50 µg/Kg, i.p.) a la mitad de cada grupo y suero salino a la otra mitad. Tras un día de descanso, se repitió el procedimiento inyectando LPS o suero salino a las que no lo hubieran recibido. Como medidas de dicha respuesta se utilizaron la temperatura rectal (tomada justo antes de la inyección, tras 60min, 120min y 240min) y la distribución de las poblaciones de PBMC.

Las poblaciones de monocitos, linfocitos B y linfocitos T de las PBMC se analizaron mediante citometría de flujo. Para ello se incubó un volumen que contenía 1×10^6 células con los anticuerpos primarios (**Tabla M1**) diluidos en PBS y 10% de suero bovino fetal durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS las células fueron fijadas con FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences) y analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) (**Figura M2**).

Anticuerpo	Fluoróforo	Población	Concentración	Casa	Referencia
CD3	FITC	Linfocitos T	2,5 µL/mL	Becton Dickinson	557015
CD11b/c	PE	Monocitos	2,5 µL/mL	Becton Dickinson	554862
CD45RA	PECy5.5	Linfocitos B	2,5 µL/mL	Becton Dickinson	557015

Tabla M2. Anticuerpos de las PBMC. Se recogen las características principales de los anticuerpos utilizados para marcar las distintas poblaciones de las PBMC de las madres.

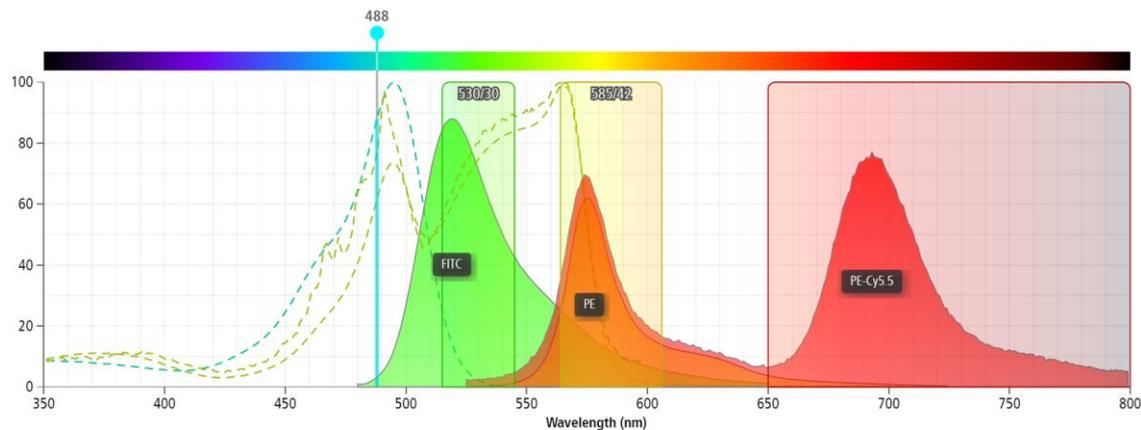


Figura M3. Espectros de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados en las PBMC. Representación gráfica de la longitud de onda del láser de excitación (488 nm), los filtros utilizados (530/30, 582/42 y 650), los espectros de excitación (líneas discontinuas) y de emisión (líneas sólidas) de los fluoróforos empleados en las poblaciones de las PBMC (*Realizado con BD Spectrum Viewer*).

4. Pruebas de comportamiento en la descendencia

Cuando los animales llegaron a la etapa adulta, se inició toda una batería de pruebas de conducta para evaluar comportamientos que pudieran ser similares a los producidos por los diferentes síntomas de la esquizofrenia. Para evaluar las potenciales alteraciones cognitivas, se evaluaron la memoria de trabajo y el filtrado preatencional. En el caso de los síntomas negativos, se analizaron interacciones sociales y la preferencia por sacarosa como medida de la potencial anhedonia. Finalmente, como aproximación a los síntomas positivos de la enfermedad, se adaptaron protocolos existentes para evaluar la formación de asociaciones incidentales.

4.1. Memoria de trabajo

El laberinto en Y ha sido utilizado tradicionalmente para evaluar la memoria de trabajo (Conrad et al., 1997; Lainiola et al., 2014; Prieur & Jadavji, 2019). En la presente tesis doctoral se utilizó la variante continua de la prueba del laberinto en Y que consiste en permitir la libre exploración de los animales para registrar la secuencia de entrada a los brazos. Esta prueba está basada en la tendencia de los roedores y otros animales a alternar la exploración de los brazos en ausencia de reforzadores y, por tanto, en la necesidad de recordar los brazos recientemente explorados (Hughes, 2004). Aproximadamente en DP71 se utilizó un laberinto en forma de “Y” hecho de metacrilato formado por un brazo largo (22x42,5x14cm) y dos cortos (22x38,5x14cm). Los animales se colocaron en el extremo del brazo largo mirando hacia el lado opuesto al centro del laberinto y se les permitió explorar el laberinto durante 10 minutos (Miedel et al., 2017). Tanto las entradas en cada brazo como la secuencia de entrada a los mismos fueron registradas. Como medida de la memoria de trabajo se utilizó el porcentaje de alternancia, que fue calculado dividiendo el número de triadas (3

entradas seguidas) en brazos distintos entre el máximo número posible de triadas (entradas totales menos 2).

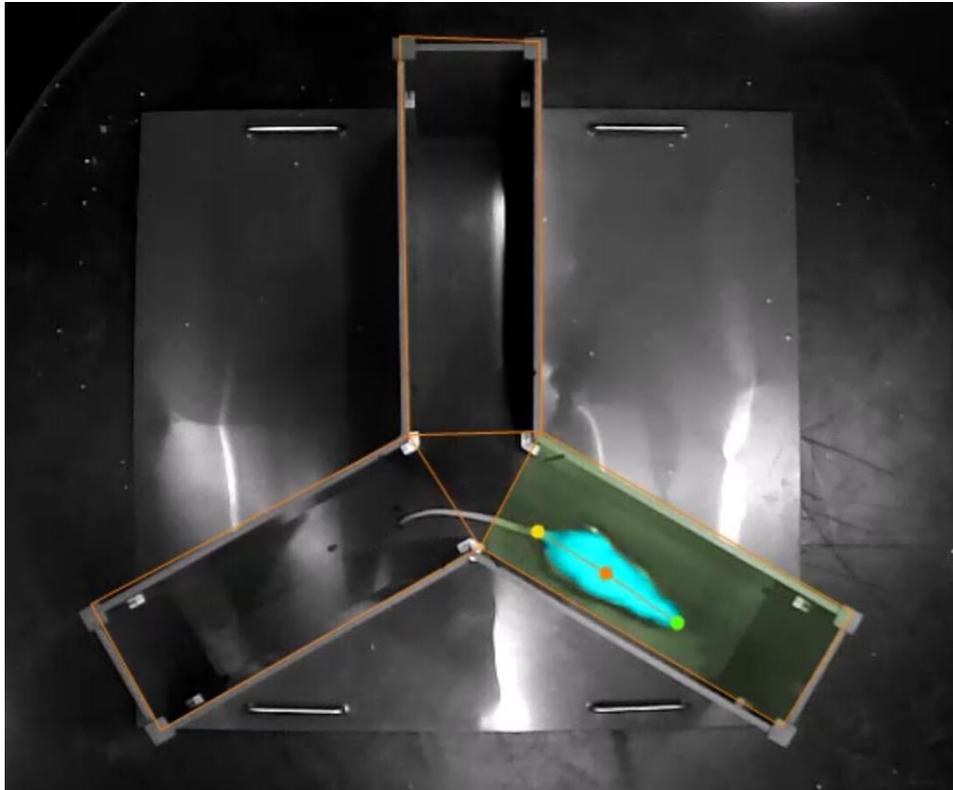


Figura M4. Laberinto en Y con el área de los brazos delimitados con el programa ANY-maze. Imagen que representa el laberinto en Y con los brazos y la zona central delimitados por líneas naranjas. La zona en la que se encuentra el animal se representa mediante una zona sombreada verde. El programa detecta el área del animal (sombreado azul), el inicio de la cola (punto amarillo), la parte final de la cabeza (punto verde) y el punto central (punto naranja).

4.2. Interacción social

En esta tesis doctoral se analizaron dos componentes de la interacción social: la sociabilidad y la preferencia por la novedad social. Para estas pruebas se utilizó un laberinto de 3 salas hecho de metacrilato negro (Yang et al., 2011). Este laberinto está compuesto de una sala central (39,5x79x29,5cm) conectado a dos salas laterales más grandes (39,5x79x39cm) mediante dos puertas guillotina. En primer lugar, se permitió la habituación de los animales a la sala central durante 3 minutos con las puertas guillotina cerradas.

Tras el periodo de adaptación, en el centro de cada sala lateral se colocan dos cilindros (30cm de altura y 13,5cm de diámetro) con barrotes para permitir la interacción. En la tanda 1, uno de los cilindros contenía una rata conespecífica del mismo sexo (Extraño 1) mientras que el otro se colocó vacío. Sin embargo, en el resto de tandas se colocó dentro del cepo vacío una rata de peluche. La fase 1 se llevó a

cabo inmediatamente después de la habituación, se abrieron las puertas guillotina y se permitió a la rata explorar la totalidad del laberinto durante 8 minutos.

Al acabar la fase 1, la rata fue recolocada en la cámara central y en el cepo vacío o con rata de peluche, se colocó una nueva rata conespecífica del mismo sexo (Extraño 2). Se abrieron de nuevo las puertas y se registró la conducta del animal durante otros 8 minutos.

En ambos casos se analizaron los tiempos de interacción, definidos como el tiempo en el que el animal tiene su cabeza dentro de un radio de 5 cm del cepo y está mirando hacia él. Se analizaron los índices de sociabilidad y de novedad social que fueron calculados de la siguiente manera:

$$\text{Sociabilidad: } \frac{\text{Interacción}_{\text{extraño1}} - \text{Interacción}_{\text{vacío}}}{\text{Tiempo total}} \quad \text{Novedad social: } \frac{\text{Interacción}_{\text{extraño2}} - \text{Interacción}_{\text{extraño1}}}{\text{Tiempo total}}$$

4.3. Test de formación de asociaciones incidentales

Para modelar síntomas positivos (como delirios o alucinaciones), se analizó la formación de asociaciones incidentales con el paradigma de preconditionamiento sensorial (H. J. Kim & Koh, 2016), adaptando el protocolo descrito por Busquets-García (Busquets-García et al., 2017). Para la realización de esta prueba, se utilizaron siempre tubos Falcon™ de 50mL como biberones que fueron pesados antes y después de las pruebas. Se utilizaron también tapones de goma adaptados con un tubo metálico para que los animales pudieran beber.

Durante todo este procedimiento, en la tanda 1 los animales tuvieron acceso restringido al agua (1h todas las tardes y, por la mañana, 1h si en esa fase experimental no había ingesta de líquido). En el caso de las tandas 3 y 4 los animales el acceso a agua fue de 1h por la mañana, con los olores y/o sabores disueltos o no en función de la fase experimental.

Para superar la fase de habituación se estableció como criterio que todos los animales bebieran al menos 3mL en una sesión o un mínimo de 3 días. Después, los animales fueron expuestos a 4 (tanda 1) o a 6 sesiones (tandas 3 y 4) de exposición al compuesto (Fase de preconditionamiento sensorial). Cada sesión estuvo formada por dos días, en cada uno de los cuales se realizaba una exposición de 15 minutos (tanda 1) o 1 hora (tandas 3 y 4), durante la mañana, a una de las dos posibles combinaciones olor-sabor: 0,01% olor almendra (benzaldehído; Sigma) con 5 mM sabor NaCl (VWR) y 0,05% olor plátano (isoamilo acetato; Sigma) con 0,316 mM HCl (PanReac Applichem). En la tanda 1, los olores se presentaron como tiras de papel de filtro impregnadas con la solución correspondiente y colocadas junto al biberón. Para las tandas 3 y 4 los olores fueron presentados en la propia bebida a modo de aromatizantes y se modificaron sus concentraciones: 0,05% de almendra (benzaldehído) y 0,017% de plátano (isoamilo acetato). Las concentraciones de olores y sabores se eligieron de manera que no hubiera preferencias (Busquets-García et al., 2017; Tordoff et al., 2008) y fueron ajustadas en consecuencia. El orden de presentación de ambas combinaciones fue contrabalanceado entre animales.

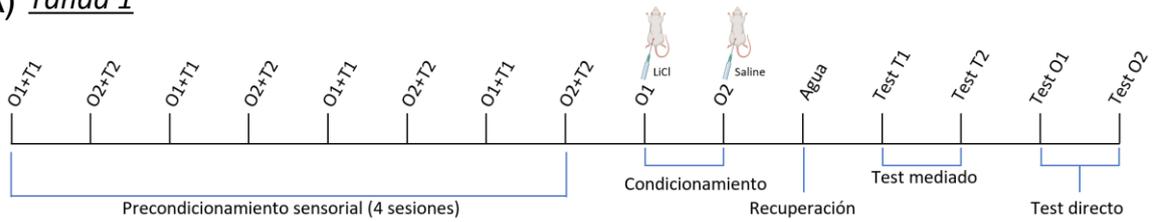
Tras la fase de acondicionamiento sensorial tuvo lugar la fase de condicionamiento. Por la mañana, todos los grupos experimentales fueron expuestos, durante 15 minutos (tanda 1) o 1 hora (tandas 3 y 4) a uno de los olores (el que tuvieron el primer día de acondicionamiento sensorial) y 5 minutos más tarde se les administró una inyección de LiCl (5 mL/Kg; i.p., 0,3 M en 0,9% de NaCl; Sigma) considerada aversiva (Gore-Langton et al., 2015). Al día siguiente, se repitió el procedimiento con el otro olor y utilizando una inyección de suero salino como control. En ambas exposiciones al olor, los animales tuvieron un biberón con agua disponible durante los 15 minutos. En la tanda 1 esta fase estuvo compuesta por una sesión (1 día de LiCl y 1 de suero salino) mientras que en las tandas 3 y 4 hubo 3 sesiones de condicionamiento. Después de esta fase, los animales tuvieron un día de recuperación con acceso a agua 1h por la mañana y, en el caso de la tanda 1, 1h por la tarde.

Después de la fase de recuperación se inició la fase de test que en todos los casos se compone en primer lugar del test mediado y posteriormente del directo. En la tanda 1, los animales fueron expuestos el primer día, durante 30 minutos, a biberones con la solución mCS+ (del inglés *mediated conditioned stimulus*: estímulo condicionado mediado): el sabor asociado al olor que fue condicionado de forma aversiva con LiCl. El segundo día se repitió la prueba con la solución mCS-: el sabor asociado al olor no condicionado con LiCl. En el caso de las tandas 3 y 4 solo se realizó un día de test en el que se presentaron los dos sabores mediante un test de preferencia (previa exposición a ambas opciones) de 1 hora. Los mL bebidos en ambos casos fueron registrados.

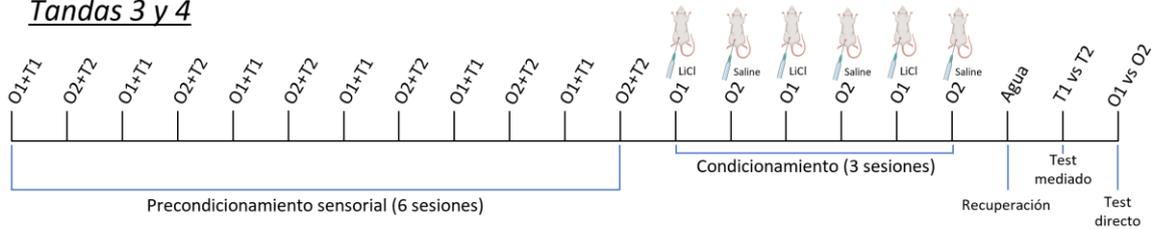
Con el test directo, se comprobó si se había producido un condicionamiento directo aversivo. En la tanda 1, se analizó el primer día el dCS+ (del inglés *direct conditioned stimulus*: estímulo condicionado directo): el olor que fue condicionado con LiCl. El segundo día, se analizó el dCS-: el olor que no fue condicionado con LiCl. En ambos casos, el test se realizó durante 30 minutos y se registraron los mL de agua ingerida de un biberón con una tira de papel de filtro, impregnada del olor correspondiente, colocada junto a él. Para las tandas 3 y 4, se realizó un test de preferencia (previa exposición a ambas opciones) entre los dos olores disueltos en agua. Se registraron los mL bebidos en cada biberón.

En la tanda 1, durante el tiempo que duró esta prueba, los animales estuvieron estabulados en grupos. Para prevenir la contaminación de los olores, los animales fueron llevados individualmente a dos habitaciones (una para cada olor) el tiempo mínimo necesario para realizar las exposiciones y los test. En las tandas 3 y 4, los animales estuvieron individualizados y en la misma sala durante toda la prueba. Ambos olores, pese a estar en biberones cerrados, se presentaron siempre en partes opuestas de la sala.

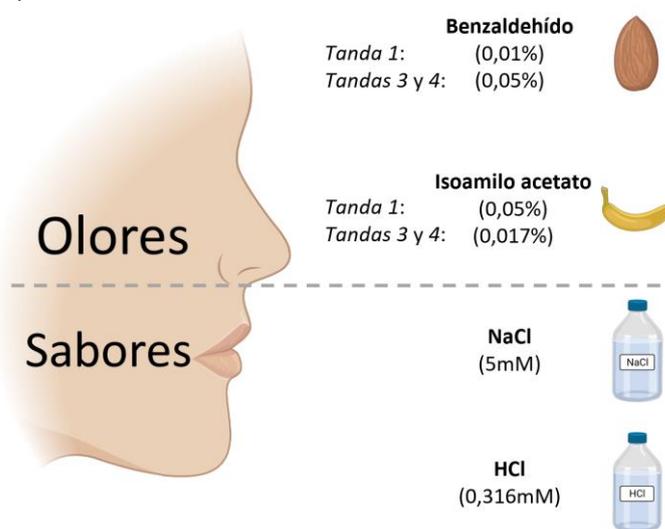
A) Tanda 1



Tandas 3 y 4



B)



C)

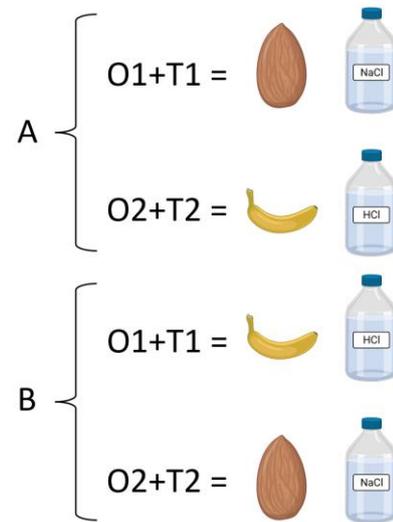


Figura M5. Diagrama del modelo de asociaciones incidentales. A) Cronograma temporal del protocolo. Cada línea vertical representa un día. Durante el precondicionamiento sensorial, los animales fueron expuestos a O1+T1 y O2+T2 para producir una asociación entre ambos estímulos. Una sesión está formada por dos días en cada uno de los cuales se presenta una de las dos parejas de estímulos. En la fase de condicionamiento, se realiza el condicionamiento aversivo de O1 inyectando LiCl justo después de la presentación, en el caso de O2 se utiliza suero salino como control. Tras un día de descanso se realizó un test de bebida para cada sabor (estímulo condicionado mediado) y olor (estímulo directamente condicionado). En la tanda 1 los test se realizaron en días diferentes para cada uno de los estímulos. En las tandas 3 y 4 se realizaron test de preferencia en dos días diferentes, uno para los sabores y otro para los olores. B) Reactivos y concentraciones utilizados para los olores y sabores. C) Contrabalanceo utilizado para evitar las preferencias de olores o sabores. La mitad de los animales tuvieron almendra y NaCl como O1 y T1 mientras que la otra mitad tuvieron HCl y plátano como O1 y T1.

4.4. Filtrado preatencional

La inhibición por prepulso de la respuesta a sobresalto se midió utilizando una caja de metacrilato (28x15x17cm) con una plataforma sensible a vibración en su interior (Cibertec), que era calibrada diariamente utilizando una pesa de 200g. La prueba tenía una duración aproximada de 26 minutos y se componía de una secuencia de ensayos

previamente validada (Capellán et al., 2022). Se utilizaron prepulsos de 4 o 12 decibelios (dB) por encima del ruido de fondo (65 dB) con intervalos de 30 o 120 milisegundos (ms) entre prepulso y pulso (120 dB). La inhibición por prepulso fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% PPI = \frac{\text{Media de la amplitud de sobresalto en ensayos de prepulso + pulso}}{\text{Media de la amplitud de sobresalto en ensayos con pulso}} \times 100$$

La habituación se calculó exponiendo a los animales a 6 ensayos con solo el pulso principal al inicio y al final de la sesión (no incluidos en los cálculos de la PPI). El porcentaje de habituación se calculó analizando la amplitud de los sobresaltos de la siguiente manera:

$$\% \text{ Habituación} = \frac{\text{Media del primer bloque de pulsos} - \text{media del último bloque de pulsos}}{\text{Media del primer bloque de pulsos}} \times 100$$

4.5. Anhedonia

Para el análisis de la potencial existencia de anhedonia se utilizó el test de preferencia por sacarosa utilizando un protocolo basado en la literatura (He et al., 2020). El acceso al agua de los animales fue restringido a 1 hora por la tarde en su jaula hogar y los experimentos tuvieron lugar por la mañana. Las ratas tuvieron 4 sesiones diarias de 1 hora en las que eran individualizadas en jaulas con acceso a dos biberones para ratón (uno a cada lado) con agua del grifo. Tras esta fase de habituación, se realizaron 4 nuevas sesiones sustituyendo el agua de uno de los dos biberones por sacarosa 1% (Sigma) preparada en el mismo día. La posición de las botellas fue contrabalanceada entre animales y días. Para medir la posible anhedonia se utilizó el porcentaje de preferencia por sacarosa:

$$\% \text{ preferencia} = \frac{\text{Volumen bebido sacarosa}}{\text{Volumen bebido sacarosa} + \text{agua}} \times 100$$

5. Tomografía por emisión de positrones

Aproximadamente en los días postnatales 60 y 120 se realizaron estudios de PET/CT (del inglés *positron emission tomography/computed tomography*; tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada) en colaboración con la Unidad de Aplicaciones Médicas de las Radiaciones Ionizantes del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT). Para ello se utilizó el equipo PET/CT SuperArgus de Sedecal (Madrid, España).

Los estudios se realizaron tras un ayuno de al menos 12h y una inyección intravenosa (bajo anestesia con isoflurano al 2-2,5% en oxígeno) de 500 μ Curios del radiofármaco ^{18}F -fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG) en un volumen de 500 μL . Tras 30 minutos despiertos para captar el radiofármaco, los animales eran anestesiados de

nuevo (2-2,5% de isoflurano en oxígeno) y colocadas en la camilla del equipo PET en decúbito ventral para la adquisición de imágenes.

La adquisición de imágenes se realizó durante 45 minutos con una ventana de detección de 350-700 KeV seguida de una adquisición CT de 30 KV/500 μ A.

Las imágenes generadas fueron sometidas a un preprocesamiento utilizando el software PMOD (PMOD Technologies GmbH). Durante este proceso las orientaciones anatómicas de cada animal fueron corregidas mediante rotaciones y traslaciones. A continuación, se utilizó el atlas Waxholm para corregir las imágenes mediante transformaciones elásticas y corregir las posibles diferencias de tamaño y posición de los animales obteniendo así una imagen modelo. La intensidad de las imágenes resultantes fue corregida utilizando el paquete SAMIT-SPM12 de MATLAB (MathWorks®) obteniendo valores estandarizados de captación (SUV, del inglés *standardized uptake value*) utilizando el peso de los animales (P), la dosis inyectada (DI) y la actividad radioactiva captada por el equipo (C_{img}) con la siguiente fórmula:

$$SUV(t) = \frac{C_{img}(t)}{DI/P}$$

Las imágenes se sometieron a un suavizado por campos Gaussianos de 3 veces el tamaño del voxel para eliminar posibles artefactos. Las imágenes también fueron alineadas manualmente a una resonancia de un animal de tamaño y edad similar del banco de imágenes de la Unidad de Aplicaciones Médicas. Finalmente, se segmentaron las regiones a estudiar sobre la resonancia para obtener los datos de captación para el estudio clásico por regiones de interés (RDI). Para el mapeado paramétrico estadístico (SPM, del inglés *statistical parametric mapping*) se eliminaron posibles variaciones inter-sujeto normalizando las imágenes utilizando el cerebro completo como referencia. Finalmente, se compararon agrupaciones de un mínimo de 50 vóxeles y se estableció el nivel de significación estadística en $p < 0,01$ para evitar falsos positivos.



Figura M6. Equipo de PET/CT SuperArgus.

6. Secuenciación masiva de ARN

La secuenciación masiva de ARN fue realizada por la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid. Las librerías se prepararon utilizando los kits NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module y NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep for Illumina® (New England Biolabs) partiendo de 91 ng de ARN total. Se siguieron las indicaciones de “Chapter 1: Protocol for use with NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module. Para obtener la amplificación de las librerías mencionadas en el protocolo se utilizó una PCR de 13 ciclos. Para las PBMC, las librerías y muestras fueron validadas y cuantificadas utilizando el equipo Agilent Bioanalyzer 2100 y los kits Agilent RNA 6000 y Agilent High Sensitivity. En el caso de corteza orbitofrontal, tanto las muestras como las librerías se validaron y cuantificaron con el equipo 4200 TapeStation System (Agilent) y los kits RNA Screen Tapes y D1000 Screen Tapes.

Tras la cuantificación de las librerías, se realizó una mezcla equimolecular que fue purificada con AMPure XP beads (Beckman Coulter) y cuantificada mediante qPCR usando como estándar una librería de referencia de la Unidad de Genómica y el kit KAPA SYBR® FAST qPCR para el equipo LightCycler® 480.

La mezcla equimolecular fue secuenciada en el equipo NovaSeq™ 6000 de Illumina® utilizando el kit NovaSeq™ Reagent 1.5 (100 cycles) en una carrera de single read 1x100.

Tras la secuenciación, se utilizó el programa TopHat incluido dentro de la suite G-PRO (Biotechvana) para mapear y localizar las diferentes secuencias frente al genoma de referencia (*Rattus norvegicus* Rn6.0.96) obteniendo un porcentaje de lecturas de mapeo correcto del 93 al 95%. Se encontraron fragmentos de 19.186 y 21.437 genes en la secuenciación de PBMC y COF respectivamente, y se aplicó como criterio de exclusión una media global de fragmentos inferior a 240 y 360. De esta manera quedaron un total de 11.855 y 13.942 genes considerados expresados en cada región. A continuación, se realizó un análisis de expresión diferencial con el programa CuffDiff, que analiza la expresión de ARN de cada gen, normalizada por su tamaño y por la expresión global de ARN de cada muestra, y realiza una comparación entre grupos aplicando la corrección del ratio de descubrimiento falso (FDR, del inglés *false discovery rate*) y obteniendo los valores *Fold Change* (FC, del inglés número de veces de cambio).

7. Análisis de datos

7.1. Análisis de los vídeos

La conducta de los animales fue analizada utilizando el software ANY-maze Video Tracking System v.6.32 (Stoelting Co.) o superior.

7.2. Índices y correlaciones

Como marcadores tempranos que pudieran predecir algunos de los déficits causados por alguno, o ambos impactos, se calculó un índice predictivo para las madres (IM) de la tanda 1 utilizando los datos normalizados del laberinto en cruz elevado, la actividad locomotora, la mayor variación de temperatura rectal tras la administración de LPS y el peso perdido tras la primera inyección de LPS. En las tandas 3 y 4 se añadió también el porcentaje de cambio de los linfocitos T tras una inyección de LPS en negativo. Este índice se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Tanda 1: } IM = -\text{Índice LCE} - \text{actividad locomotora} - \text{Temperatura} + \text{Peso}$$

$$\text{Tandas 3 y 4: } IM = -\text{Índice LCE} - \text{actividad locomotora} - \text{Temperatura} + \text{Peso} - \% \Delta \text{ Linfocitos T}$$

De igual modo, se calculó un índice para agrupar los resultados de todas las pruebas de comportamiento de las crías (IC). Para ello, se utilizaron la media de cada camada de los resultados cada prueba, previamente normalizados con Z. En las tandas 3 y 4 no se pudieron separar los índices en vehículo y THC por falta de n:

$$IC = -\text{Memoria} - \text{Sociabilidad} - \text{Novedad social} - \text{PPI} - \text{Preferencia sacarosa}$$

Una vez obtenidos ambos índices, se realizaron varios análisis de correlaciones entre ambos índices y sus componentes.

7.3. Normalización de los datos

Para minimizar la variabilidad entre las pruebas realizadas en las tandas 3 y 4, se llevó a cabo una normalización de los datos utilizando el método de puntuación Z. Para la transformación en Z se utilizó, en cada variable transformada, la media y la desviación estándar de todos los animales de la tanda correspondiente. Para una visualización más entendible de los datos, se volvieron a transformar antes de su representación gráfica. Para ello, cada dato en Z se multiplicó por la desviación estándar conjunta de los datos en bruto de las dos tandas y se le sumó la media de ambas.

Para que todos los componentes de los índices fueran comparables entre sí, fueron normalizados con Z. Se utilizó, para cada variable, la media y la desviación estándar de todos los animales de la tanda a la que pertenecían. En las crías, tras la normalización, se obtuvo la media de cada camada para ser comparada con el índice de su madre. Dado que en cada camada había machos y hembras, tanto THC como vehículo, cuando fue posible se realizó también la media de cada grupo dentro de cada camada para correlacionarla con su madre, con el fin de hallar presencia o

ausencia de correlaciones (p. ej.: correlaciones machos-THC con sus madres o Hembras-veh con sus madres).

Los fragmentos de la secuenciación masiva de ARN fueron normalizados utilizando el paquete DESeq2 de RStudio v.2022.12.0+353 (Posit Software, PBC) y R Statistical Software v.4.2.2 (R Core Team 2022). Este método tiene en cuenta el número total de fragmentos de cada muestra y permite las comparaciones entre las mismas. Finalmente, los fragmentos normalizados fueron transformados a valores Z utilizando la media y la desviación estándar de los fragmentos normalizados de cada uno de los genes. Con estos valores se generaron los mapas de calor que permiten la comparación, de cada gen por separado, entre las distintas muestras.

7.4. Estadística

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó IBM SPSS Statistics v.26.0. Todos los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM) si no se indica lo contrario. La identificación de los valores atípicos se realizó mediante el criterio del rango intercuartil de SPSS con un p -valor $< 0,05$. La distribución normal y la homocedasticidad de los datos se evaluó utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Saphiro-Wilk para la normalidad y la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. Se utilizaron raíces cuadradas, logaritmos neperianos o transformaciones inversas para corregir las distribuciones o la falta de homocedasticidad de los datos cuando fue necesario. El análisis de los experimentos se realizó, si no se dice lo contrario, mediante ANOVA de 3 vías independientes considerando “Sexo” (macho o hembra), “Activación inmune prenatal/LPS” (salino/LPS) y “Administración postnatal de THC” (vehículo o THC) como los factores inter-sujeto. Se utilizaron ANOVA de 3 vías mixto para analizar los pesos durante la exposición a THC y la captación de ^{18}F -FDG utilizando como factores intra-sujeto los días de exposición (“Días”) y los dos PET realizados (“Tiempo”) respectivamente. También fueron utilizados para analizar las preferencias basales en el laberinto de tres salas (objeto vs extraño1 y extraño1 vs extraño2), la preferencia por sacarosa (agua vs sacarosa) y las preferencias por mCS (+ vs -) o dCS (+ vs -). Se utilizaron los valores F corregidos por Greenhouse-Geisser y las interacciones significativas fueron analizadas por análisis de efectos simples. Los valores F, tamaño del efecto (eta parcial al cuadrado η^2_p) fueron indicados siempre que fue necesario.

RESULTADOS

Objetivo 1: EXPLORAR POSIBLES EFECTOS DERIVADOS DE LA COMBINACIÓN DE UNA ACTIVACION INMUNE MATERNA Y UNA EXPOSICIÓN A UNA DOSIS BAJA DE THC DURANTE LA ADOLESCENCIA

1.1. Evaluación de la potencia de los impactos

1.1.1. La administración de LPS induce hipotermia en ratas gestantes

Tras la administración de LPS en la gestación, se registraron las temperaturas de las madres para su uso en el futuro como posibles marcadores tempranos. El LPS provocó cambios en la temperatura rectal de las madres en los tiempos analizados tanto en DG15 y DG16 (**Figura R1.1A, C-D**). Con un análisis intra-sujeto se observó que el LPS causó una disminución de la temperatura a lo largo del tiempo en DG15 y DG16 (**Tabla R1.1**). Realizando un análisis de contraste simple en DG15 del grupo LPS, se encontraron diferencias significativas al comparar T_{0min} con T_{60min} ($p = 0,034$) y T_{120min} ($p = 0,019$). Repitiendo este análisis para el grupo LPS en DG16 se observaron las mismas diferencias al comparar T_{0min} con T_{60min} ($p = 0,016$) y T_{120min} ($p = 0,039$). Además, el análisis entre sujetos demostró diferencias significativas entre las medias de temperatura del grupo salino y LPS en ambos días. Sin embargo, esta misma hipotermia no se encontró en el grupo salino en ninguno de los dos días.

Efectos en la temperatura (ANOVA)		$F(glm, glR)$	Valor p	η^2_p
DG15	Tiempo*AIM	$F(2, 20) = 4,54$	0,019	0,362
	Tiempo*[AIM = LPS]	$F(2, 10) = 6,37$	0,014	0,614
	Tiempo*[AIM = sal]	$F(2, 6) = 1,41$	0,30	-
	AIM	$F(1, 8) = 7,06$	0,029	0,469
DG16	Tiempo*AIM	$F(2, 17) = 5,01$	0,018	0,389
	Tiempo*[AIM = LPS]	$F(2, 7) = 8,61$	0,016	0,683
	Tiempo*[AIM = sal]	$F(1, 5) = 0,683$	0,47	-
	AIM	$F(1, 8) = 10,84$	0,011	0,575

Tabla R1.1. Efectos del LPS en la temperatura corporal. En la tabla se expresan los estadísticos para los diferentes efectos causados por AIM en la temperatura. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes. En los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: AIM). Factores intra-sujeto: Tiempo (minutos). Factores inter-sujeto: AIM (sal/LPS).

Por otro lado, se analizaron los cambios en el peso corporal durante los tres días posteriores a la primera inyección (**Figura R1.1B**). Mediante un ANOVA de medidas repetidas se encontró un efecto principal del factor intra-sujeto Día ($F_{(3, 20)} = 59,34$, $p = 0,000$, $\eta^2_p = 0,881$). Sin embargo, la interacción entre el factor intra-sujeto Día y el factor inter-sujeto AIM no resultó significativa ($F_{(3, 20)} = 1,16$, $p = 0,343$).

En conjunto, estos resultados indican un efecto del LPS, debido a las importantes bajadas en las temperaturas, a pesar de la ausencia de diferencias en el peso de las madres.

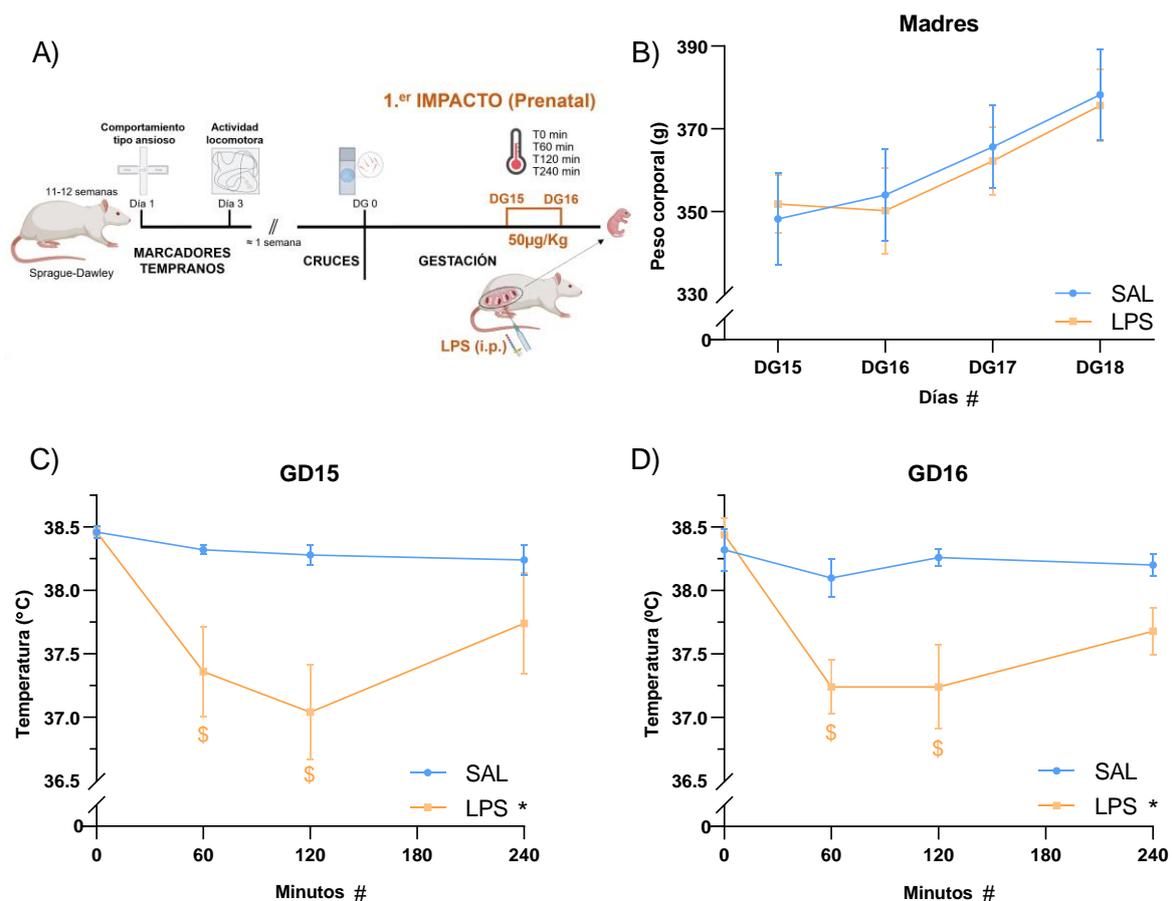


Figura R1.1. Inducción de AIM en la gestación con LPS. A) Diagrama temporal del análisis de marcadores tempranos y la inducción de AIM en la tanda 1. Como posibles marcadores tempranos, de manera previa a los cruces, se analizaron comportamientos de tipo ansioso, actividad locomotora y se registró tanto la temperatura como el peso tras las inyecciones de LPS. El día 0 de gestación se estableció mediante la presencia de espermatozoides en un frotis vaginal. B) Peso corporal de las madres durante los días de las inyecciones de LPS y el día después de finalizar la administración. C) Temperatura rectal 0, 60, 120 y 240 minutos después de la inyección de LPS en los días de gestación 15 y 16. Los resultados se representan como la media \pm EEM. $n = 5$ animales. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto; # $p < 0,05$ efectos generales intra-sujeto; \$ $p < 0,05$ diferencias respecto a T_0 .

1.1.2. El THC y la AIM disminuyen de manera independiente el incremento de peso de la descendencia

El análisis del peso corporal de la descendencia durante la exposición a THC reveló un aumento general del peso de los animales debido a su crecimiento normal (**Figura R1.2**). Además, el ANOVA de medidas repetidas demostró que existen diferencias en el incremento de peso en función del sexo tal y como demuestra la interacción DP*sexo. Analizando las interacciones simples, como era de esperar, tanto machos como hembras aumentan de peso, aunque de manera diferente como se observa mediante los análisis entre sujeto (**Tabla R1.2**). La interacción DP*AIM, así como los efectos simples demostraron que tanto los animales expuestos a LPS durante la gestación como los controles expuestos a salino aumentan de peso durante el crecimiento. Sin embargo, al realizar un análisis de efectos inter-sujeto se observó

que los LPS lo hacen en menor medida (**Figura R1.3A**). De igual modo, tanto los animales que recibieron THC como los que recibieron vehículo aumentaron su peso, debido al crecimiento, como se extrae de la interacción DP*Postnatal y de sus efectos simples. Sin embargo, resulta interesante señalar que el análisis inter-sujeto detectó que este incremento de peso fue menor en las ratas que fueron administradas con THC que en las que recibieron vehículo (**Figura R1.3B**).

Estos datos, en línea con los anteriores, apuntan hacia un efecto del LPS independiente del efecto del THC. No se observaron efectos sinérgicos en la combinación de LPS y THC.

Efectos (ANOVA)	$F(\text{glm, glr})$	Valor p	η^2_p
DP	$F(2, 228) = 4663,61$	0,000	0,979
DP*Sexo	$F(2, 228) = 68,64$	0,000	0,409
DP*[Sexo = M]	$F(2, 89) = 1701,59$	0,000	0,969
DP*[Sexo = H]	$F(2, 89) = 1980,63$	0,000	0,975
Sexo (<i>InterS</i>)	$F(1, 99) = 13,68$	0,000	0,121
DP*AIM	$F(2, 228) = 4,23$	0,012	0,041
DP*[AIM = sal]	$F(2, 105) = 1346,41$	0,000	0,955
DP*[AIM = LPS]	$F(1, 58) = 1202,72$	0,000	0,967
AIM (<i>InterS</i>)	$F(1, 99) = 5,67$	0,019	0,054
DP*Postnatal	$F(2, 228) = 51,98$	0,000	0,344
DP*[Postnatal = veh]	$F(2, 93) = 1696,15$	0,000	0,969
DP*[Postnatal = THC]	$F(2, 82) = 1532,97$	0,000	0,968
Postnatal (<i>InterS</i>)	$F(1, 99) = 32,11$	0,000	0,245

Tabla R1.2. Efectos del THC y LPS en el peso durante la administración de THC. Se muestran los efectos principales y las interacciones representadas con “*”. Los análisis de los efectos simples muestran entre corchetes el grupo analizado. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en cursiva seguido de “(InterS)”. Factores intra-sujeto: DP (día). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). DP = Día postnatal. M = Machos. H = Hembras.

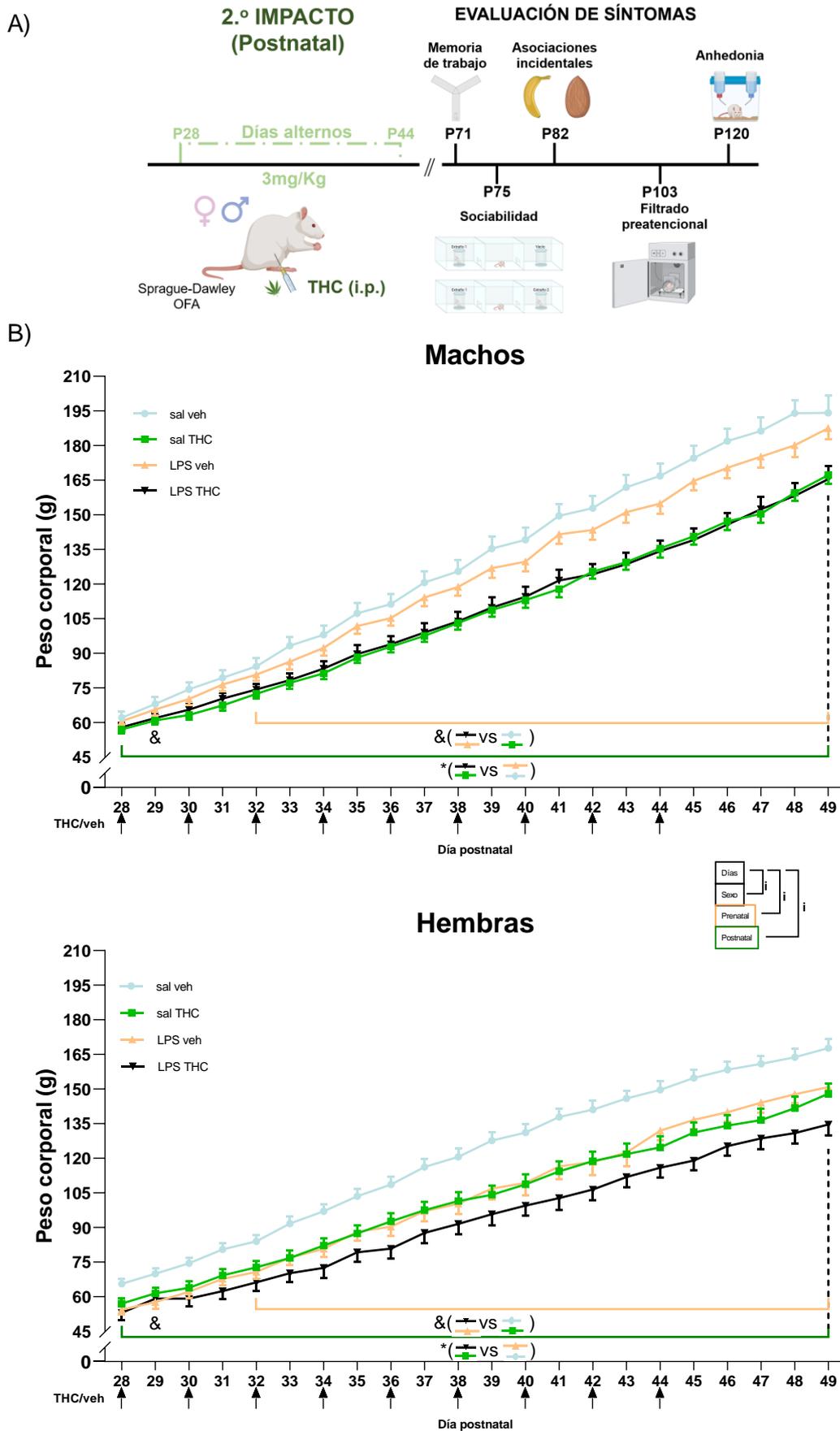


Figura R1.2. Administración de THC a la descendencia. A) Diagrama temporal de la administración de THC y las pruebas de conducta realizadas a las crías. Se administró THC (3 mg/Kg) o vehículo i.p.

en días alternos desde el día postnatal 28 al 44. Se registró el peso desde el inicio hasta 5 días después de la administración. Las pruebas de comportamiento se realizaron a partir de DP70 en el siguiente orden: laberinto en Y, laberinto de 3 salas, prueba de asociaciones incidentales, test de inhibición por prepulso y test de preferencia por sacarosa. B) Cambios en el peso corporal durante la administración de machos y hembras representados como la media \pm EEM. $n = 15$ (M sal veh), 13 (M LPS veh), 14 (M sal THC), 14 (M LPS THC), 18 (H sal veh), 13 (H LPS veh), 18 (H sal THC), 12 (H LPS THC). Cada flecha negra corresponde a una inyección de THC o vehículo. Los efectos intradía en los grupos LPS/sal se representan con "&" ($p < 0,05$) y en los grupos THC/veh con "*" ($p < 0,05$).

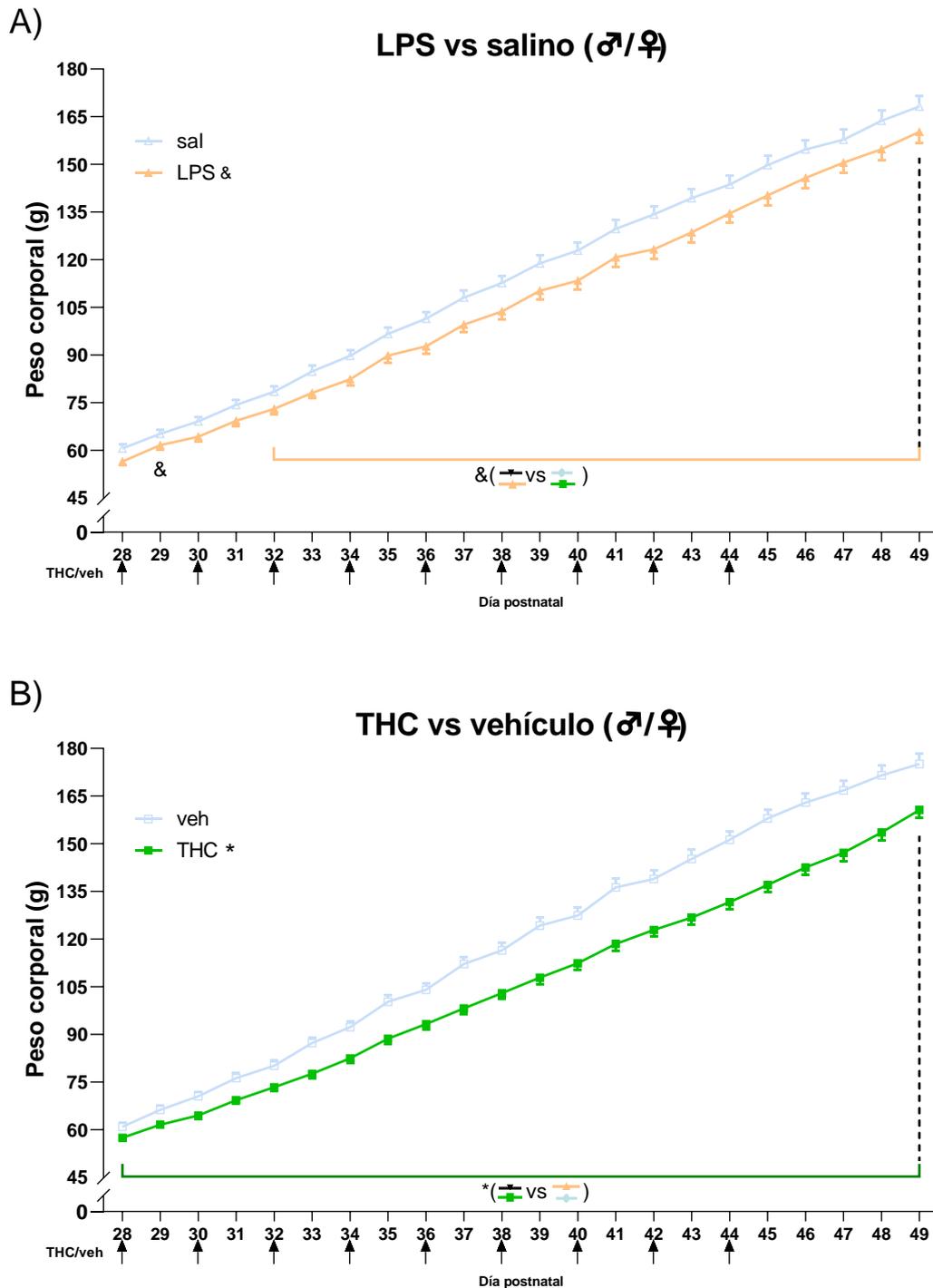


Figura R1.3. Efectos independientes del THC y LPS en los pesos de la descendencia. A) Efecto de la exposición a LPS en la descendencia de manera independiente al sexo o a la administración de

THC. La línea azul es la combinación de todos los animales que no han sido expuestos a LPS y la naranja todos los que sí han sido expuestos. B) Efecto de la administración de THC en la descendencia de manera independiente al sexo o a la exposición a LPS. La línea azul representa todos los animales que no fueron recibidos THC y la línea verde todos los que sí fueron expuestos a THC. Los resultados se representan como la media \pm EEM. Se representan los efectos inter-sujeto con “&” $p < 0,05$ (LPS vs sal) y con “*” $p < 0,05$ (THC vs veh).

1.2. Búsqueda de alteraciones similares a síntomas cognitivos, negativos y positivos de la esquizofrenia causadas por la combinación de AIM y la exposición a una dosis baja de THC durante la adolescencia

1.2.1. La exposición prenatal a LPS disminuyó la memoria de trabajo en machos

El análisis de la memoria de trabajo de la descendencia, medida mediante la alternancia espontánea en el laberinto en Y, mostró diferencias significativas entre sexos y, dentro de los mismos, variaciones en función del impacto prenatal (Sexo*AIM) (Tabla R1.3). El análisis de efectos simples demostró una peor puntuación, en la prueba de memoria de trabajo, en los machos que habían sido expuestos a LPS de manera prenatal (Figura R1.4A). Sin embargo, no se encontraron efectos significativos causados por el THC o interacciones del mismo con la exposición a LPS prenatal.

Efecto (ANOVA)	F(glm, glr)	Valor p	η^2_p
Sexo	$F(1, 105) = 5,38$	0,022	0,049
AIM	$F(1, 105) = 3,49$	0,064	-
Postnatal	$F(1, 105) = 1,98$	0,162	-
Sexo*AIM	$F(1, 105) = 6,68$	0,011	0,06
[Sexo = H]*AIM	$F(1, 109) = 0,27$	0,608	-
[Sexo = M]*AIM	$F(1, 109) = 9,32$	0,003	0,079
AIM*Postnatal	$F(1, 105) = 0,44$	0,509	-

Tabla R1.3. Estadísticos del laberinto en Y. Se muestran los estadísticos de la prueba del laberinto en Y tras un ANOVA de tres vías. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). M = Machos. H = Hembras.

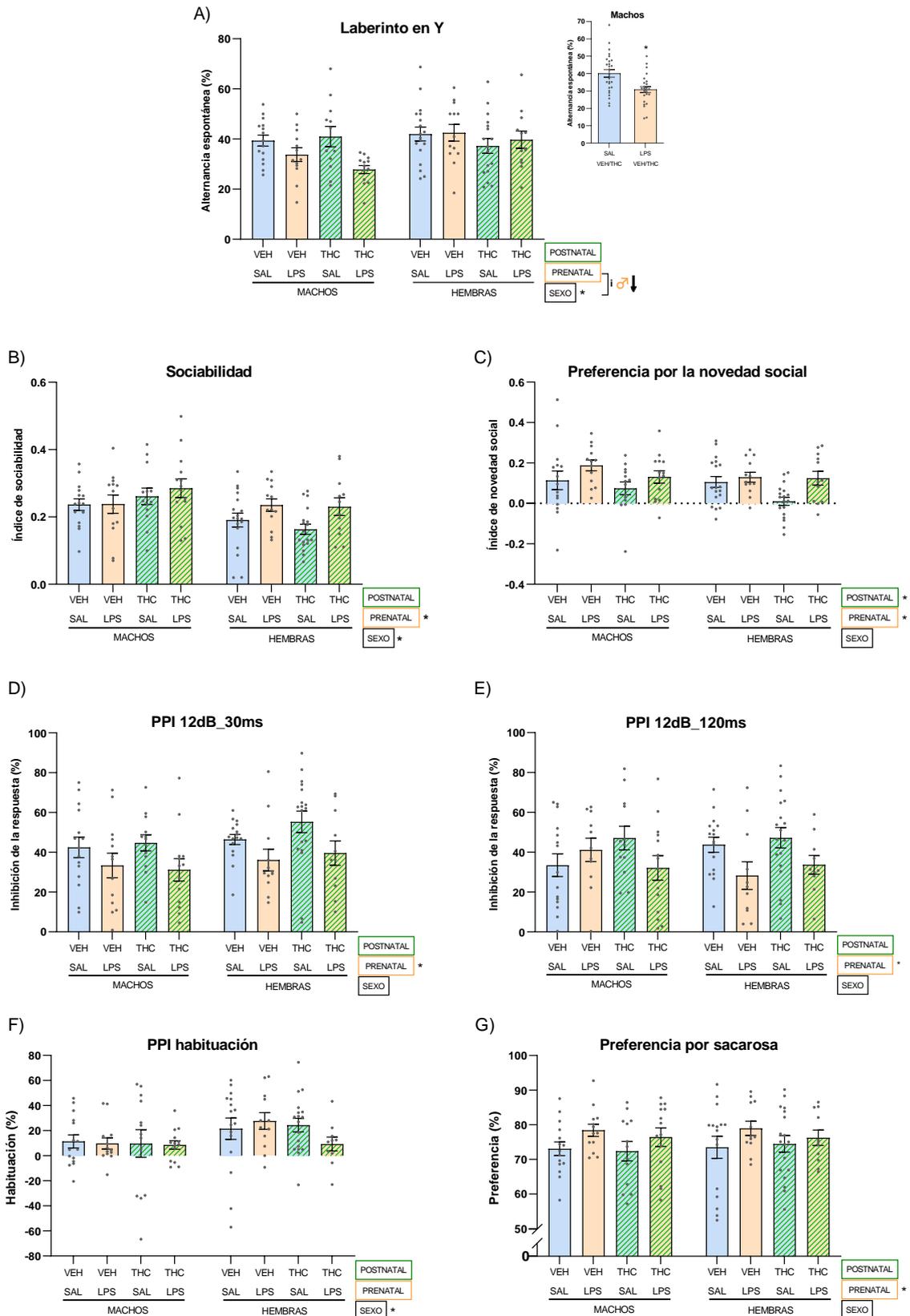


Figura R1.4. Pruebas de comportamiento tras AIM y una dosis baja de THC. A) Puntuaciones en la prueba de laberinto en Y expresadas como porcentaje de tríadas válidas respecto a tríadas posibles. Se entiende como tríada válida la entrada en 3 brazos sin repetir ninguno de ellos. El número de tríadas posibles se ha calculado como el total de entradas menos dos. B) Índice de sociabilidad calculado como el tiempo de interacción con el extraño 1 menos el tiempo de interacción con el objeto dividido entre la

suma de ambos. C) Índice de preferencia por la novedad social calculado como el tiempo de interacción con el extraño 2 menos el tiempo de interacción con el extraño 1 dividido entre la suma de ambos. D-E) Porcentaje de inhibición de la respuesta a sobresalto por un prepulso 12 dB por encima del ruido de fondo y separado del pulso (120 dB) por 30 o 120 milisegundos. F) Porcentaje de habituación al estímulo principal de 120 dB. G) Preferencia por sacarosa, en un test de dos botellas, expresada en porcentaje. Los resultados se representan mediante la media \pm EEM. n en la **tabla R1.4** Las interacciones se representan con corchetes y se acompañan de una gráfica simplificada. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto.

n	Lab. Y	Lab. 3 salas		PPI				Sac.	As. Incid.
Condición	-	S	NS	A	B	C	D	-	M/D
M sal veh	15	15	15	15	13	15	10	15	8
M LPS veh	13	13	13	11	9	13	8	13	9
M sal THC	12	13	13	12	12	13	9	13	7
M LPS THC	13	14	14	14	12	13	9	14	7
H sal veh	18	18	18	16	13	16	15	16	10
H LPS veh	13	13	13	11	11	12	9	12	4
H sal THC	17	18	18	18	16	18	13	18	8
H LPS THC	12	12	12	10	8	11	10	11	4

Tabla R1.4. Número de animales utilizados en la estadística de las pruebas de conducta de la tanda 1. Se muestran el número final de animales por grupo, tras eliminar valores atípicos, que se utilizaron en las pruebas estadísticas del laberinto en Y (Lab. Y), el laberinto de 3 salas (sociabilidad y preferencia por la novedad social), la prueba de inhibición por prepulso de la respuesta de sobresalto (PPI), la prueba de preferencia por sacarosa (Sac.) y el test de asociaciones incidentales (As. Incid.). S: sociabilidad. NS: Novedad social. A: 12dB y 120ms. B: 4dB y 120ms. C: 12dB y30ms. D: 4dB y 30ms. M/D: Condicionamiento mediado y condicionamiento directo.

1.2.2. La AIM incrementa las interacciones sociales en la edad adulta

Con el fin de encontrar síntomas similares al retraimiento social que ocurre en humanos que padecen esquizofrenia, se analizaron dos componentes del comportamiento social: interacción social y preferencia por la novedad social. En el primer caso, se evaluó la preferencia entre un objeto animado, una rata conspecífica del mismo sexo (*Extraño1*), y un objeto inanimado en un laberinto de tres salas (**Figura 1.4B**). En primer lugar, analizando los tiempos de interacción de ambos objetos mediante un ANOVA de medidas repetidas se encontró un efecto general entre los niveles "objeto" ($F_{(1, 108)} = 873,78$; $p = 0,000$ $\eta^2_p = 0.89$) indicando una preferencia generalizada por *Extraño1*. En lo que respecta al índice de sociabilidad, se observó que las hembras tuvieron peores puntuaciones en dicho índice en comparación con los machos (**Tabla R1.5**). Además, se observó un aumento de este índice causado por la exposición a LPS durante la gestación. Sin embargo no se encontraron cambios significativos ocasionados por la administración de THC.

La preferencia por la novedad social, se evaluó analizando los tiempos de interacción entre *Extraño1* y una nueva rata (*Extraño2*) utilizada como novedad social (**Figura 1.4C**). De la misma manera que en el caso anterior, se encontró una preferencia generalizada por la rata novedosa ($F_{(1, 105)} = 105,36$; $p = 0,000$ $\eta^2_p = 0,501$). Además, acorde con los datos anteriores, se observó un incremento en la preferencia por la novedad social de las ratas expuestas a AIM (**Tabla R1.5**). Por otro lado, el THC

produjo un descenso en este componente del comportamiento social, especialmente en hembras, sin interactuar con la exposición a LPS prenatal.

	Efecto (ANOVA)	$F(g_{LM}, g_{LR})$	Valor p	η^2_p
<u>Sociabilidad</u>	Sexo	$F(1, 108) = 10,38$	0,002	0,088
	AIM	$F(1, 108) = 4,79$	0,031	0,042
	Postnatal	$F(1, 108) = 28,07$	0,527	-
<u>Novedad social</u>	Sexo	$F(1, 108) = 2,49$	0,117	-
	AIM	$F(1, 108) = 8,99$	0,003	0,077
	Postnatal	$F(1, 108) = 4,8$	0,031	0,043
	AIM*Postnatal	$F(1, 108) = 0,01$	0,432	-

Tabla R1.5. Estadísticos de las pruebas de interacción social. Se presentan los valores estadísticos de la prueba del laberinto de 3 salas. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). M = Machos. H = Hembras.

1.2.3. Formación de asociaciones incidentales: análisis de realidad

El análisis de síntomas psicóticos, como delirios o alucinaciones, en animales es algo especialmente complejo y casi imposible de abordar, especialmente de manera directa. Por ello, en este caso se estudiaron procesos que podrían ser subyacentes a dichos fenómenos psicóticos como la monitorización de la realidad.

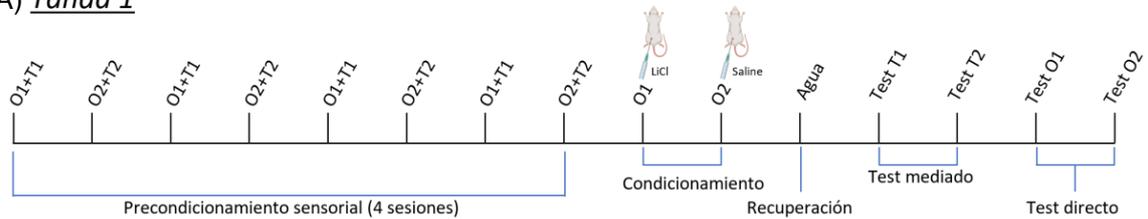
En este estudio se analizó el fenómeno de condicionamiento mediado en un paradigma de preconditionamiento sensorial (**Figura R1.5A**). El ANOVA de medidas repetidas con 3 vías realizado encontró un efecto principal de mCS sugiriendo menor consumo generalizado de esa solución (**Figura R1.5B**), pero no se observaron efectos de la exposición a LPS, THC, ni interacciones entre ambos (**Tabla R1.6**). Examinando los datos del condicionamiento directo, los efectos del LiCl habían desaparecido (**Figura R1.5D**), probablemente debido a la cantidad de tiempo transcurrido entre el condicionamiento y el test. Cuando se incluyó en los análisis el olor que había sido condicionado (almendra o plátano) como un factor más, se observó que el consumo de los mCS estaba influido por la exposición a LPS, en función del olor condicionado. Cuando el olor condicionado de manera aversiva era almendra, la exposición a LPS influía en las diferencias entre el consumo de mCS- y mCS+ (**Figura R1.5C**). Concretamente el LPS provocó la desaparición de diferencias entre mCS- y mCS+, eliminando así el condicionamiento mediado que sí se producía en los animales salino. En cambio, esta interacción está ausente cuando el olor condicionado es el plátano y se encuentran diferencias en el consumo de mCS- y mCS+ tanto de los salino como de los LPS. Esto podría estar indicando que, en estas concentraciones, existe una mayor saliencia del plátano como estímulo olfativo.

Resultados: Objetivo 1

Efecto (ANOVA)	F(g _{lm} , g _{lr})	Valor p	η ² _p
mCS	F(1, 49) = 6,86	0,012	0,123
mCS*Sexo	F(1, 49) = 0,04	0,843	-
mCS*AIM	F(1, 49) = 2,36	0,131	-
mCS*Postnatal	F(1, 49) = 1,01	0,320	-
mCS*AIM*Postnatal	F(1, 49) = 0,72	0,399	-
mCS*olorC*AIM	F(1, 41) = 6,65	0,014	0,139
mCS*[olorC = Alm]*AIM	F(1, 28) = 7,17	0,012	0,204
mCS*[olorC = Alm]*[AIM = sal]	F(1, 28) = 11,25	0,002	0,287
mCS*[olorC = Plát]*AIM	F(1, 25) = 0,587	0,451	-

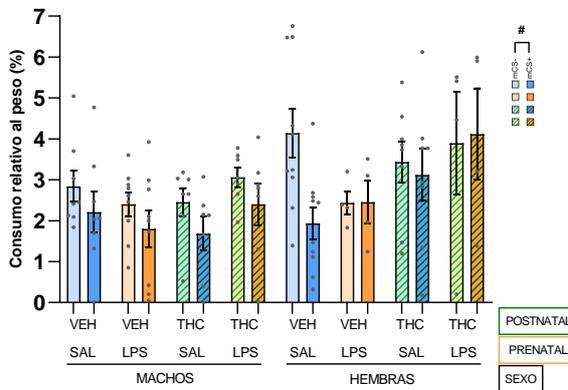
Tabla R1.6. Estadísticos del test de asociaciones incidentales. Se exponen estadísticos de la prueba de asociaciones incidentales. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores intra-sujeto: mCS (+/-). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC), olorC (alm/plát). M = Machos. H = Hembras. OlorC = olor condicionado. Alm = almendra. Plát = plátano.

A) Tanda 1

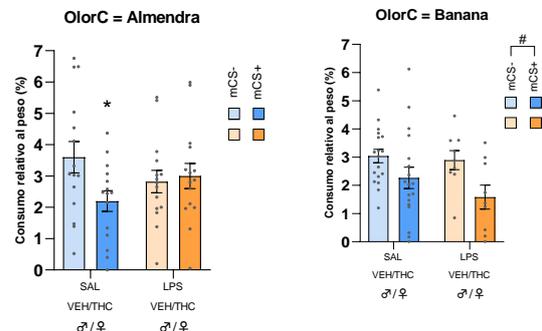


B)

Condicionamiento mediado



C)



D)

Condicionamiento directo

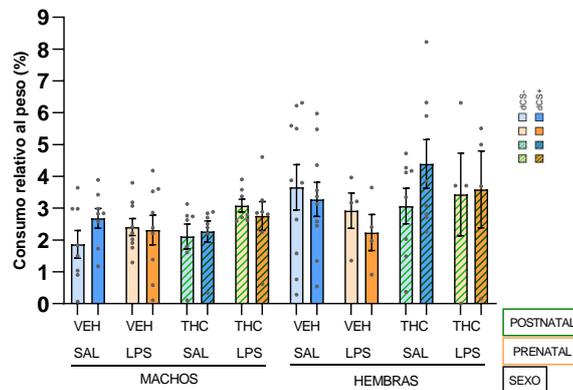


Figura R1.5. Test de asociaciones incidentales. A) Esquema temporal de la prueba de asociaciones

incidentales. Cada línea vertical representa un día. Durante el preconditionamiento sensorial se realizó la asociación entre dos estímulos (O1+T1 y O2+T2). En la fase de condicionamiento los animales fueron condicionados de manera aversiva con LiCl tras la exposición a O1. Tras un día de recuperación con acceso a agua durante 1h por la mañana y otra por la tarde, se llevaron a cabo los test de condicionamiento directo e indirecto. Se utilizaron almendra (benzaldehído) y plátano (isoamilo acetato) como olores, y salado (NaCl) y ácido (HCl) como estímulos gustativos. B) Consumo de los sabores con condicionamiento mediado o no normalizados por peso y expresados en porcentaje. C) Representación gráfica de la influencia del LPS en el condicionamiento mediado en función del olor condicionado. D) Consumo de agua en presencia de los olores condicionados y no condicionados expresado en porcentaje en función del peso. Los resultados se representan mediante la media \pm EEM. Las interacciones se representan con una gráfica simplificada. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto, # $p < 0,05$ efectos intra-sujeto.

1.2.4. La AIM altera el filtrado sensoriomotor preatencional

El filtrado sensoriomotor preatencional fue medido a través de la inhibición por prepulso de la respuesta al sobresalto. En la condición 12dB_30ms, la exposición a LPS durante la gestación provocó una menor inhibición de la respuesta en ambos sexos (**Figura R1.4D**). Este mismo efecto causado por la exposición a LPS prenatal se encontró en la condición 12dB_120ms (**Figura R1.4E**). Además, se observó un mayor porcentaje de habituación en las hembras (**Figura R1.4F**). No obstante, no se encontraron más efectos significativos en el resto de condiciones (**Tabla R1.7**).

Condición PPI	Efecto	$F(\text{glm}, \text{glr})$	Valor p	η^2_p
12dB_120ms	Sexo	$F(1, 99) = 0,003$	0,954	-
	AIM	$F(1, 99) = 5,153$	0,025	0,788
	THC	$F(1, 99) = 0,706$	0,403	-
	Sexo*AIM	$F(1, 99) = 1,848$	0,177	-
	Sexo*THC	$F(1, 99) = 0,071$	0,790	-
	AIM*THC	$F(1, 99) = 1,666$	0,200	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 99) = 2,363$	0,127	-
4dB_120ms	Sexo	$F(1, 86) = 1,752$	0,189	-
	AIM	$F(1, 86) = 2,136$	0,148	-
	THC	$F(1, 86) = 2,531$	0,115	-
	Sexo*AIM	$F(1, 86) = 2,392$	0,126	-
	Sexo*THC	$F(1, 86) = 0,299$	0,586	-
	AIM*THC	$F(1, 86) = 0,452$	0,503	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 86) = 0,475$	0,492	-
12dB_30ms	Sexo	$F(1, 103) = 3,047$	0,084	-
	AIM	$F(1, 103) = 10,973$	0,001	0,096
	THC	$F(1, 103) = 0,720$	0,398	-
	Sexo*AIM	$F(1, 103) = 0,052$	0,820	-
	Sexo*THC	$F(1, 103) = 0,692$	0,407	-
	AIM*THC	$F(1, 103) = 0,446$	0,506	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 103) = 0,004$	0,950	-
4dB_30ms	Sexo	$F(1, 75) = 3,445$	0,067	-
	AIM	$F(1, 75) = 0,487$	0,487	-
	THC	$F(1, 75) = 0,910$	0,343	-
	Sexo*AIM	$F(1, 75) = 0,246$	0,621	-
	Sexo*THC	$F(1, 75) = 0,014$	0,905	-
	AIM*THC	$F(1, 75) = 0,027$	0,869	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 75) = 1,744$	0,191	-
Habituaación	Sexo	$F(1, 102) = 9,372$	0,026	0,048
	AIM	$F(1, 102) = 0,392$	0,533	-
	THC	$F(1, 102) = 0,856$	0,862	-
	Sexo*AIM	$F(1, 102) = 0,083$	0,774	-
	Sexo*THC	$F(1, 102) = 0,453$	0,502	-
	AIM*THC	$F(1, 102) = 1,079$	0,301	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 102) = 1,283$	0,260	-

Tabla R1.7. Estadísticos para todas las condiciones de la PPI y la habituación. Se indica el número de dB del prepulso por encima del ruido de fondo (65 dB) y el intervalo de tiempo en milisegundos entre el prepulso y el pulso (120 dB). Además, se muestran los estadísticos para la habituación al estímulo principal (120 dB). Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). M = Machos. H = Hembras.

1.2.5. La activación inmune prenatal incrementa la preferencia por sacarosa en ambos sexos

Para estudiar la anhedonia, se realizó una prueba de preferencia por sacarosa. En primer lugar, a través de un análisis de medidas repetidas se comprobó que existía una preferencia generalizada por la solución con sacarosa ($F_{(1, 103)} = 385,81$; $p = 0,000$, $\eta^2_p = 0,789$). No se encontraron diferencias significativas en el total de agua ($F_{(1, 101)} = 1,29$; $p = 0,26$) o sacarosa consumida ($F_{(1, 102)} = 1,40$; $p = 0,239$). Analizando el porcentaje de preferencia por sacarosa entre grupos se observó un efecto inesperado de la exposición a LPS durante la gestación, aumentando esta la preferencia por sacarosa (**Figura R1.4G**) ($F_{(1, 104)} = 5,41$, $p = 0,022$, $\eta^2_p = 0,049$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas debidas la exposición a THC o a su interacción con la AIM. Tampoco hubo efectos significativos del sexo.

1.3. Exploración de posibles marcadores tempranos en las madres que puedan indicar o predecir la gravedad de los síntomas de la descendencia

1.3.1. Ausencia de asociaciones entre la exploración comportamental de las madres y la severidad de los déficits en la descendencia

Con el fin de hallar marcadores tempranos presentes en las madres que pudieran predecir la presencia o la gravedad de los síntomas en su descendencia, se realizaron pruebas de comportamiento a las futuras madres antes de los cruces (**Figura R1.1A**). Además de analizar comportamientos de tipo ansioso con el laberinto en cruz elevado y el laberinto de campo abierto, también se eligió la disminución de peso tras la primera inyección y la variación máxima de temperatura causada por la administración de LPS como posible marcador. Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre los índices de las madres, o sus componentes, y los índices de la descendencia (**Tabla R1.8**).

Descendencia		IM	LCE	A. Loc.	Temp.	Peso
IC (H THC)	Pearson	0,674	0,192	0,542	-0,491	0,732
	Valor <i>p</i>	0,529	0,877	0,635	0,673	0,477
	N	3	3	3	3	3
IC (H veh)	Pearson	0,728	-0,536	-0,656	0,72	0,474
	Valor <i>p</i>	0,272	0,464	0,344	0,28	0,526
	N	4	4	4	4	4
IC (M THC)	Pearson	0,199	-0,36	-0,284	0,872	-0,420
	Valor <i>p</i>	0,748	0,552	0,643	0,054	0,481
	N	5	5	5	5	5
IC (M veh)	Pearson	0,126	0,38	-0,884	0,565	-0,521
	Valor <i>p</i>	0,874	0,62	0,116	0,435	0,479
	N	4	4	4	4	4

Tabla R1.8. Correlaciones entre marcadores tempranos y déficits de la descendencia. Se muestran las correlaciones realizadas entre las pruebas de comportamiento realizadas a las madres que recibieron LPS y a su descendencia. Para la descendencia se ha elaborado un índice resultante de sumar todas las pruebas normalizadas y multiplicadas previamente por menos uno. En el caso de las madres se ha realizado un índice similar (con puntuaciones normalizadas) restando a la pérdida de peso tras la primera inyección el índice del LCE, la actividad locomotora y la mayor variación de temperatura tras la administración de LPS. IM = Índice madre. LCE: Laberinto en cruz elevado. A. Loc.: Actividad locomotora. Temp.: Temperatura. H: Hembras. M: Machos.

Objetivo 2. EXPLORAR POSIBLES EFECTOS SURGIDOS DE LA COMBINACIÓN DE UNA ACTIVACIÓN INMUNE MATERNA Y UNA ADMINISTRACIÓN SIMILAR A UN CONSUMO ABUSIVO DE THC DURANTE LA ADOLESCENCIA

2.1. Evaluación de la potencia de los impactos mediante cambios de temperatura y/o peso en las madres y la descendencia

2.1.1. La administración LPS durante la gestación produce hipotermia y disminución del incremento de peso normal

Las inyecciones de LPS durante la gestación, al igual que en el experimento anterior, produjeron una clara hipotermia el DG15 (**Figura R2.1C**) como demuestra la interacción Tiempo*AIM. Al realizar el análisis de efectos simples con pruebas de contraste, no se encontraron diferencias significativas de la temperatura con el paso del tiempo en el grupo inyectado con suero salino. Aunque, estos mismos análisis, sí revelaron diferencias en el grupo LPS al comparar el tiempo T_0 con T_{60} , T_{120} y T_{240} (**Tabla R2.1**). Sin embargo, el segundo día de la inyección no se observó una interacción Tiempo*AIM sino un efecto del tiempo. La inspección visual de los datos parece estar sugiriendo que la exposición a LPS estaría desempeñando un importante papel en este efecto (**Figura R2.1D**). Esto estaría apoyado por las pruebas de contraste que se realizaron e indicaron diferencias significativas al comparar T_0 con T_{120} y T_{240} .

En cuanto al peso corporal, se observó un aumento significativo de los pesos de todos los animales (**Figura R2.1B**) debido al normal desarrollo de la gestación y una interacción Día*AIM. El análisis de los efectos simples de esta interacción reveló un efecto del tiempo en las madres inyectadas con salino (**Tabla R2.1**). Además, las pruebas de contraste mostraron diferencias significativas entre el peso corporal del primer día de inyección (DG15) y DG16, DG17 y DG18. Sin embargo, al llevar a cabo este mismo análisis en el grupo LPS, a pesar de obtener un efecto significativo del factor Día, al realizar las pruebas de contraste (comparando el peso de DG15 con los demás) solo se observaron diferencias significativas en DG18. Esto indica que, durante los dos siguientes días a la primera inyección de LPS, este grupo no incrementó de manera significativa su peso.

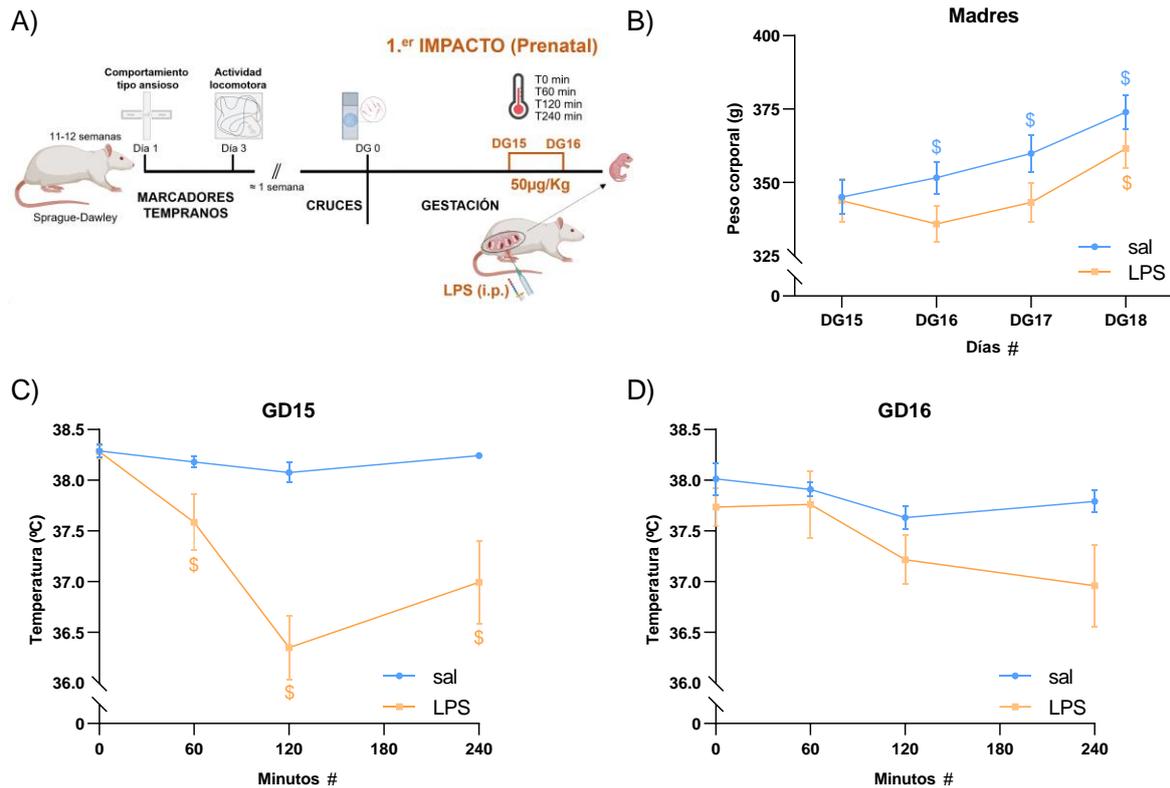


Figura R2.1. Inducción de AIM en la gestación de las tandas 3 y 4. A) Diagrama temporal del análisis de marcadores tempranos y la inducción de AIM en las tandas 3 y 4. Como posibles marcadores tempranos, de manera previa a los cruces, se analizaron comportamientos de tipo ansioso, actividad locomotora y se registró tanto la temperatura como el peso tras las inyecciones de LPS. El día 0 de gestación se estableció mediante la presencia de espermatozoides en un frotis vaginal. B) Peso corporal de las madres durante los días de las inyecciones de LPS y el día después de finalizar la administración. C) Temperatura rectal 0, 60, 120 y 240 minutos después de la inyección de LPS en los días de gestación 15 y 16. Los resultados se representan como la media \pm EEM. $n = 8$ animales. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto; # $p < 0,05$ efectos generales intra-sujeto; \$ $p < 0,05$ diferencias respecto a T_0 .

	Efecto	$F(\text{glm, glr})$	Valor p	η^2_p
<u>Temperatura DG15</u>	Tiempo*AIM	$F(2, 27) = 16,28$	0,000	0,538
	Tiempo*[AIM=LPS] (T_0 vs T_{60})	$F(1, 7) = 6,01$	0,044	0,462
	Tiempo*[AIM=LPS] (T_0 vs T_{120})	$F(1, 7) = 49,67$	0,000	0,876
	Tiempo*[AIM=LPS] (T_0 vs T_{240})	$F(1, 7) = 12,01$	0,010	0,632
<u>Temperatura DG16</u>	Tiempo	$F(1, 19) = 3,98$	0,047	0,235
	Tiempo (T_0 vs T_{60})	$F(1, 13) = 0,93$	0,351	-
	Tiempo (T_0 vs T_{120})	$F(1, 13) = 8,63$	0,012	0,005
	Tiempo (T_0 vs T_{240})	$F(1, 13) = 5,70$	0,033	0,055
<u>Pesos DG15-DG18</u>	DG	$F(2, 27) = 110,01$	0,000	0,887
	DG*AIM	$F(2, 27) = 11,13$	0,000	0,443
	DG*[AIM=LPS]	$F(1, 8) = 38,22$	0,000	0,845
	DG*[AIM=LPS] (DG15 vs DG16)	$F(1, 7) = 4,67$	0,067	-
	DG*[AIM=LPS] (DG15 vs DG17)	$F(1, 7) = 0,17$	0,689	-
	DG*[AIM=LPS] (DG15 vs DG18)	$F(1, 7) = 29,66$	0,001	0,809
	DG*[AIM=sal]	$F(2, 12) = 109,04$	0,000	0,94
	DG*[AIM=sal] (DG15 vs DG16)	$F(1, 7) = 51,44$	0,000	0,880
DG*[AIM=sal] (DG15 vs DG17)	$F(1, 7) = 50,21$	0,000	0,878	
DG*[AIM=sal] (DG15 vs DG18)	$F(1, 7) = 198,45$	0,000	0,966	

Tabla R2.1. Efectos de LPS en las madres gestantes. Estadísticos para los diferentes efectos causados por AIM en la temperatura y el peso corporal de las madres. Las interacciones se expresan con "*" entre los factores correspondientes. En los efectos simples, el grupo analizado aparece entre

corchetes y los contrastes entre paréntesis. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: AIM). Factores intra-sujeto: Tiempo (minutos) y DG (día). Factores inter-sujeto: AIM (sal/LPS).

2.1.2. La exposición durante la adolescencia a dosis crecientes de THC disminuye el peso de los animales: reversión por AIM

El peso corporal de los animales aumentó de manera general debido al crecimiento normal (**Figura R2.2**). Sin embargo, el ANOVA de medidas repetidas reveló una interacción entre DP y el sexo. El análisis de los efectos simples mostró que ambos sexos incrementaron su peso a lo largo de la administración, aunque lo hicieron a ritmos diferentes tal y como reveló el análisis inter-sujeto (**Tabla R2.2**).

De igual manera, se observó una interacción DP*AIM*Postnatal (**Figura R2.3**). Tras analizar la interacción en función de la exposición a THC se observó que el LPS afectó a los animales que recibieron vehículo provocando un incremento de peso mayor ([Post = veh] (LPS vs sal) (InterS)) pero no a los animales expuestos a THC ([Post = THC] (LPS vs sal) (InterS)) (**Tabla R2.2**). Sin embargo, al analizar la interacción en función del impacto postnatal, se apreció una disminución, producida por el THC, tanto en el incremento de peso de los animales salino ([AIM = sal] (THC vs veh) (InterS)) como de los que fueron expuestos a LPS ([AIM = LPS] (THC vs veh) (InterS)).

Estos datos parecen indicar que el THC anula los efectos de la AIM (aumento de peso), pero esta no anula los efectos del THC (disminución de peso). Además, la presencia de un efecto inter-sujeto global del THC que se mantuvo hasta el día postnatal 55 parece indicar que, a estas dosis, el efecto del THC es ligeramente más potente que el producido por la exposición a LPS.

Efectos (ANOVA)	F(glm, glr)	Valor p	η^2_p
DP	F(4, 637) = 4616	0,000	0,963
DP*Sexo	F(4, 637) = 35,63	0,000	0,169
DP*[Sexo = M]	F(2, 164) = 1261	0,000	0,936
DP*[Sexo = H]	F(2, 224) = 1534	0,000	0,942
Sexo (InterS)	F(1, 175) = 25,74	0,000	0,128
DP*AIM	F(4, 637) = 3,88	0,005	0,022
DP*[AIM = sal]	F(10, 184) = 1315	0,000	0,935
DP*[AIM = LPS]	F(10, 159) = 1192	0,000	0,931
AIM (InterS)	F(1, 175) = 3,03	0,084	-
DP*Postnatal	F(4, 637) = 121,10	0,000	0,409
DP*[Postnatal = veh]	F(3, 236) = 2793	0,000	0,967
DP*[Postnatal = THC]	F(3, 258) = 1153	0,000	0,930
Postnatal (InterS)	F(1, 175) = 33,97	0,000	0,163
DP*AIM*Post	F(4, 637) = 3,06	0,020	0,017
[Post = veh] (LPS vs sal) (InterS)	F(1, 93) = 5,82	0,018	0,059
[Post = THC] (LPS vs sal) (InterS)	F(1, 86) = 0,001	0,978	-
[AIM = sal] (THC vs veh) (InterS)	F(1, 91) = 7,48	0,008	0,076
[AIM = LPS] (THC vs veh) (InterS)	F(1, 88) = 23,61	0,000	0,212

Tabla R2.2. Efectos del THC y LPS en el peso durante la exposición a dosis altas de THC. Se muestran los efectos principales y las interacciones representadas con “*”. Los análisis de los efectos simples muestran entre corchetes el grupo analizado. Los análisis de efectos inter-sujeto se

representan en cursiva acompañados de "(InterS)". Factores intra-sujeto: DP (día). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), Prenatal (sal/LPS), AIM (veh/THC). DP = Día postnatal. M = Machos. H = Hembras.

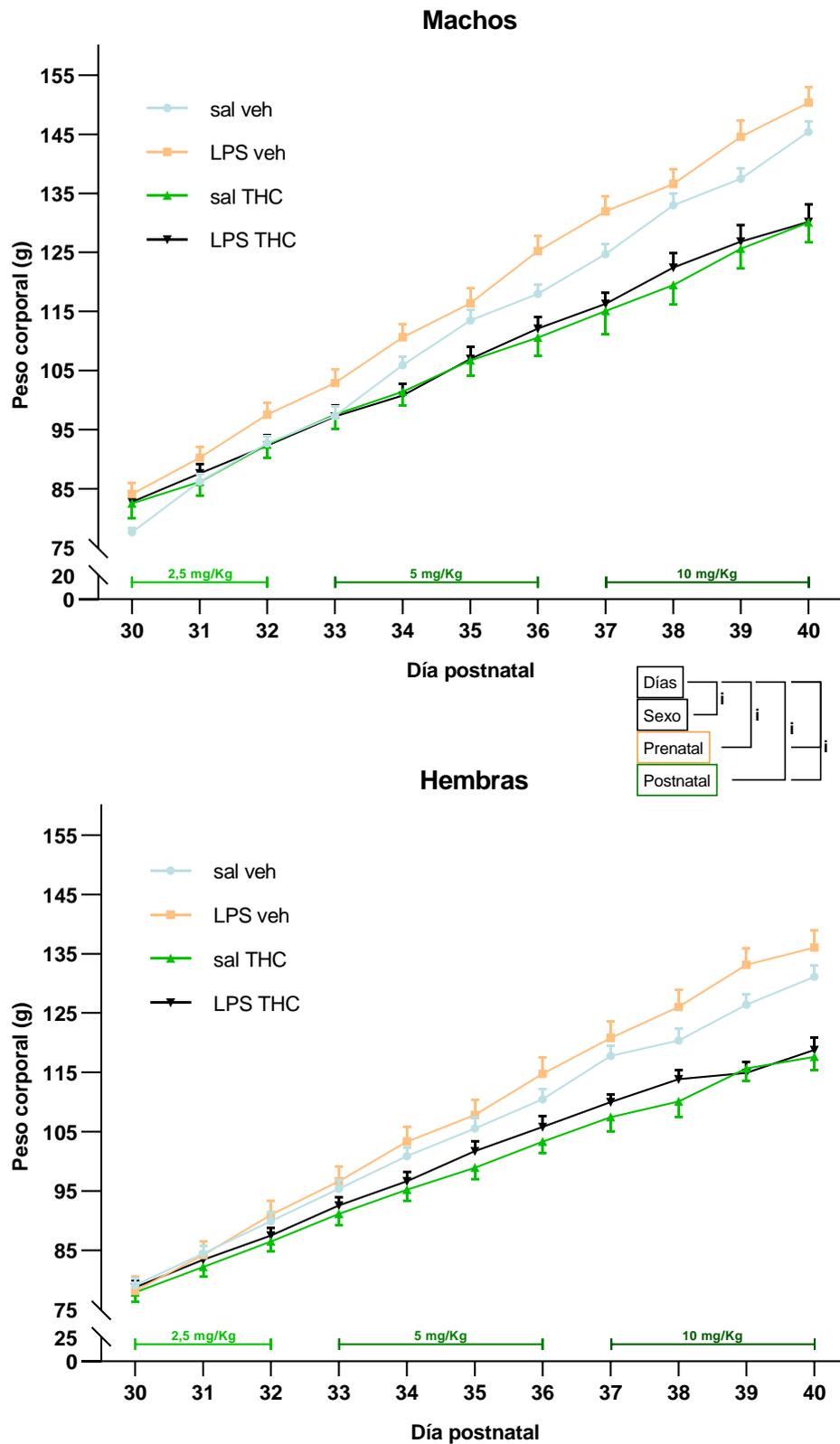
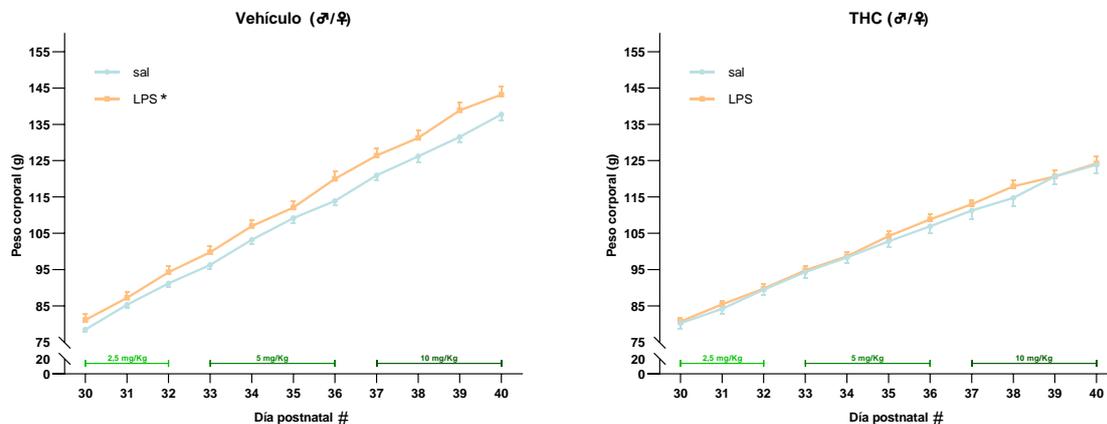


Figura R2.2. Efecto del THC en el peso de la descendencia. Cambios en el peso corporal durante la administración de THC en machos y hembras representados como la media \pm EEM. La

Resultados: Objetivo 2

administración de THC se realizó durante 11 días en dosis crecientes de la siguiente manera: 2,5 mg/Kg (DP30-32), 5 mg/Kg (DP33-36) y 10 mg/Kg (DP37-40). Las interacciones se representan con “i” mediante corchetes entre los factores implicados. n = 21 (M sal veh), 23 (M LPS veh), 22 (M sal THC), 21 (M LPS THC), 28 (H sal veh), 23 (H LPS veh), 22 (H sal THC), 23 (H LPS THC).

A) Efectos del LPS



B) Efectos del THC

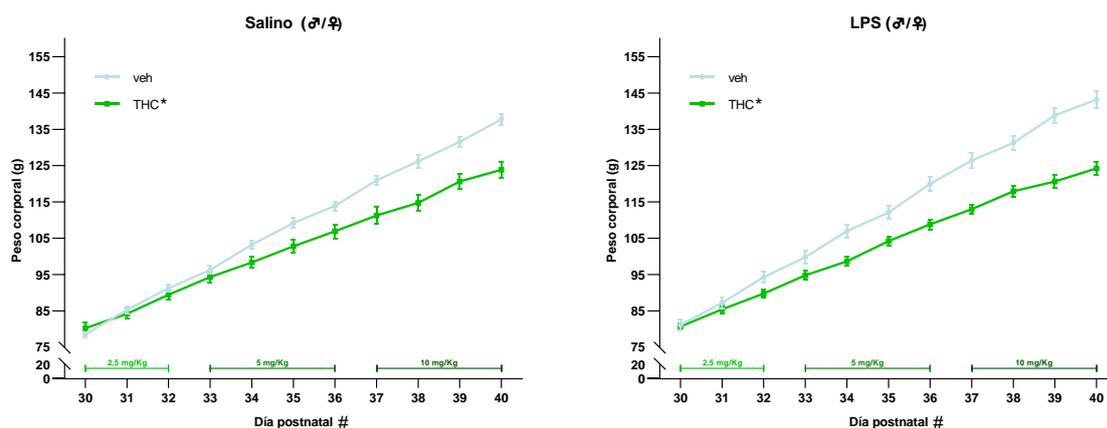


Figura R2.3. Efectos en el peso de las interacciones entre THC y LPS. A) Influencia del LPS en el peso en función de si los animales han recibido THC (derecha) o no (izquierda). B) Efectos del THC en el peso corporal en función de si los animales han sido expuestos a LPS durante la gestación (derecha) o no (izquierda). Los resultados se representan como la media \pm EEM. La administración de THC se realizó durante 11 días en dosis crecientes de la siguiente manera: 2,5 mg/Kg (DP30-32), 5 mg/Kg (DP33-36) y 10 mg/Kg (DP37-40). Los efectos intra-sujeto se representan con “#” $p < 0,05$ y los efectos inter-sujeto con “*” $p < 0,05$.

2.2. Búsqueda de alteraciones conductuales similares a los síntomas cognitivos, negativos y positivos que ocurren en esquizofrenia

2.2.1. La combinación de AIM con esta dosis de THC no produce efectos en la memoria de trabajo

Los análisis del porcentaje de alternancia llevados a cabo en la descendencia, para comprobar el estado de la memoria de trabajo, reflejaron un efecto del sexo (**Figura R2.4.B**). No se encontraron efectos causados por la exposición a LPS durante la gestación. Tampoco se apreciaron diferencias significativas causadas por la exposición a THC o su interacción con la exposición a LPS prenatal (**Tabla R2.3**).

Efecto (ANOVA)	$F(\text{glM}, \text{glR})$	Valor p	η^2_p
Sexo	$F(1, 77) = 7,66$	0,007	0,090
Sexo*AIM	$F(1, 77) = 0,00$	0,952	-
AIM	$F(1, 77) = 0,00$	0,947	-
Postnatal	$F(1, 77) = 0,47$	0,497	-

Tabla R2.3. Estadísticos del laberinto en Y. Se muestran los estadísticos de la prueba del laberinto en Y tras un ANOVA de tres vías. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). M = Machos. H = Hembras.

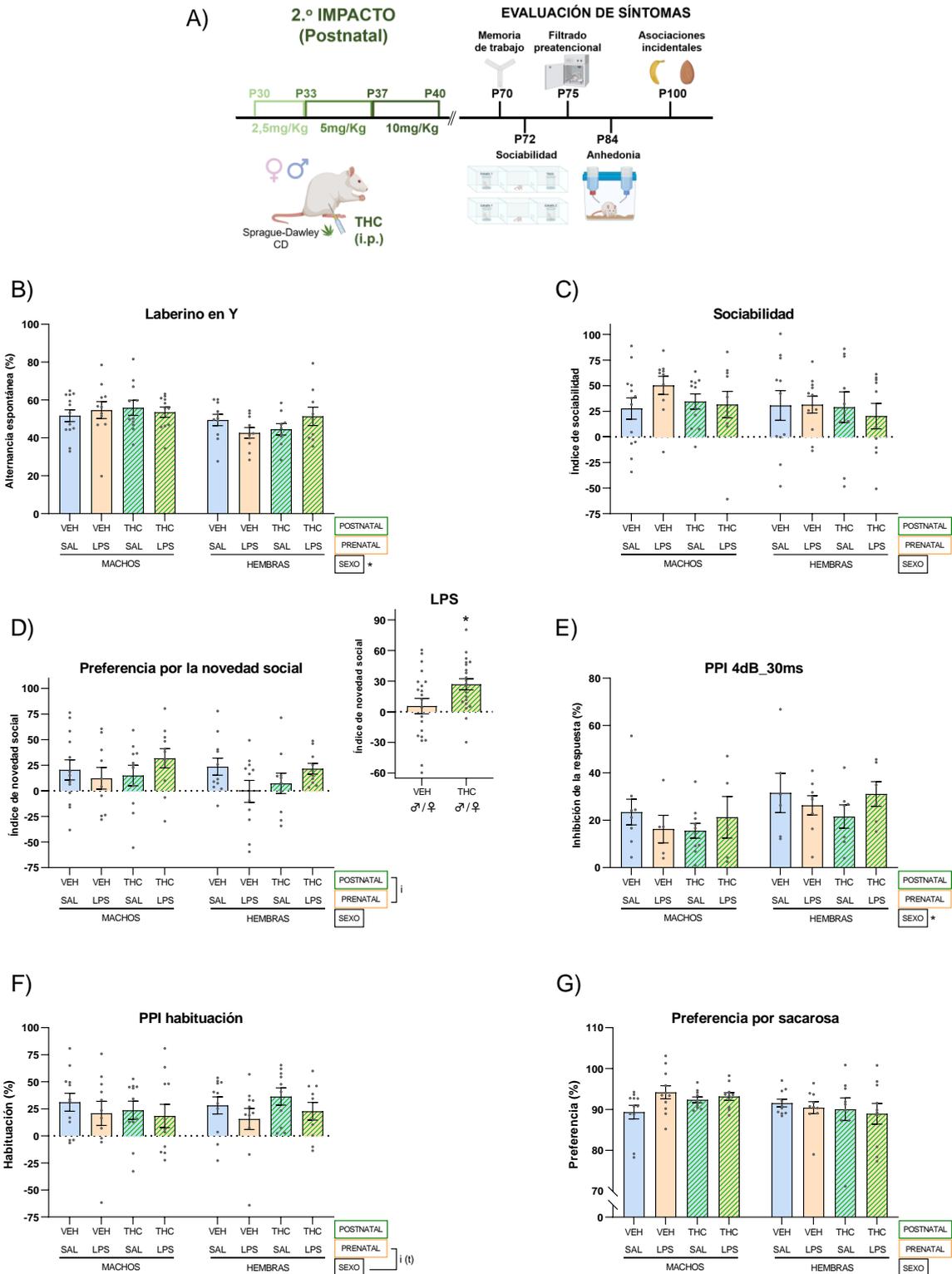


Figura R2.4. Pruebas de comportamiento tras AIM y dosis crecientes de THC. A) Esquema temporal de la administración de THC en dosis crecientes o vehículo y las pruebas de conducta realizadas a las crías. Las dosis de THC fueron 2,5 mg/Kg (DP30-32), 5 mg/Kg (DP33-36) y 10 mg/Kg (DP37-40). Se presentan los días aproximados de las pruebas de comportamiento realizadas: Laberinto en Y, laberinto de 3 salas, test de inhibición por prepulso, test de preferencia por sacarosa y prueba de asociaciones incidentales. B) Porcentaje de tríadas válidas en el laberinto en Y respecto a tríadas posibles. Se entiende como tríada válida la entrada en 3 brazos sin repetir ninguno de ellos. El número de tríadas posibles se ha calculado como el total de entradas menos dos. C) Índice de sociabilidad calculado como el tiempo de interacción con el extraño 1 menos el tiempo de interacción con el objeto

dividido entre la suma de ambos. D) Índice de preferencia por la novedad social calculado como el tiempo de interacción con el extraño 2 menos el tiempo de interacción con el extraño 1 dividido entre la suma de ambos. E) Porcentaje de inhibición de la respuesta a sobresalto por un prepulso 4 dB por encima del ruido de fondo y separado del pulso (120 dB) por 30 milisegundos. F) Porcentaje de habituación al estímulo principal de 120 dB. G) Preferencia por sacarosa medida mediante un test de dos botellas y expresada en porcentaje. Los resultados se representan mediante la media \pm EEM. n en la **tabla R2.4**. Las interacciones se representan con corchetes y se acompañan de una gráfica simplificada. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto; “t” ($0,05 < p < 0,06$) tendencia.

n	Lab. Y	Lab. 3 salas		PPI				Sac.	As. Incid.
Condición	-	S	NS	A	B	C	D	-	M/D
M sal veh	13	13	13	12	8	11	8	13	13
M LPS veh	11	10	10	10	6	7	5	11	11
M sal THC	11	11	11	10	8	9	10	10	11
M LPS THC	11	10	11	9	5	7	5	10	11
H sal veh	11	11	11	10	7	10	6	10	11
H LPS veh	10	11	11	9	6	9	8	10	11
H sal THC	9	10	10	10	8	10	7	9	10
H LPS THC	9	10	10	8	4	7	6	10	10

Tabla R2.4. Número de animales utilizados en la estadística de las pruebas de conducta de las tandas 2 y 3. Se muestran el número final de animales por grupo, tras eliminar valores atípicos, que se utilizaron en las pruebas estadísticas del laberinto en Y (Lab. Y), el laberinto de 3 salas (sociabilidad y preferencia por la novedad social), la prueba de inhibición por prepulso de la respuesta de sobresalto (PPI), la prueba de preferencia por sacarosa (Sac.) y el test de asociaciones incidentales (As. Incid.). S: sociabilidad. NS: Novedad social. A: 12dB y 120ms. B: 4dB y 120ms. C: 12dB y 30ms. D: 4dB y 30ms. M/D: Condicionamiento mediado y condicionamiento directo.

2.2.2. La exposición a LPS prenatal y a THC durante la adolescencia modulan la preferencia por la novedad social

En primer lugar, un ANOVA de medidas repetidas reflejó que los animales interaccionaban más tiempo con el *Extraño1* que con el objeto inanimado ($F_{(1, 75)} = 51,98$; $p = 0,000$, $\eta^2_p = 0,409$). No se observó efecto de la exposición a LPS en el porcentaje de preferencia (**Figura R2.4C**). Tampoco se encontró efecto alguno de la administración de THC (**Tabla R2.3**).

En cuanto a los datos de la preferencia por la novedad social, se observa igualmente una preferencia generalizada por el *Extraño2* analizada mediante un ANOVA de medidas repetidas de los tiempos de interacción ($F_{(1, 79)} = 20,91$; $p = 0,000$, $\eta^2_p = 0,209$). En este caso, al analizar los porcentajes de preferencia del *Extraño2* se observa una interacción entre la exposición a AIM y THC (**Tabla R2.5**). Un análisis de los efectos simples de esta interacción reveló que, en animales expuestos a LPS durante la gestación, la administración de THC produce un aumento de la preferencia por la novedad social (**Figura R2.4D**). Estas diferencias, producidas por la administración de THC, no se encontraron en los animales expuestos a suero salino durante la gestación (**Tabla R2.5**).

	Efecto (ANOVA)	$F(\text{gl}_M, \text{gl}_R)$	Valor p	η^2_p
<u>Sociabilidad</u>	Sexo	$F(1, 78) = 1,01$	0,318	-
	AIM	$F(1, 78) = 0,13$	0,719	-
	Postnatal	$F(1, 78) = 0,58$	0,449	-
	AIM*Postnatal	$F(1, 78) = 1,18$	0,281	-
<u>Novedad social</u>	Sexo	$F(1, 78) = 1,05$	0,310	-
	AIM	$F(1, 78) = 0,00$	0,960	-
	Postnatal	$F(1, 78) = 0,54$	0,463	-
	AIM*Postnatal	$F(1, 78) = 5,56$	0,021	0,066
	[AIM = sal]*Postnatal	$F(1, 83) = 1,32$	0,254	-
	[AIM = LPS]*Postnatal	$F(1, 83) = 5,04$	0,027	0,057

Tabla R2.5. Estadísticos de las pruebas de interacción social. Se presentan los valores estadísticos de la prueba del laberinto de 3 salas. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). M = Machos. H = Hembras.

2.2.3. Ausencia de efectos en el filtrado preatencional y en la preferencia por sacarosa

Los análisis de la prueba de inhibición por prepulso no revelaron, en ninguna de sus condiciones, efectos debidos a AIM, THC o su interacción (**Tabla R2.6**). Sin embargo, sí se observó una mayor inhibición de la respuesta en las hembras en la condición 4dB_30ms (**Figura R2.4E**). También se encontró una tendencia en la interacción sexo*AIM ($p = 0,055$) en la habituación (**Figura R2.4F**).

La prueba de preferencia por sacarosa se utilizó para tratar de encontrar posibles déficits semejantes a la anhedonia ocurrida en humanos. En primer lugar, se observó mediante un ANOVA de medidas repetidas que todos los animales tenían una preferencia general por la solución con sacarosa ($F(1, 68) = 481,78$; $p = 0,000$, $\eta^2_p = 0,876$). Sin embargo, analizando los porcentajes de preferencia de cada grupo no se encontraron diferencias causadas por la AIM o la exposición a THC (**Figura R2.4G**). Tampoco se observaron diferencias en la preferencia ocasionadas por el sexo.

Condición PPI	Efecto	F(glm, glr)	Valor p	η^2_p
<u>12dB 120ms</u>	Sexo	$F(1, 78) = 0,29$	0,591	-
	AIM	$F(1, 78) = 0,40$	0,531	-
	THC	$F(1, 78) = 0,02$	0,900	-
	Sexo*AIM	$F(1, 78) = 0,03$	0,855	-
	Sexo*THC	$F(1, 78) = 0,13$	0,719	-
	AIM*THC	$F(1, 78) = 0,00$	0,963	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 78) = 0,00$	0,987	-
<u>4dB 120ms</u>	Sexo	$F(1, 44) = 2,63$	0,112	-
	AIM	$F(1, 44) = 0,00$	0,977	-
	THC	$F(1, 44) = 1,14$	0,291	-
	Sexo*AIM	$F(1, 44) = 1,88$	0,178	-
	Sexo*THC	$F(1, 44) = 0,24$	0,624	-
	AIM*THC	$F(1, 44) = 1,65$	0,206	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 44) = 0,43$	0,514	-
<u>12dB 30ms</u>	Sexo	$F(1, 62) = 0,05$	0,824	-
	AIM	$F(1, 62) = 2,70$	0,106	-
	THC	$F(1, 62) = 0,00$	0,997	-
	Sexo*AIM	$F(1, 62) = 2,58$	0,114	-
	Sexo*THC	$F(1, 62) = 0,02$	0,893	-
	AIM*THC	$F(1, 62) = 0,234$	0,630	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 62) = 0,00$	0,972	-
<u>4dB 30ms</u>	Sexo	$F(1, 47) = 4,59$	0,037	0,089
	AIM	$F(1, 47) = 0,03$	0,858	-
	THC	$F(1, 47) = 0,26$	0,613	-
	Sexo*AIM	$F(1, 47) = 0,13$	0,718	-
	Sexo*THC	$F(1, 47) = 0,02$	0,885	-
	AIM*THC	$F(1, 47) = 3,05$	0,087	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 47) = 0,014$	0,905	-
<u>Habitación</u>	Sexo	$F(1, 79) = 1,28$	0,261	-
	AIM	$F(1, 79) = 1,70$	0,196	-
	THC	$F(1, 79) = 0,11$	0,747	-
	Sexo*AIM	$F(1, 79) = 3,78$	0,055	0,046
	[Sexo = M]*AIM	$F(1, 83) = 5,82$	0,018	0,066
	[Sexo = F]*AIM	$F(1, 83) = 0,19$	0,660	-
	Sexo*THC	$F(1, 79) = 0,41$	0,523	-
	AIM*THC	$F(1, 79) = 0,35$	0,556	-
	Sexo*AIM*THC	$F(1, 79) = 0,06$	0,814	-

Tabla R2.6. Estadísticos para todas las condiciones de la PPI. Se indica el número de dB del prepulso por encima del ruido de fondo (65dB) y el intervalo de tiempo en milisegundos entre el prepulso y el pulso (120dB). Además, se muestran los estadísticos para la habituación al estímulo principal (120 dB). Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). M = Machos. H = Hembras.

2.2.4. Formación de asociaciones incidentales: análisis de realidad

Al igual que en el objetivo anterior, se analizó la formación de asociaciones incidentales mediante el paradigma de preconditionamiento sensorial y condicionamiento mediado con el fin de determinar si existe una percepción alterada de la realidad. En este caso, se introdujeron modificaciones como el aumento de la duración del preconditionamiento sensorial y del condicionamiento y se cambió el tipo de test a preferencia de dos botellas (**Figura R2.5A**). También se aumentó la concentración del olor a almendra al mismo tiempo que se disminuyó levemente la del olor a plátano.

En primer lugar, un ANOVA de medidas repetidas reveló una tendencia a un menor consumo de mCS+ comparado con mCS- en todos los animales ($F(1, 80) = 3,73$;

Resultados: Objetivo 2

$p = 0,057$, $\eta^2_p = 0,045$). La inspección visual de los datos sugiere que son las hembras no expuestas a THC y los machos expuestos a ambos impactos los grupos que más influyen en esta tendencia (**Figura R2.5B**).

Para comprobar si existían diferencias en el condicionamiento mediado en función de qué olor era que se condicionaba con LiCl, se añadió al análisis el factor “OlorC” (olor condicionado) (**Tabla R2.7**). Con este análisis, se encontraron diferencias entre mCS- y mCS+ y una interacción con la exposición a LPS y THC. Sin embargo, al analizar los efectos simples, no se encontraron diferencias significativas entre mCS- y mCS+ en función de si el olor condicionado era almendra o plátano.

Por otro lado, los datos del condicionamiento directo indican un claro efecto del LiCl demostrado por un consumo significativamente menor del dCS+ en todos los grupos ($F_{(1, 80)} = 322,83$; $p = 0,000$, $\eta^2_p = 0,801$). Esto parece indicar que el aumento de la fase de condicionamiento ha permitido que se mantenga en el efecto del LiCl hasta la realización del test directo.

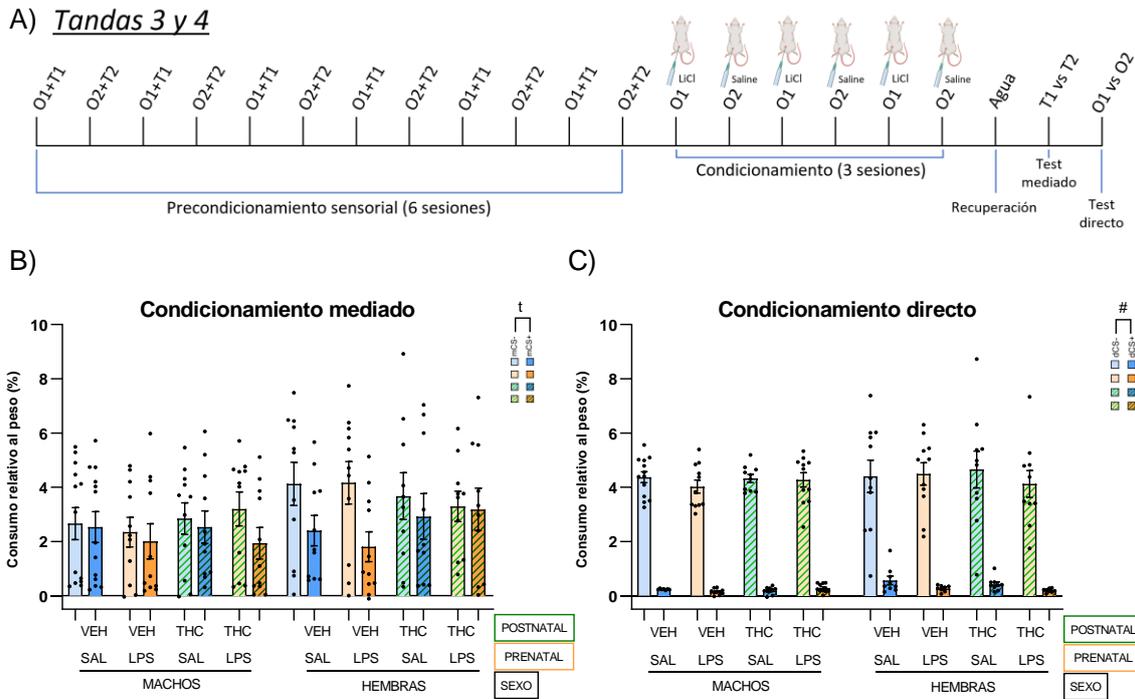


Figura R2.5. Test de asociaciones incidentales. A) Diagrama temporal de la prueba de asociaciones incidentales. Cada línea vertical representa un día. Durante el precondicionamiento sensorial se realizó la asociación entre dos estímulos (O1+T1 y O2+T2). En la fase de condicionamiento los animales fueron condicionados de manera aversiva con LiCl tras la exposición a O1. Tras un día de recuperación con acceso a agua durante 1h por la mañana, se llevaron a cabo los test de condicionamiento directo e indirecto mediante un test de preferencia de dos botellas con elección forzada. Se utilizaron almendra (benzaldehído) y plátano (isoamilo acetato) como olores y salado (NaCl) y ácido (HCl) como estímulos gustativos. B) Consumo de los sabores con condicionamiento mediado o no normalizados por peso y expresados en porcentaje. C) Consumo de los olores condicionados y no condicionados expresados en porcentaje en función del peso. Los resultados se representan mediante la media \pm EEM. Las interacciones se representan con una gráfica simplificada. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto; # $p < 0,05$ efectos intra-sujeto; “t” ($0,05 < p < 0,06$) tendencia.

Efecto (ANOVA)	F(glm, glr)	Valor p	η^2_p
mCS*olorC*Sexo	$F(1, 72) = 3,09$	0,083	-
mCS*olorC*AIM	$F(1, 72) = 0,64$	0,428	-
mCS*olorC*Postnatal	$F(1, 72) = 1,46$	0,230	-
mCS*olorC*AIM*Postnatal	$F(1, 72) = 4,34$	0,041	0,057
mCS*[olorC = Alm]*AIM*Postnatal	$F(1, 36) = 1,50$	0,228	-
mCS*[olorC = Plát]*AIM*Postnatal	$F(1, 36) = 2,99$	0,092	-

Tabla R2.7. Estadísticos del test de asociaciones incidentales. Se exponen estadísticos de la prueba de asociaciones incidentales de las tandas 3 y 4. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Factores intra-sujeto: mCS (+/-). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC), olorC (alm/plát). M: Machos. H: Hembras. OlorC: olor condicionado. Alm: almendra. Plát: plátano.

2.3. Evaluación de marcadores tempranos

2.3.1. La AIM evita la disminución de linfocitos T en futuras inyecciones de LPS

Unos diez días después del destete, se analizó la respuesta inmune de todas las madres tras una inyección de LPS y una de suero salino mediante el aislamiento y análisis de las diferentes poblaciones celulares de las PBMC. Se monitorizó el cambio en los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y células mieloides mediante citometría de flujo.

Para el estudio de los linfocitos T se utilizó el marcador CD3 y se analizó si existían cambios tras la inyección de LPS en comparación con la inyección de suero salino. Un ANOVA de medidas repetidas reveló cambios diferenciales, ante la inyección de LPS, en dicha población en función de la exposición a LPS durante la gestación (**Tabla R2.8**). El análisis de los efectos simples evidenció que en las madres que nunca habían recibido una administración de LPS, se producía una disminución significativa de estos linfocitos, mientras que en las madres expuestas a LPS durante la gestación no existían diferencias significativas (**Figura R2.6A**). Es importante destacar que los análisis inter-sujeto de la administración de LPS durante la gestación no demostraron diferencias entre los porcentajes de linfocitos T causadas por la inyección. En el caso de los linfocitos B, no se observaron efectos causados por ninguna de las inyecciones de LPS (gestación o tras el destete de sus crías) (**Figura R2.6B**).

Sin embargo, en las células mieloides se encontró una leve tendencia a la disminución de esta población tras la inyección de LPS en todas las madres (**Tabla R2.8**). El análisis visual de los datos parece indicar que la disminución sería similar tanto en el grupo salino gestacional como en el de LPS gestacional (**Figura R2.6C**), aunque son necesarios más estudios para confirmar estos resultados.

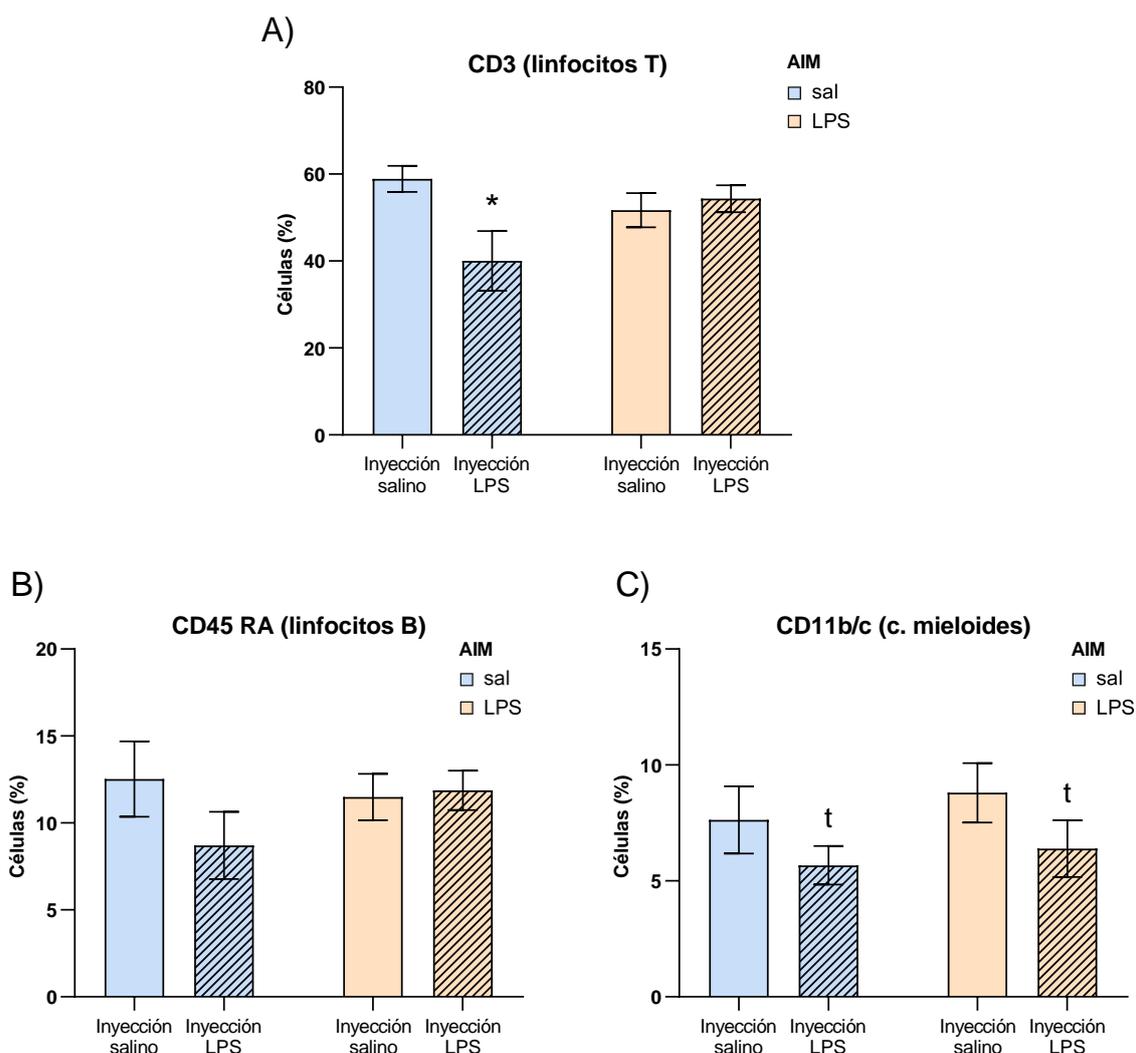


Figura R2.6. Respuesta inmune materna. A-C) Se representa el porcentaje de células marcadas con los anticuerpos CD3 (A), CD45RA (B) y CD11b/c (C) utilizados como marcadores de linfocitos T, B y células mieloides respectivamente. Los resultados se expresan como la media ± EEM. n = 8 animales * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto, # $p < 0,05$ efectos intra-sujeto. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto; “t” ($0,05 < p < 0,06$) tendencia.

Población	Efecto (ANOVA)	$F(gI_M, gI_R)$	Valor p	η^2_p
Linfocitos T	Respuesta*AIM	$F(1, 14) = 5,32$	0,037	0,275
	[AIM = LPS]*Respuesta	$F(1, 7) = 0,24$	0,641	-
Mieloides	[AIM = sal]*Respuesta	$F(1, 7) = 6,22$	0,041	0,470
	AIM	$F(1, 14) = 0,66$	0,432	-
Linfocitos B	Respuesta	$F(1, 14) = 4,24$	0,059	0,232
	AIM	$F(1, 14) = 0,49$	0,494	-
Linfocitos B	Respuesta	$F(1, 14) = 1,07$	0,319	-
	AIM	$F(1, 14) = 0,39$	0,541	-

Tabla R2.8. Estadísticos de la respuesta inmune materna. Se muestran los estadísticos de la prueba de respuesta inmune realizada a las madres tras el destete. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Factores intra-sujeto: Respuesta (sal/LPS). Factores inter-sujeto: AIM (sal/LPS).

2.3.2. La pérdida de peso durante el embarazo correlaciona con peores puntuaciones en las pruebas de comportamiento de la descendencia

Nuevamente, se analizaron posibles marcadores tempranos en las madres que pudieran predecir la gravedad de los déficits en la descendencia. Para ello se analizaron las correlaciones entre el índice de las crías, el de las madres y sus componentes. Debido a los resultados obtenidos en la citometría, se decidió añadir la disminución de linfocitos T como componente del índice de las madres.

Se observó una correlación positiva entre el índice de las crías y el cambio de peso en la madre tras la primera inyección de LPS (**Tabla R2.9**). Este resultado podría indicar que una mayor pérdida de peso durante la gestación correlaciona con peores puntuaciones en las pruebas de comportamiento realizadas.

Descendencia		IM	LCE	A. Loc.	Temp.	Peso	Linf.T
IC	Pearson	0,462	-0,098	-0,197	-0,059	0,713	0,331
	Valor p	0,249	0,817	0,640	0,889	0,047	0,423
	N	8	8	8	8	8	8

Tabla R2.9. Correlaciones entre los índices de las crías y los índices de las madres y sus componentes. Se recogen los estadísticos de las correlaciones realizadas entre los datos obtenidos en las pruebas de las madres y su descendencia. Para elaborar el índice de la descendencia se sumaron las puntuaciones normalizadas y multiplicadas por menos uno de las pruebas del laberinto en Y, laberinto de tres salas, PPI y preferencia por sacarosa. El índice de las madres se ha realizado un índice similar (con puntuaciones normalizadas) restando al peso el índice del LCE, la actividad locomotora y la mayor disminución de temperatura tras la primera inyección. IM: Índice madre. LCE: Laberinto en cruz elevado. A. Loc.: Actividad locomotora. Temp.: Temperatura. Linf.T: Linfocitos T.

2.4. Evaluación de la actividad cerebral

Con el fin de estudiar las posibles alteraciones cerebrales que pudieran explicar los cambios comportamentales observados, se llevó a cabo un estudio de tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission tomography*) en el DP60 (P1) y otro en el DP120 (P2) en animales que no habían realizado las pruebas conductuales.

El análisis de las RDI (regiones de interés), mostró en primer lugar un efecto general del paso del tiempo (efecto madurativo) en cuerpo estriado e hipotálamo que consistía en una disminución de la captación relativa de ^{18}F -FDG (de ahora en adelante CRF) en el segundo PET y un incremento en el caso del hipotálamo (**Figura R2.7A,D-E** y **Tabla R2.10**). Los análisis también revelaron un efecto del sexo en corteza, cerebro anterior basal (CAB) y cuerpo estriado (**Figura R2.7A-C**). En las dos primeras se observó una disminución de la CRF de las hembras en comparación con los machos, aunque solo en P1 (**Tabla R2.10**). Sin embargo, en cuerpo estriado, esta disminución de CRF en las hembras se apreció tanto en P1 como en P2. En cuanto al LPS, se observaron efectos en corteza, CAB e hipotálamo. En corteza y CAB, los animales LPS tuvieron disminuyeron la CRF en P2. En cambio, en hipotálamo, se apreció, solo en P1, un descenso de la actividad de las hembras LPS en comparación con las

hembras salino. Por otro lado, en corteza al comparar la CRF en ambos PET se observó una disminución de CRF en el segundo PET de los animales vehículo. Es importante destacar que este efecto no se produjo en los animales THC.

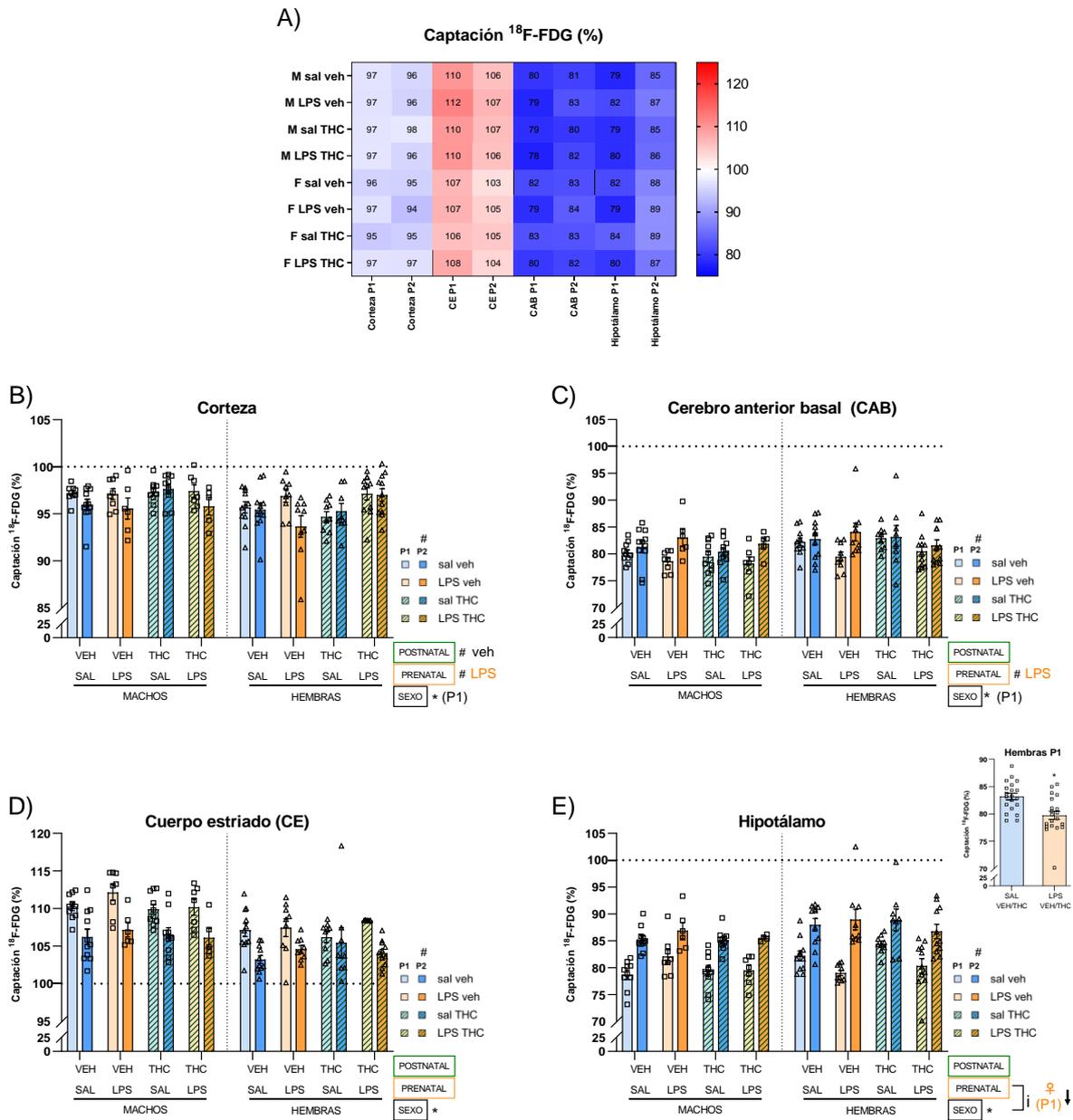


Figura R2.7. Actividad cerebral en las regiones más anteriores. A) Mapa de calor que expresa la captación relativa de ^{18}F -FDG en los dos PET realizados (P1 y P2) en corteza, cerebro anterior basal (CAB), cuerpo estriado (CE) e hipotálamo. Los resultados se expresan como la media del porcentaje respecto a cerebro completo. B-E) Representación gráfica de las captaciones relativas de ^{18}F -FDG en cada región. Las interacciones se señalan mediante un corchete y se acompañan de una gráfica simplificada de la interacción. Los resultados se expresan como la media del porcentaje respecto a cerebro completo \pm mín. máx. n en **tabla R2.11**. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto; # $p < 0,05$ efectos intra-sujeto (P1 vs P2).

Región	Efecto (ANOVA)	F(glm, glr)	Valor p	η^2_p
Corteza	Tiempo	$F(1, 61) = 6,82$	0,011	0,101
	Tiempo*AIM	$F(1, 61) = 4,75$	0,033	0,072
	Tiempo*[AIM = LPS]	$F(1, 30) = 8,18$	0,008	0,214
	Tiempo*Postnatal	$F(1, 61) = 4,84$	0,032	0,073
	Tiempo*[Postnatal = veh]	$F(1, 34) = 8,90$	0,005	0,207
	Sexo (M vs H)	$F(1, 61) = 6,02$	0,017	0,09
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	$F(1, 72) = 7,01$	0,01	0,09
[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	$F(1, 72) = 2,58$	0,113	-	
Cerebro anterior basal	Tiempo	$F(1, 62) = 12,63$	0,001	0,169
	Tiempo*AIM	$F(1, 62) = 4,22$	0,044	0,064
	Tiempo*[AIM = LPS]	$F(1, 30) = 13,07$	0,001	0,304
	Sexo (M vs H)	$F(1, 62) = 7,90$	0,007	0,113
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	$F(1, 73) = 10,44$	0,002	0,125
[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	$F(1, 69) = 2,23$	0,14	-	
Cuerpo estriado	Tiempo	$F(1, 57) = 45,14$	0,000	0,442
	Sexo (M vs H)	$F(1, 57) = 35,85$	0,000	0,386
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	$F(1, 68) = 30,76$	0,000	0,311
	[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	$F(1, 69) = 10,67$	0,002	0,134
Hipotálamo	Tiempo	$F(1, 60) = 91,01$	0,000	0,603
	Sexo (M vs H)	$F(1, 60) = 7,09$	0,01	0,106
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	$F(1, 73) = 4,26$	0,042	0,055
	[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	$F(1, 67) = 6,60$	0,012	0,09
	Sexo*AIM (InterS)	$F(1, 60) = 7,85$	0,007	0,116
	[Tiempo = P1] Sexo*AIM (M vs H)	$F(1, 67) = 14,07$	0,000	0,174
	[Tiempo = P1] [Sexo = M]*AIM (sal vs LPS)	$F(1, 71) = 2,99$	0,088	-
	[Tiempo = P1] [Sexo = H]*AIM (sal vs LPS)	$F(1, 71) = 12,16$	0,001	0,146
[Tiempo = P2] Sexo*AIM (InterS)	$F(1, 61) = 0,60$	0,442	-	

Tabla R2.10. Estadísticos de la actividad cerebral en las regiones más anteriores. Se muestran los principales valores estadísticos de los efectos en la actividad de corteza, cerebro anterior basal, cuerpo estriado e hipotálamo. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Los efectos inter-sujeto se presentan en cursiva seguidos de “(InterS)” o la comparación específica (p. ej.: M vs H). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). Factores intra-sujeto: Tiempo (P1/P2). M = Machos. H = Hembras.

Grupo	C	CAB	CE	HT	Col	CM	Puente	BR	Cb
M sal veh	9	10	10	9	10	10	10	9	10
M LPS veh	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M sal THC	10	10	10	10	9	10	10	10	10
M LPS THC	5	5	5	4	3	5	4	5	5
H sal veh	11	11	11	11	11	11	11	11	11
H LPS veh	9	9	9	9	9	6	8	9	9
H sal THC	8	8	8	8	7	8	8	8	8
H LPS THC	11	11	6	11	11	11	11	11	11

Tabla R2.11. Número de animales utilizados en la estadística de las pruebas de PET. Se muestran el número final de animales por grupo, tras eliminar valores atípicos, que se utilizaron en los estudios tomografía por emisión de positrones. C: Corteza. CAB: Cerebro anterior basal. CE: Cuerpo estriado. HT: Hipotálamo. Col: Colículos. CM: Cerebro medio. BR: Bulbo raquídeo. Cb: Cerebelo.

El análisis de las RDI más posteriores mostró un efecto inter-sujeto general del sexo en los colículos, puente, bulbo raquídeo y cerebelo (**Tabla R2.12**). Sin embargo, al contrario que en las regiones anteriores, en este caso se apreció un aumento de la CRF en las hembras en comparación con los machos (**Figura R2.8A-B,D-F**). Además, en el caso del bulbo raquídeo, se apreció en los efectos intra-sujeto del sexo una fuerte tendencia ($p = 0,05$) causada por el aumento de CRF en P2, tanto en machos como

en hembras. También se observó, en puente y cerebelo, un incremento en la CRF de P2 en todos los grupos respecto a P1. Por otro lado, el LPS tuvo efectos en los colículos y en el cerebro medio (**Figura R2.8A,C**). En los colículos se observó una disminución de la CRF en los animales LPS, en comparación con los salino, pero solo en P1. En cerebro medio, también se observó esta disminución de la actividad relativa en P1 causada por el LPS, pero solo en las hembras. Sin embargo, en estas regiones no se encontraron efectos significativos causados por el THC.

En línea con los resultados anteriores, los análisis preliminares de SPM mostraron en los machos una mayor activación en regiones anteriores y menor en las posteriores en comparación con las hembras (**Anexo: Figura A1**). El LPS, a rasgos generales provocó importantes hipoactivaciones, mayoritariamente en P1, en algunas zonas de cerebelo, bulbo raquídeo, cerebro medio y colículos (**Anexo: Figura A2**). También se observaron hiperactivaciones, en el primer PET, en algunas zonas de corteza frontal, putamen y cuerpo calloso que desaparecen en P2. Respecto al THC, se observaron efectos notablemente menores y más repartidos (**Anexo: Figura A3**). En P1, se observan hipoactivaciones en zonas del tálamo, hipocampo y amígdala. Sin embargo, en P2 se observan pequeñas zonas hipoactivadas en regiones más posteriores como cerebelo y bulbo raquídeo. En cambio, las hiperactivaciones causadas por el THC siguieron el patrón opuesto. Mientras que en P1 se observaron pequeñas hiperactivaciones en zonas de regiones posteriores como hipocampo o corteza posterior; en P2 se encontraron en núcleos de corteza anterior y en zonas del hipocampo lateral izquierdo. No obstante, los análisis del SPM son preliminares y aún no se han analizado las interacciones entre los factores por lo que estos datos deben ser tomados con cautela.

Estos resultados ponen de manifiesto la durabilidad de los efectos que la AIM es capaz de producir, como los descensos en la actividad relativa de regiones tan importantes como el cerebro anterior, cerebro medio o hipotálamo incluso en la vida adulta del individuo. En cambio, el THC apenas produjo cambios en la actividad relativa a largo plazo ni por sí solo ni en combinación con la AIM por lo que estos datos no apoyan la hipótesis de sinergia entre ambos impactos.

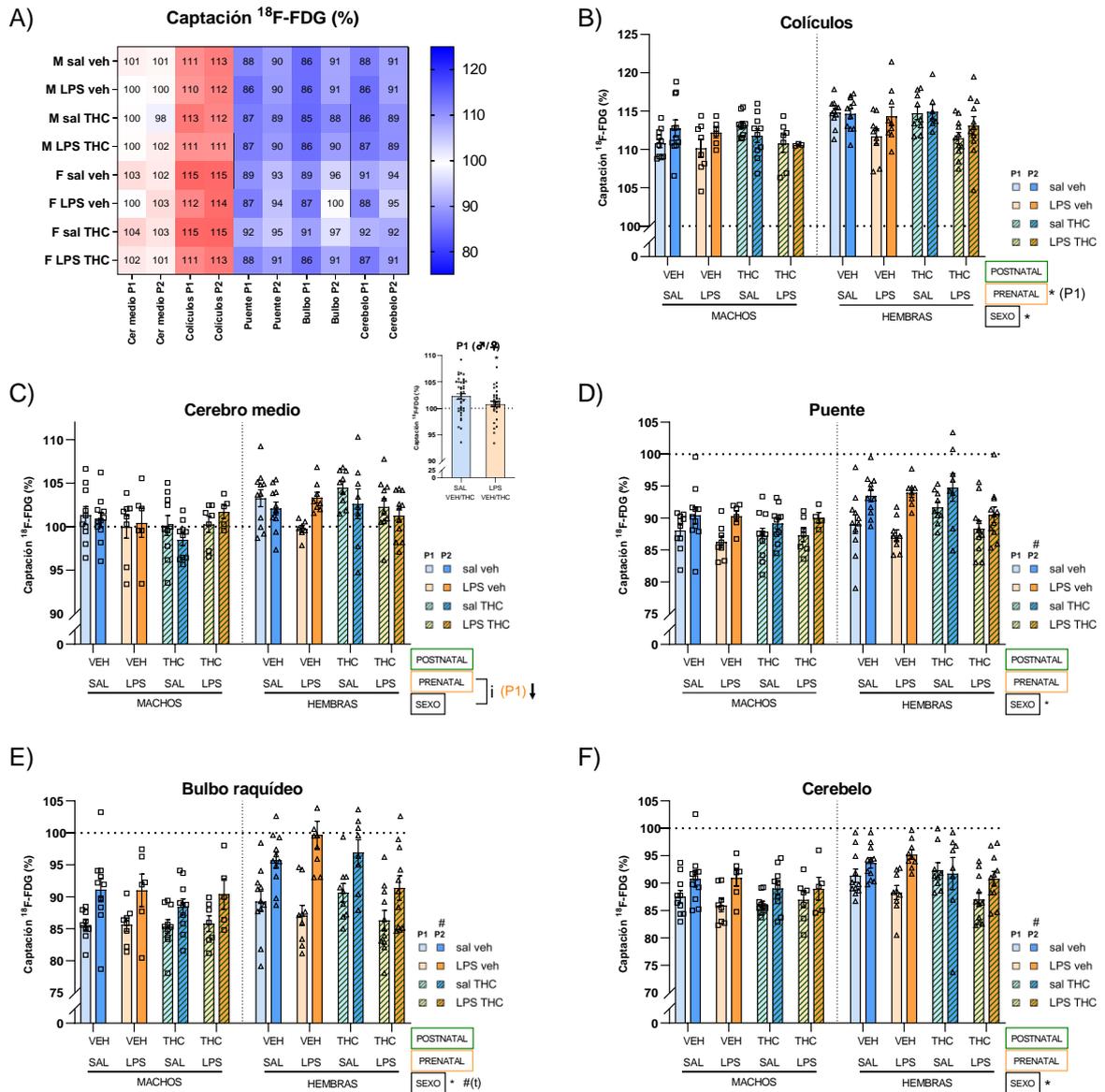


Figura R2.8. Actividad cerebral en las regiones más posteriores. A) Mapa de calor que expresa la captación relativa de ^{18}F -FDG en los dos PET realizados (P1 y P2) en cerebro medio, colículos, puente, bulbo raquídeo y cerebelo. Los resultados se expresan como la media del porcentaje respecto a cerebro completo. B-F) Gráficos de las captaciones relativas de ^{18}F -FDG en cada región. Las interacciones se señalan mediante un corchete y se acompañan de una gráfica simplificada de la interacción. Los resultados se expresan como la media del porcentaje respecto a cerebro completo \pm EEM. * $p < 0,05$ efectos inter-sujeto; # $p < 0,05$ efectos intra-sujeto (P1 vs P2); "t" ($0,05 < p < 0,06$) tendencia.

Región	Efecto (ANOVA)	F(g _{lm} , g _{lR})	Valor p	η ² _p
Colículos	Sexo (M vs H)	F(1, 58) = 14,56	0,000	0,201
	AIM (sal vs LPS)	F(1, 58) = 8,12	0,006	0,123
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	F(1, 70) = 12,06	0,001	0,147
	[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	F(1, 64) = 8,31	0,005	0,115
	[Tiempo = P1] AIM (sal vs LPS)	F(1, 70) = 16,80	0,000	0,194
	[Tiempo = P2] AIM (sal vs LPS)	F(1, 64) = 1,26	0,266	-
Cerebro medio	Sexo (M vs H)	F(1, 59) = 10,19	0,002	0,147
	Sexo*AIM (InterS)	F(1, 59) = 4,68	0,035	0,073
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	F(1, 65) = 8,20	0,006	0,112
	[Tiempo = P1] AIM (sal vs LPS)	F(1, 65) = 6,00	0,017	0,084
	[Tiempo = P1] Sexo*AIM (InterS)	F(1, 65) = 2,57	0,114	-
	[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	F(1, 62) = 7,50	0,008	0,108
	[Tiempo = P2] AIM (sal vs LPS)	F(1, 62) = 0,91	0,345	-
	[Tiempo = P2] Sexo*AIM	F(1, 62) = 1,04	0,312	-
Puente	Tiempo	F(1, 60) = 37,69	0,000	0,386
	Sexo (M vs H)	F(1, 60) = 10,60	0,002	0,15
	[Tiempo = P1]*Sexo (M vs H)	F(1, 73) = 4,75	0,033	0,061
	[Tiempo = P2]*Sexo (M vs H)	F(1, 67) = 11,19	0,000	0,143
Bulbo raquídeo	Tiempo	F(1, 61) = 63,39	0,000	0,510
	Tiempo*Sexo	F(1, 61) = 3,99	0,050	0,061
	Tiempo*[Sexo = M]	F(1, 29) = 18,91	0,000	0,395
	Tiempo*[Sexo = H]	F(1, 38) = 47,35	0,000	0,555
	Sexo (M vs H)	F(1, 61) = 18,30	0,000	0,231
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	F(1, 72) = 7,51	0,008	0,094
	[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	F(1, 69) = 15,86	0,000	0,187
Cerebelo	Tiempo	F(1, 62) = 16,07	0,000	0,206
	Sexo (M vs H)	F(1, 62) = 19,02	0,000	0,235
	[Tiempo = P1] Sexo (M vs H)	F(1, 73) = 11,51	0,001	0,136
	[Tiempo = P2] Sexo (M vs H)	F(1, 69) = 6,66	0,012	0,088

Tabla R2.12. Estadísticos de la actividad cerebral las regiones más posteriores. Se recogen los principales valores estadísticos de los efectos en la actividad de los colículos, cerebro medio, puente, bulbo raquídeo y cerebelo. Las interacciones se expresan con “*” entre los factores correspondientes y, en los efectos simples, el grupo analizado aparece entre corchetes. Los efectos inter-sujeto se presentan con el nombre del factor en solitario (Ej: Sexo). Factores inter-sujeto: Sexo (M/H), AIM (sal/LPS), Postnatal (veh/THC). Factores intra-sujeto: Tiempo (P1/P2) M = Machos. H = Hembras.

2.5. RNAseq PBMC

En primer lugar, las concentraciones y los números de integridad del ARN (RIN, del inglés RNA *integrity number*) de las muestras de PBMC fueron analizados por la Unidad de Genómica la Fundación Parque Científico de Madrid (**Tabla R2.13**). Las muestras con un RIN inferior a 7,8 no se consideraron viables.

Grupo	Muestra	Código	ng/μL	28S/18S	RIN
M sal veh	M77	0	16	1,6	9
	M79	1	18	1,2	8,6
	M85	2	29	1,3	7,9
M LPS veh	M68	0	16	1,6	7,8
	M98	1	16	1,5	8,8
	M100	2	29	2,2	8,5
M sal THC	M76	0	26	1,6	8,1
	M91	1	33	1,4	8,1
	M93	2	24	1,9	9,1
M LPS THC	M60	0	46	2,3	8
	M63	1	59	1,6	7,9
	M64	2	55	1,8	9,1
H sal veh	F71	0	23	1,1	8,4
	F80	1	22	1,7	8,5
	F91	2	14	1,8	9,4
H LPS veh	F69	0	14	1,4	7,8
	F103	1	33	1,3	8,2
	F104	2	15	1,3	8,9
H sal THC	F78	0	11	1,4	8,1
	F83	1	15	1,5	9,7
	F94	2	40	2	8,2
H LPS THC	F67	0	7	1,5	8,8
	F68	1	33	1,9	8,8
	F96	2	10	1,7	8,4

Tabla R2.13. Integridad y concentración de ARN en las muestras de PBMC. Se recogen los valores de concentraciones y ratios (como RIN y 28S/18S) que indican la calidad de las muestras de las células mononucleares de sangre periférica.

El análisis de expresión diferencial reveló, en machos, un total de 388 genes diferencialmente expresados (DE) (p ajustado $< 0,05$) a causa de la AIM, la mayoría de ellos a la baja (**Figura R2.9**). De manera similar, el THC provocó un mayor número de genes DE (603), manteniendo también una proporción mayoritaria de genes regulados a la baja. La combinación de ambos impactos elevó el número total de genes DE hasta 687 pero manteniendo también la proporción mayoritaria de genes regulados a la baja. Al analizar la distribución de los genes DE, el THC demostró tener un mayor peso que la AIM ya que tan solo el 5,7% de los genes se ven alterados exclusivamente por el LPS, mientras que el 23,2% es a causa del THC (**Figura R2.10A**). Un 26,4% solo aparecen DE en presencia de los dos impactos.

Cuando se comparó el efecto de los dos impactos con el efecto de la AIM, se apreció un menor número de genes DE (110) que cualquiera de los dos impactos tanto separados como en combinación. Cabe destacar que en este caso se observó una proporción similar de genes regulados a la baja y al alza. De manera similar, al comparar la combinación de los dos impactos con el efecto del THC se obtuvo un

número de genes DE menor (121) que las dos condiciones tanto separadas como combinadas, aunque en este caso sí que se mantuvo la proporción mayoritaria de genes regulados a la baja. En cuanto a las distribuciones, al comparar cada uno de los impactos con la combinación, el LPS alteró un 37% de los genes, el THC un 42,7% y el 20,3% restante fue compartido entre ambas comparaciones.

En el caso de las hembras, se observó en primer lugar un número de genes regulados al alza muy superior a los regulados a la baja en todos los casos excepto en el de AIM (**Figura R2.9**). En este caso se apreció que el número de genes afectados por LPS (15) fue muy inferior a cualquier condición, incluidas las de los machos. Por otro lado, el THC produjo en las hembras un número de genes DE casi diez veces superior al producido por la AIM (148). Además, al contrario de lo sucedido en los machos, en la mayoría de estos genes se observó una regulación al alza. La combinación de ambos impactos, al igual que en los machos, aumentó las alteraciones transcriptómicas incrementando los genes DE hasta 319. Sin embargo, en este caso, un 61% de los genes solo resultaron alterados por la combinación de impactos, demostrando un importante efecto sinérgico (**Figura R2.10B**).

Al comparar los efectos combinados de ambos impactos con los efectos de uno solo, se apreció que, respecto a LPS, hubo un total de 252 genes DE, la gran mayoría de ellos al alza. Realizando esta misma comparación el THC se observó un número menor de genes DE (107) siendo también la mayoría regulados al alza.

Estos resultados parecen indicar diferencias importantes en función del sexo, como la dirección general de la expresión diferencial, la menor potencia de los efectos en las hembras y la ausencia de efectos sinérgicos en los machos.

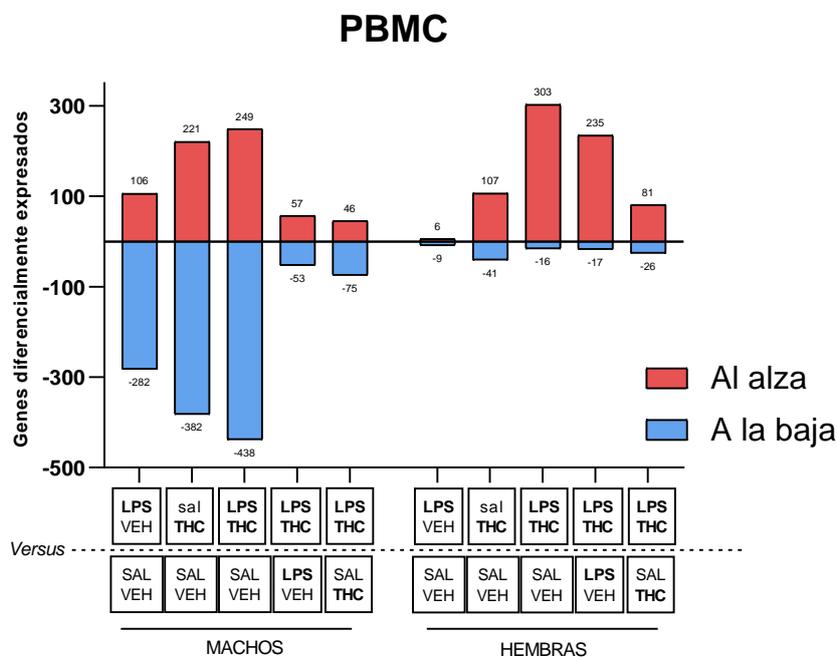
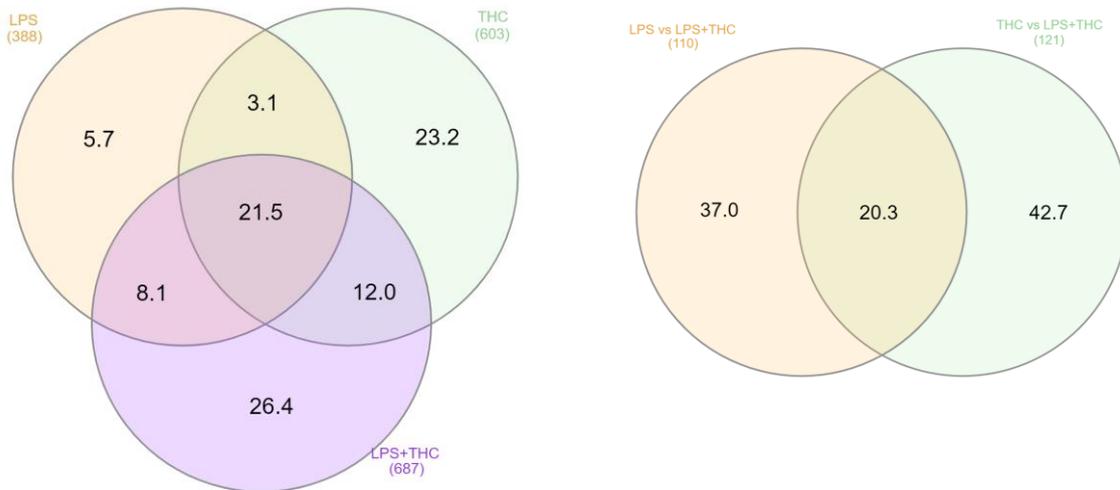


Figura R2.9. Número de genes diferencialmente expresados en las PBMC. Se representa el número de genes diferencialmente expresados en cada una de las comparaciones realizadas entre grupos.

A) PBMC MACHOS



B) PBMC HEMBRAS

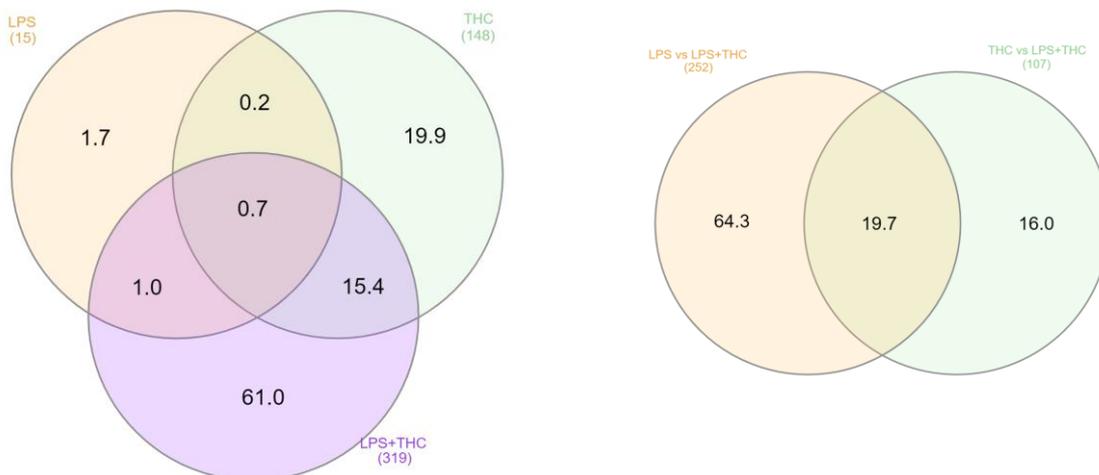


Figura R2.10. Distribución de los genes diferencialmente expresados en las PBMC en función del impacto. A) y B) *Izquierda:* Se representan en un diagrama de Venn los porcentajes de genes diferencialmente (DE) expresados al comparar los grupos LPS veh (amarillo), sal THC (verde) y LPS THC (lila) con sal veh. A) y B) *Derecha:* Se representa la distribución de genes DE al comparar el grupo LPS THC con LPS veh (amarillo) y sal THC (verde). Junto al grupo comparado se muestra el número total de genes DE. Realizada con InteractiVenn (Heberle et al., 2015).

Con el fin de obtener una visión global de las alteraciones transcriptómicas que se están produciendo en cada uno de los grupos, se llevó a cabo un análisis de ontologías de todos los genes diferencialmente expresados.

En el caso del efecto del LPS en machos se observó en los genes DE un enriquecimiento en ontologías relacionadas con la activación celular y la respuesta inmune como las resaltadas en la **Figura R2.11A-B**. La mayoría de los genes pertenecientes a estas ontologías mostraron una regulación a la baja, apuntando hacia alteraciones en la actividad basal de las PBMC y en la respuesta inmune

(Figura R2.11C). A pesar de esta regulación general a la baja, también se observa una importante regulación al alza en algunos genes como *Cxcl2* y *Cxcl10* relacionados con la activación de quimioquinas (Figura R2.11D). También se aprecian regulaciones al alza en distintos tipos de receptores tipo Toll como *Tlr13*, *Tlr7* y *Tlr8*; una familia muy relacionada con la respuesta a LPS.

El THC provocó, al igual que el LPS, diferencias de expresión en genes pertenecientes a ontologías relacionadas con la respuesta inmune y la activación celular (Figura R2.12A-B). De la misma manera, en las ontologías resaltadas predomina una regulación de los genes a la baja siguiendo la tendencia de los resultados globales (Figura R2.12C). Sorprendentemente, tras la administración de THC también se observó una regulación al alza de receptores de la familia Toll como *Tlr7* y *Tlr8* de manera similar a lo ocurrido en la AIM (Figura R2.12D). La combinación de ambos impactos provocó alteraciones en genes pertenecientes a ontologías similares a las de los impactos por separado como activación celular, respuesta inmune y respuesta a virus o lipopolisacárido (Figura R2.13A-B). Se mantiene también la regulación a la baja de los genes que componen las ontologías resaltadas (Figura R2.13C). Sin embargo, al analizar el número de fragmentos normalizados de cada muestra, los receptores Toll dejan de estar entre los 25 genes más regulados al alza llegando incluso a muestras en las que no se encontró ningún fragmento como el caso de *Tlr8* en MLPSTHC_2 (Figura R2.13D).

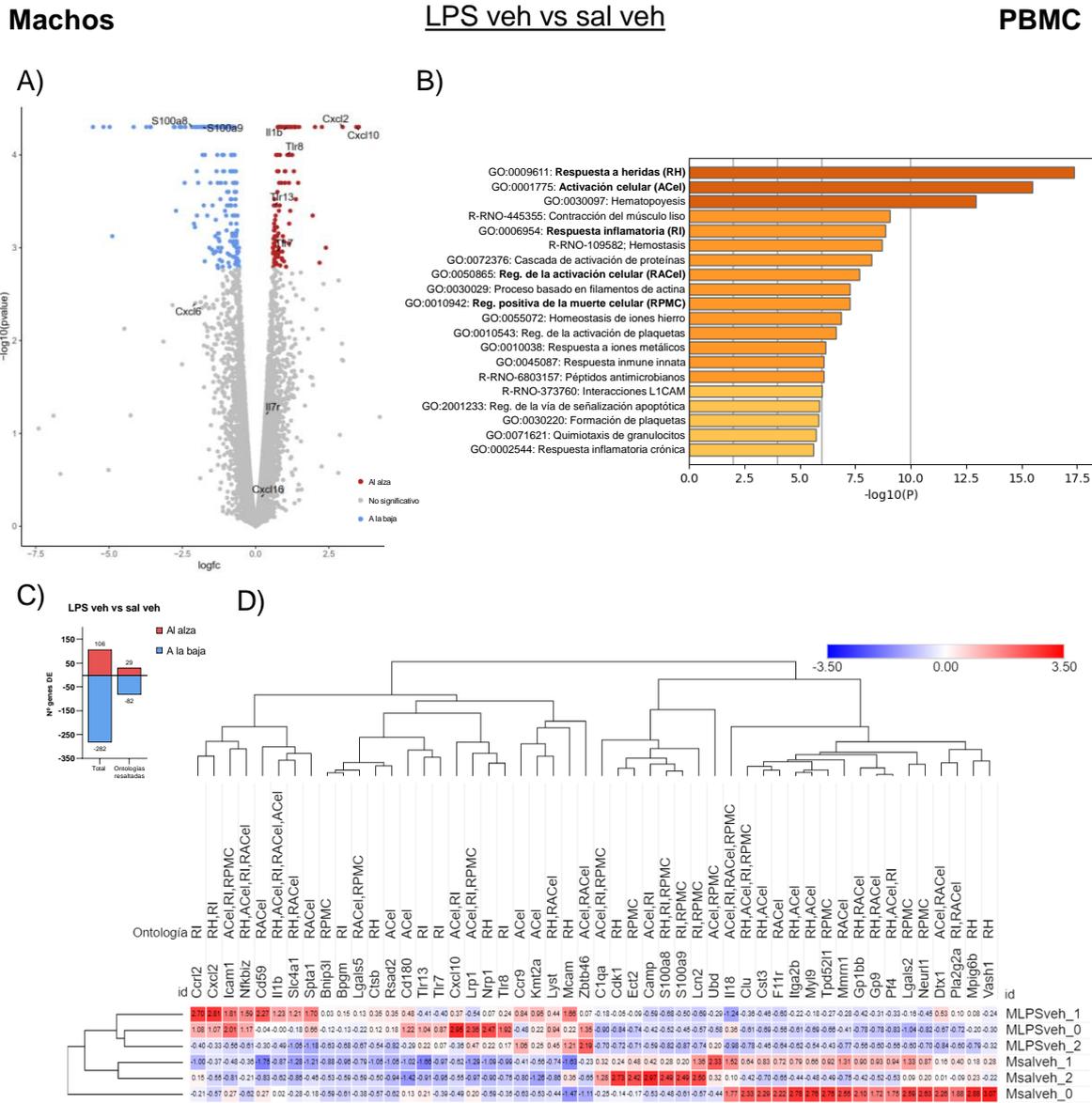


Figura R2.11. Efecto de la AIM en PBMC de los machos. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor *p* sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor *p* ajustado < 0,05). Se destacan genes de la familia *Tlr*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas con mayores FC en la comparación entre grupos hasta un máximo de 25 y los genes con menor FC (siempre negativo) también hasta un máximo de 25.

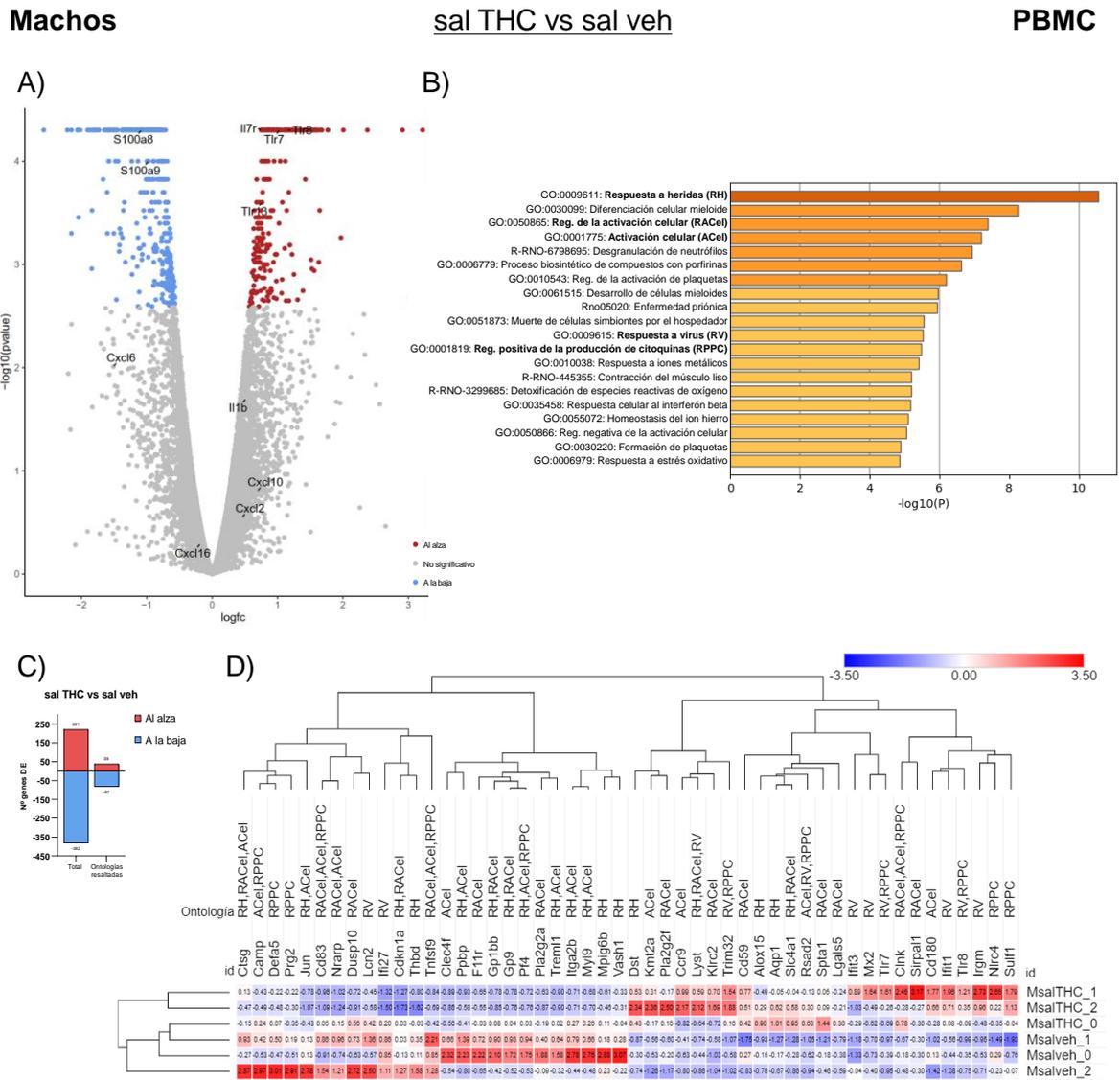


Figura R2.12. Efecto del THC en PBMC de los machos. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *Tlr*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas con mayores FC en la comparación entre grupos hasta un máximo de 25 y los genes con menor FC (siempre negativo) también hasta un máximo de 25.

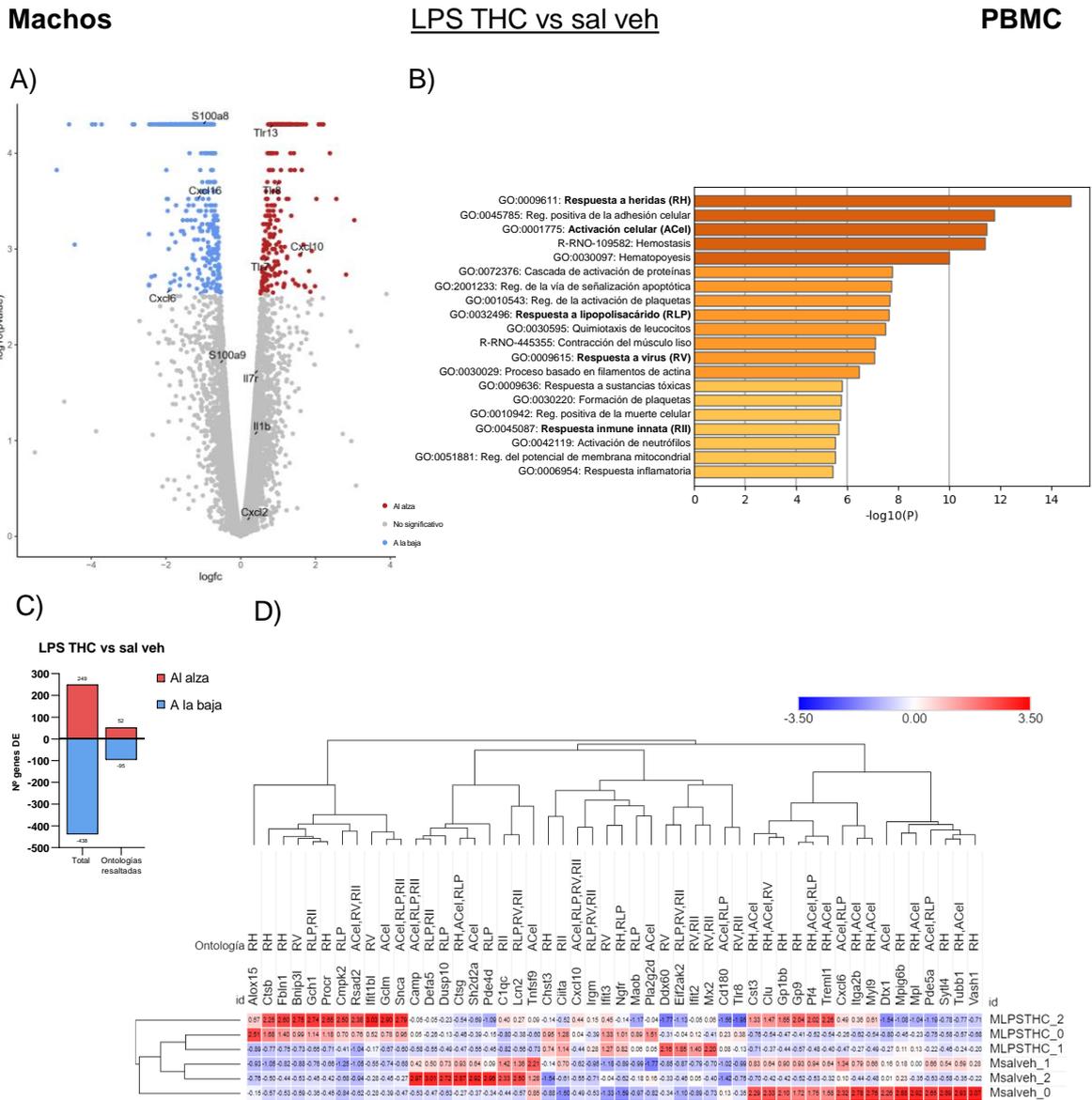


Figura R2.13. Efecto de los dos impactos en PBMC de los machos. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *Tlr*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas con mayores FC en la comparación entre grupos hasta un máximo de 25 y los genes con menor FC (siempre negativo) también hasta un máximo de 25.

La comparación entre la combinación de los dos impactos y los impactos por separado reflejó una cantidad notablemente menor de genes DE como era de esperar. Además, en las ontologías relacionadas con la inflamación y la activación de

leucocitos se apreció una mayoría de genes regulados a la baja cuando estaban presentes los dos impactos (**Figura R2.14A-D**). En la comparación de los dos impactos con el THC se apreciaron resultados similares como un menor número de genes DE (**Figura R2.15A-C**). En cuanto a las ontologías se observan diversos genes relacionados con la respuesta a lipopolisacárido y el ciclo vital vírico regulados a la baja (**Figura R2.15D**).

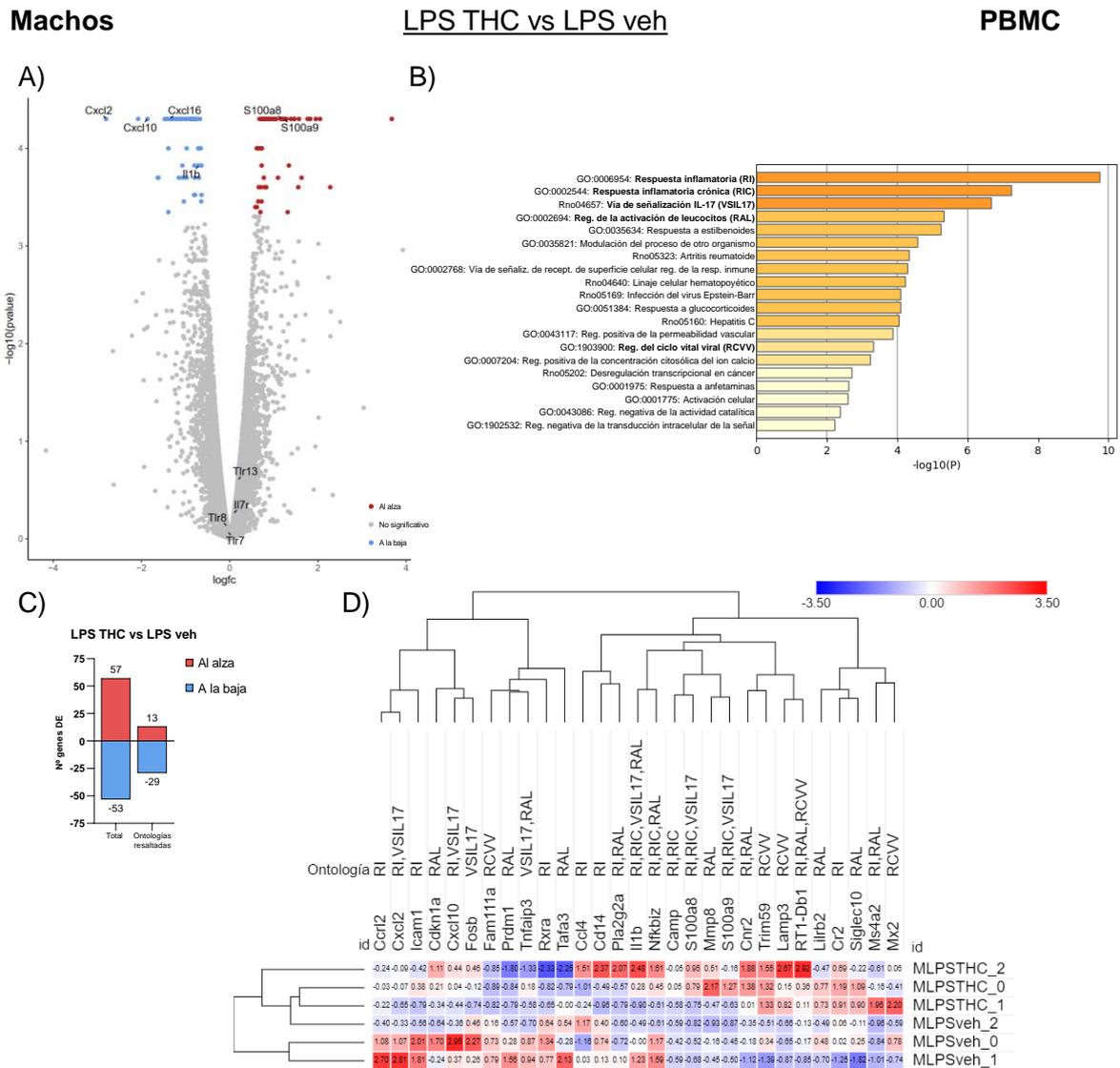


Figura R2.14. Efecto de los dos impactos versus AIM en PBMC de los machos. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *Tlr*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada

En las hembras, en contra de lo esperado, la AIM apenas provocó efectos en las PBMC alterando la expresión de tan solo 15 genes (**Figura R2.16A**). La inspección visual de las ontologías no reveló una direccionalidad clara de la expresión de los genes debido, posiblemente, al pequeño número de genes alterados (**Figura R2.16B-D**).

En cambio, el THC sí provocó cambios notables alterando la expresión de 148 genes, de los cuales 107 fueron regulados al alza. Entre las ontologías a las que pertenecen estos genes, destacaron las relacionadas con la respuesta a polisacárido, producción de citoquinas como interferón u homeostasis celular (**Figura R2.17A-C**). La regulación al alza general de estas ontologías podría estar indicando un aumento en el número y la funcionalidad de las PBMC, pero también una menor producción de citoquinas como el interferón tipo I (**Figura R2.17D**).

Al combinar los dos impactos, se apreció un efecto sinérgico en el número de genes DE, llegando hasta los 329 (**Figura R2.18A**). Se observó una regulación general al alza en las ontologías relacionadas con la presentación de antígenos, proliferación de linfocitos y la traducción (**Figura R2.18B-D**).

Estos datos podrían estar revelando un potente efecto sinérgico, ya que la combinación de ambos efectos multiplicó por más de 2 el número de genes cuya expresión fue alterada. Al comparar la combinación de los dos impactos con el efecto de la AIM se apreció un notable y esperado aumento en el número de genes DE, siendo la mayoría regulados al alza (**Figura R2.19A-C**). Entre las ontologías destacan la regulación al alza de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria y la respuesta a hormonas (**Figura R2.19D**). De la misma manera, cuando se compararon la combinación de los dos impactos con el THC se observó un aumento, notablemente superior al de AIM de manera aislada, de las alteraciones transcriptómicas apoyando la hipótesis de efectos sinérgicos (**Figura R2.20**).

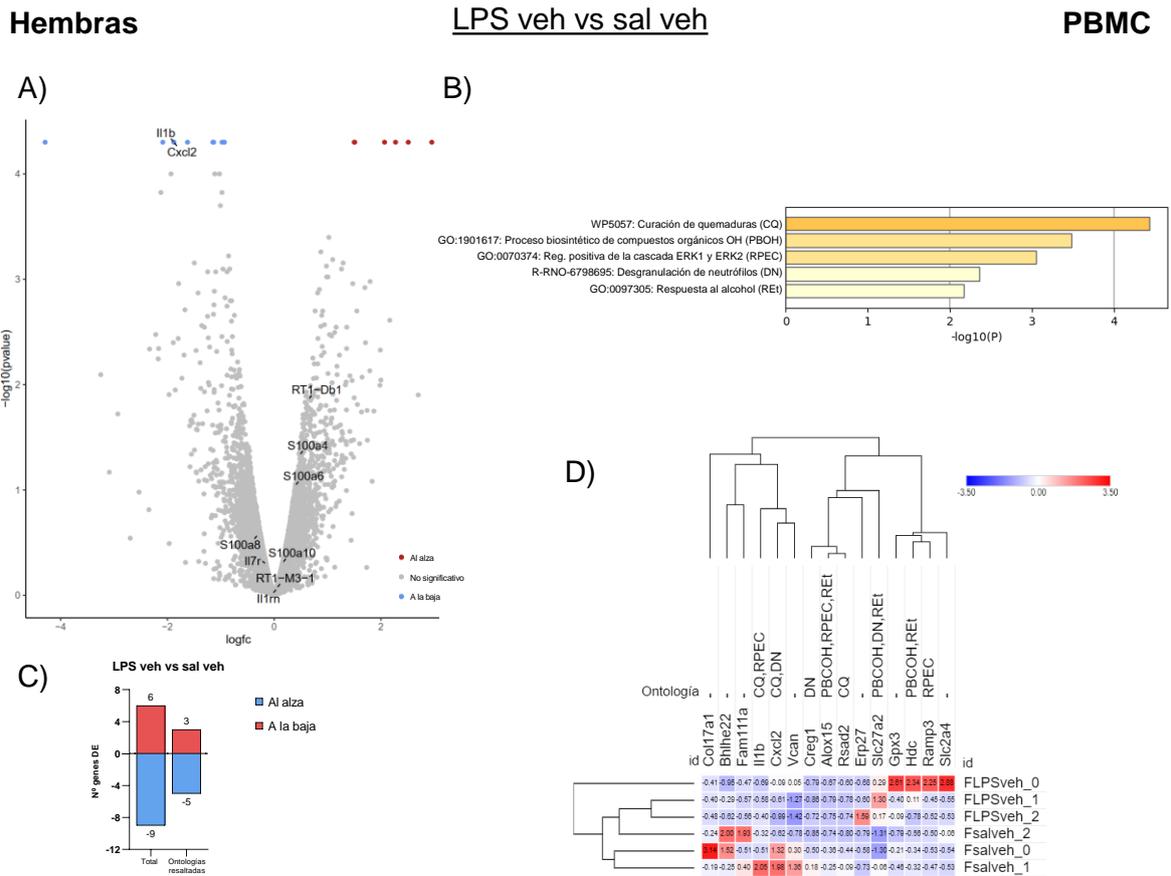


Figura R2.16. Efecto de AIM en PBMC de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *RT1*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

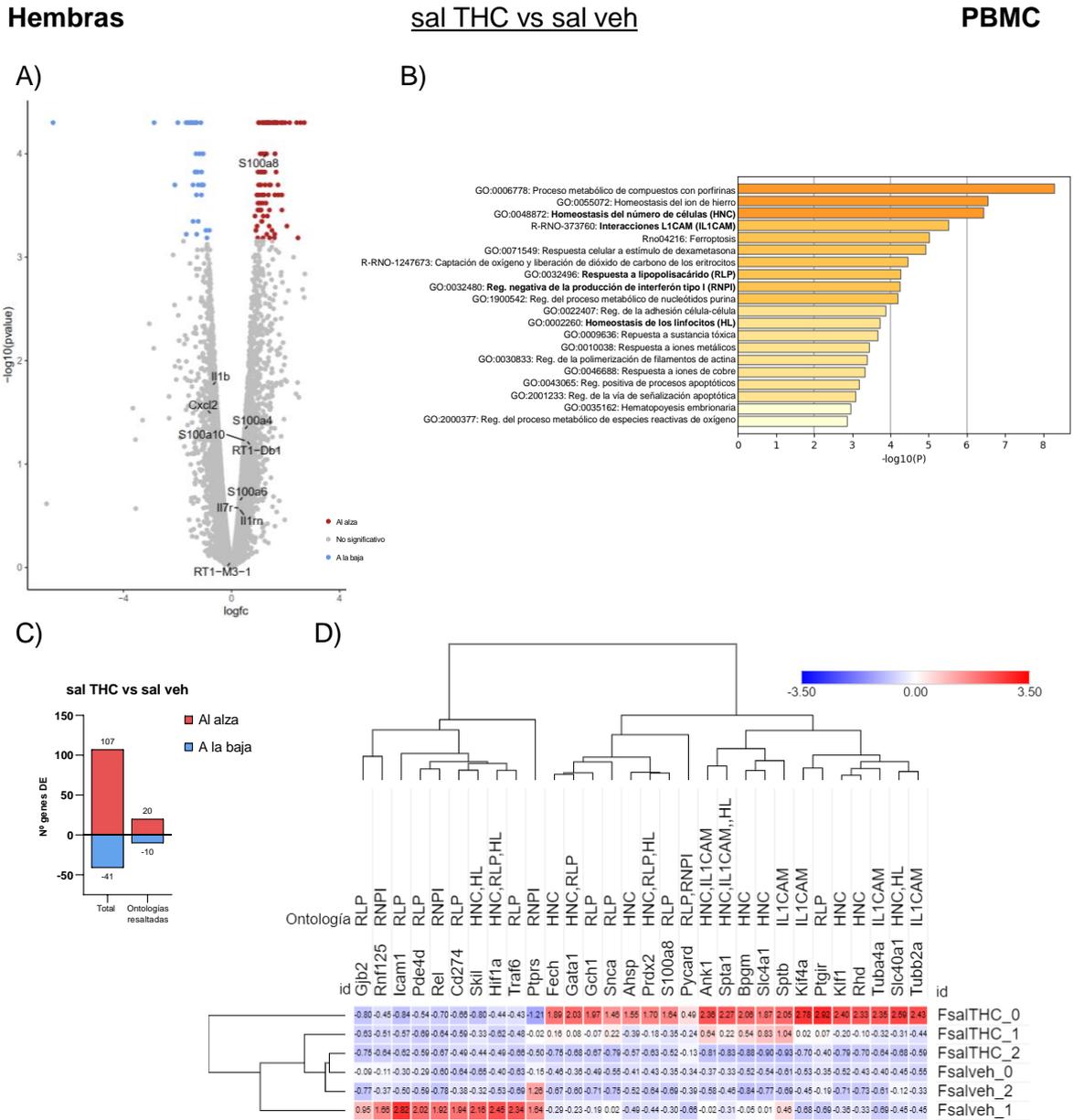


Figura R2.17. Efecto del THC en PBMC de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *RT1*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

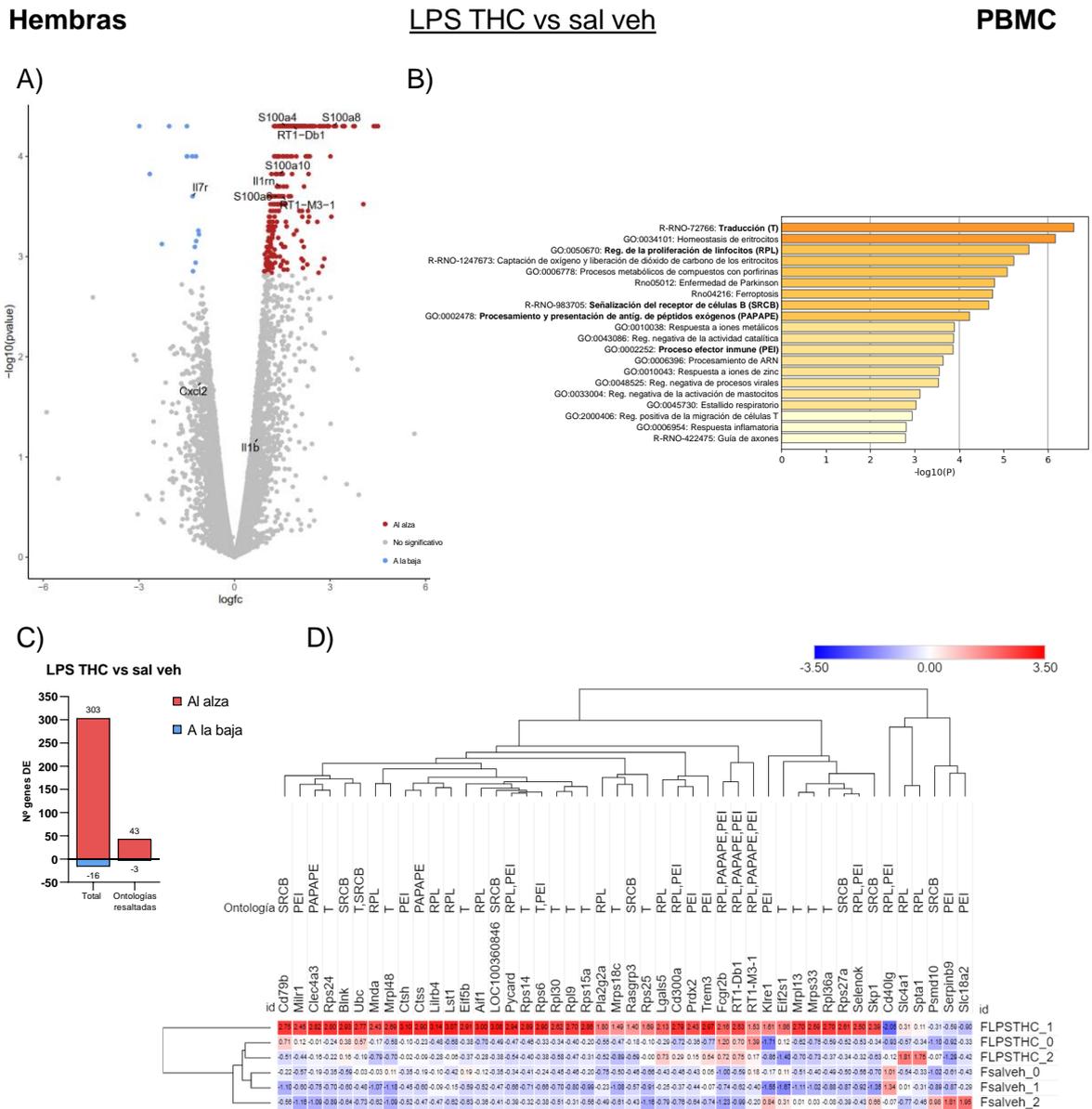


Figura R2.18. Efecto de los dos impactos en PBMC de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *RT1*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

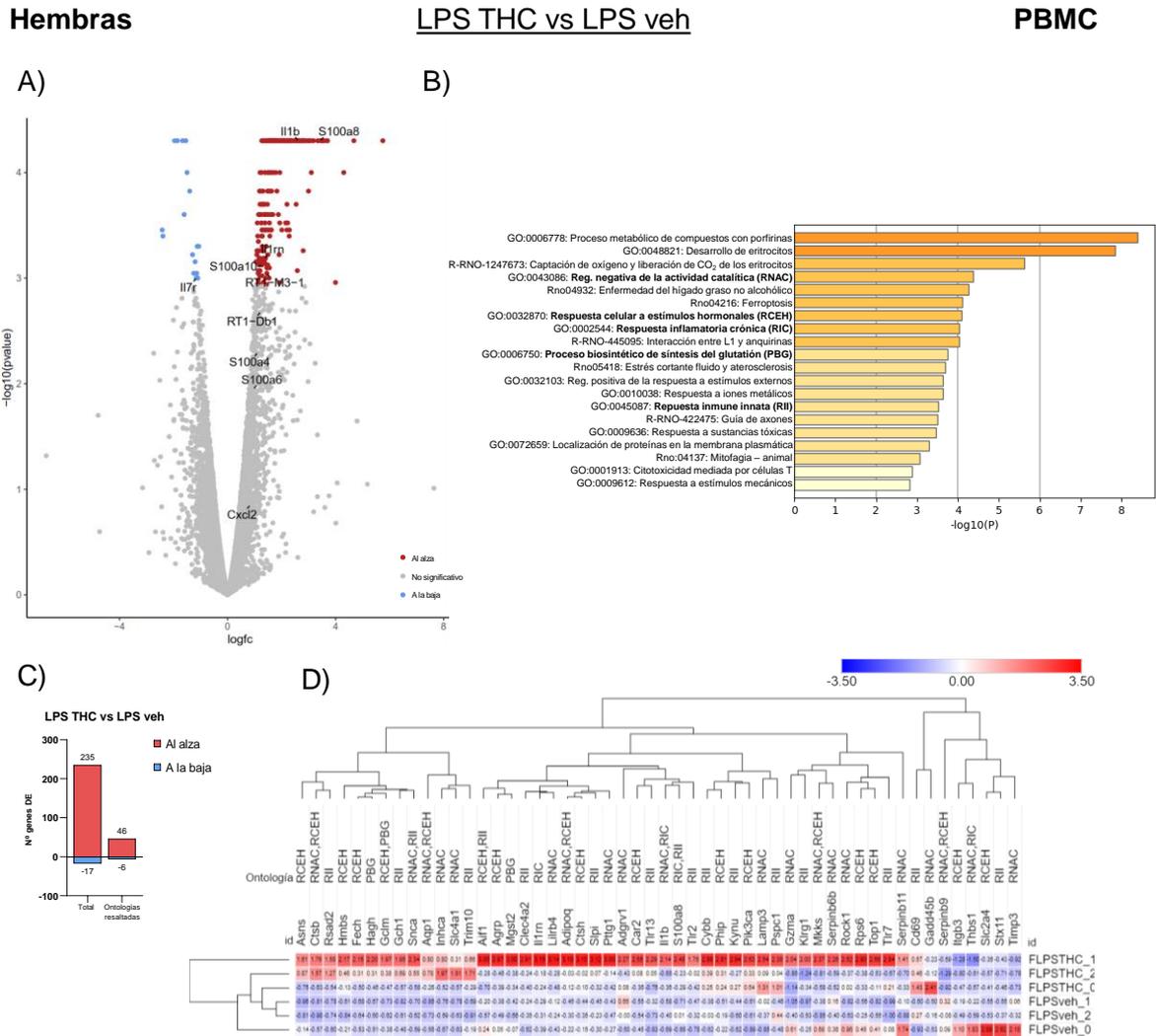


Figura R2.19. Efecto de los dos impactos versus AIM en PBMC de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *RT1*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

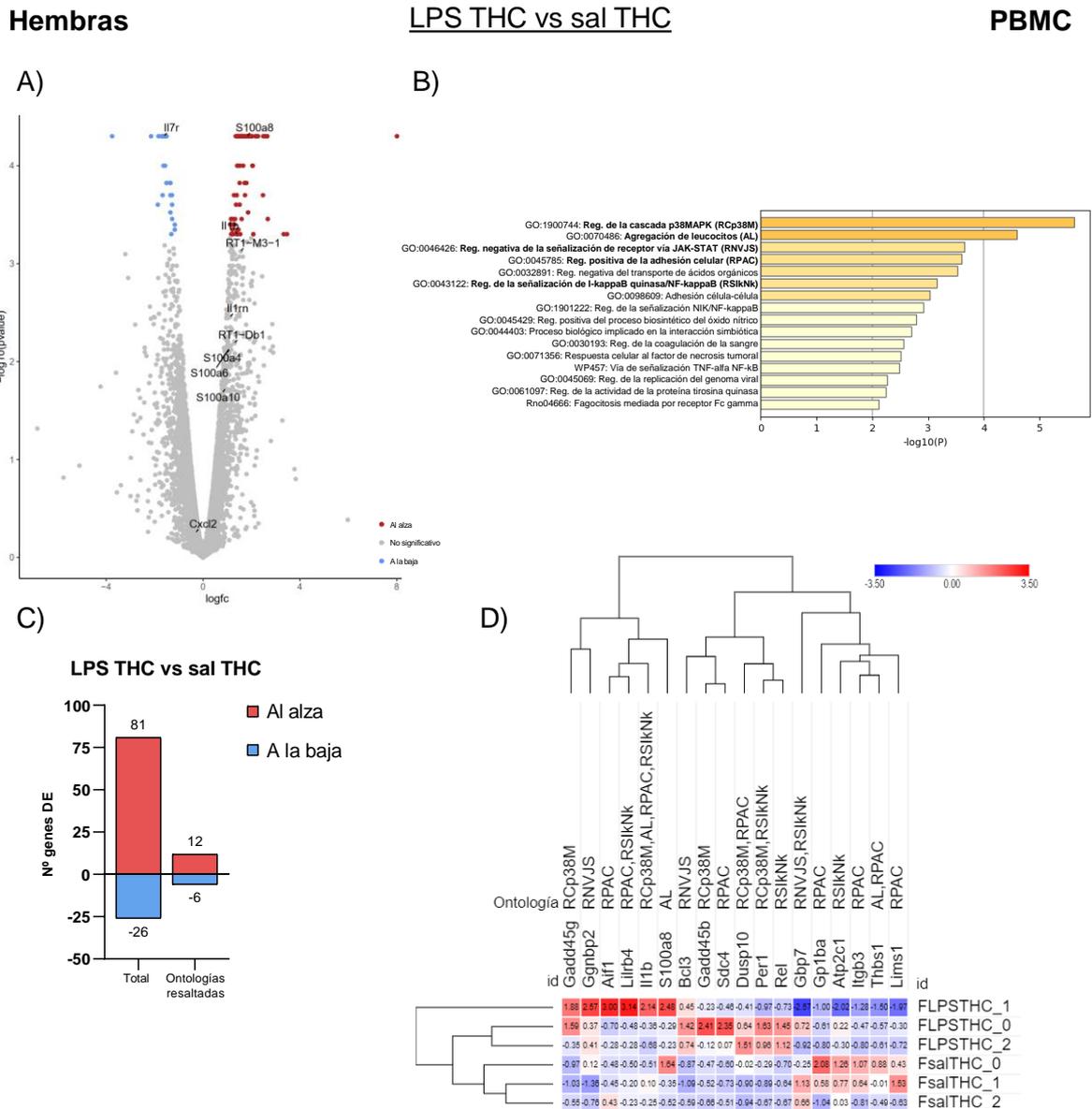


Figura R2.20. Efecto de los dos impactos versus THC en PBMC de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se destacan genes de la familia *RT1*, *Cxcl*, *S100a* o interleucinas afectadas por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

2.6. RNAseq COF

Las concentraciones y los RIN de las muestras de COF también fueron analizadas por la Unidad de Genómica la Fundación Parque Científico de Madrid (**Tabla R2.14**) y consideradas óptimas para su secuenciación.

Grupo	Muestra	Código	ng/μL	28S/18S	RIN
M sal veh	M71	0	314	1,8	9,8
	M84	1	392	1,8	9,9
	M87	2	340	2,6	10
M LPS veh	M67	0	449	1,9	9,9
	M98	1	478	1,6	9,2
	M99	2	474	1,7	9,5
M sal THC	M76	0	639	1,8	9,8
	M83	1	864	2,6	10
	M92	2	416	2,4	9,9
M LPS THC	M60	0	328	1,8	9,9
	M64	1	743	2,4	10
	M96	2	311	2,6	10
F sal veh	F71	0	377	1,8	9,9
	F75	1	634	1,8	9,7
	F80	2	405	1,8	9,9
F LPS veh	F70	0	224	1,7	9,9
	F103	1	571	1,9	9,7
	F104	2	217	1,8	9,8
F sal THC	F84	0	703	1,7	9,8
	F88	1	668	2,4	10
	F93	2	500	2,5	10
F LPS THC	F68	0	361	2,2	9,9
	F96	1	226	2,6	9,9
	F98	2	141	2,4	10

Tabla R2.14. Integridad y concentración de ARN en las muestras de corteza orbitofrontal. Se recogen los valores de concentraciones y ratios (como RIN y 28S/18S) que indican la calidad de las muestras de las células mononucleares de sangre periférica.

Tras realizar el análisis de expresión diferencial en los machos, se observaron 1.737 genes DE (p ajustado $< 0,05$) por efecto de la AIM, la mayoría de los cuales fueron regulados a la baja (**Figura R2.21**). Sin embargo, el efecto del THC fue sensiblemente menor llegando a alterar la expresión de tan solo 167 genes. Además, en este caso la dirección de los cambios fue opuesta, ya que la mayoría de los genes fueron regulados al alza. Sorprendentemente, no se observaron efectos sinérgicos en la combinación de los dos impactos, sino que se apreció un número de genes DE levemente mayor (258) a los causados por el THC (167) pero notablemente menor a los ocasionados por la AIM (1.737). La direccionalidad de los cambios coincide también con la provocada por el THC siendo la mayoría de genes regulados al alza cuando los animales estuvieron expuestos a los dos impactos. Al observar la distribución de los genes, se apreció que el LPS es el que más porcentaje de genes únicos altera en solitario (**Figura R2.22A**). Estos resultados parecen apuntar hacia un papel preventivo del THC frente a los cambios causados por la AIM, ya que tan solo un 5,7% de los genes únicos alterados por el LPS son también alterados por la combinación de los dos impactos.

Al comparar la combinación de los dos efectos con la AIM se observó un elevadísimo número de genes DE (2.620) mientras que en la comparación con el THC el número de genes DE fue casi diez veces menor (270). Este elevado número de alteraciones que se produce al comparar los dos efectos frente a la AIM, y que apenas se da en la comparación con THC, podría estar apoyando la hipótesis de que el THC previene los cambios ocasionados por la AIM.

En el caso de las hembras, se observó, al igual que en machos, un potente efecto de la AIM demostrado por la alteración transcriptómica de 1.185 genes también regulados mayoritariamente a la baja (**Figura R2.21**). El efecto del THC fue notablemente menor al del LPS y con una direccionalidad de los cambios opuesta, siendo la mayoría de los genes regulados al alza. La combinación de impactos, de manera similar a lo ocurrido en machos, provocó un efecto intermedio entre ambos efectos (224) por separado notablemente menor al de AIM (1.185) y levemente superior al del THC (136). En cuanto a la dirección de los cambios, la mayoría de los genes fueron regulados al alza, al igual que en el caso del THC.

Estos cambios podrían apuntar hacia el mismo efecto observado en el THC, en los machos, de protección frente a las alteraciones transcriptómicas ocasionadas por la AIM. Esto se ve reforzado por el elevado porcentaje de genes alterado por el LPS en comparación con el THC o la combinación de ambos (**Figura R2.22B**). Sin embargo, al comparar los efectos producidos por la combinación de los impactos con cada uno por separado, no se observó el gran cambio apreciado en los machos entre la combinación y la AIM (**Figura R2.21**). La comparación con el THC mostró pequeños cambios (70 genes DE), sin una direccionalidad clara.

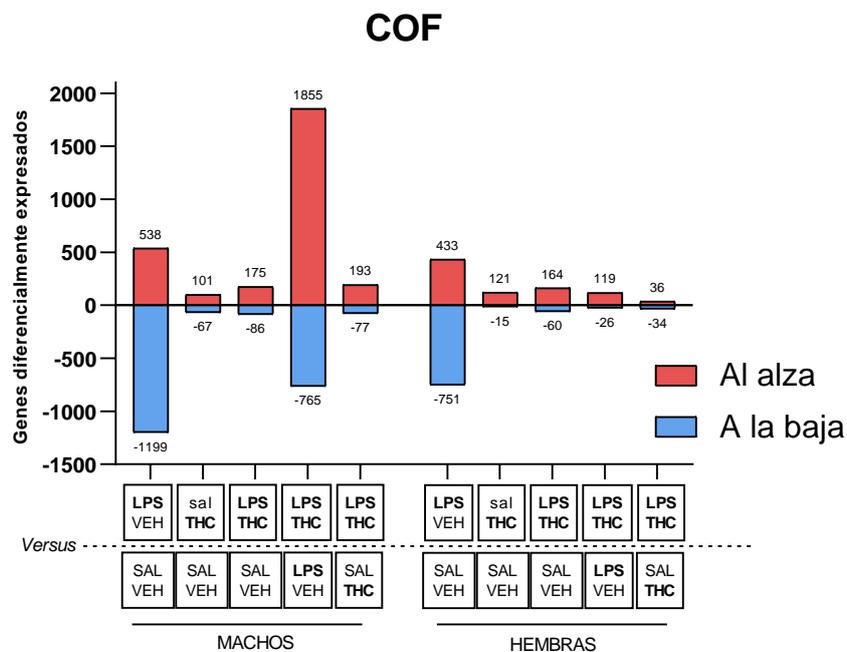
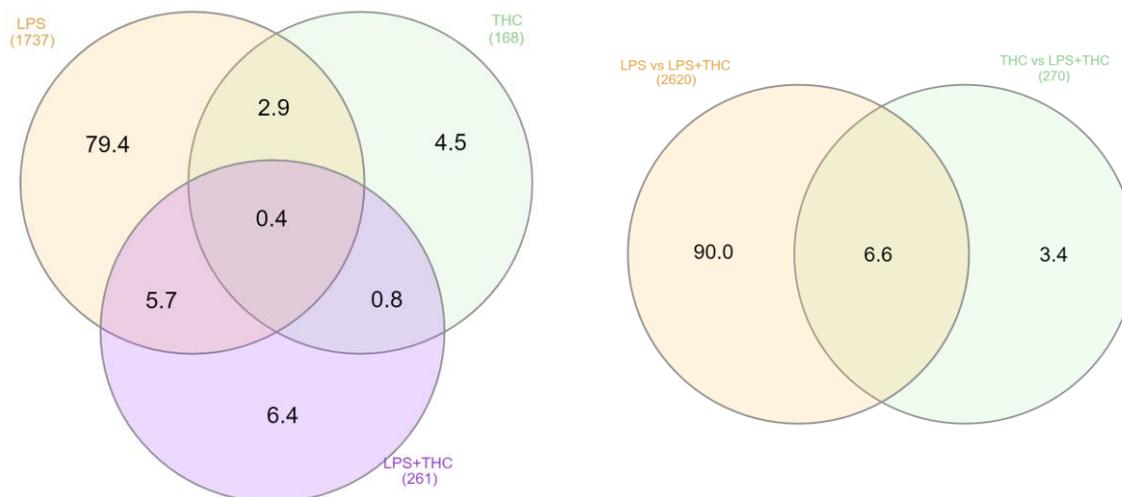


Figura R2.21. Número de genes diferencialmente expresados en corteza orbitofrontal. Se representa el número de genes diferencialmente expresados en cada una de las comparaciones realizadas entre grupos.

A) COF MACHOS



B) COF HEMBRAS

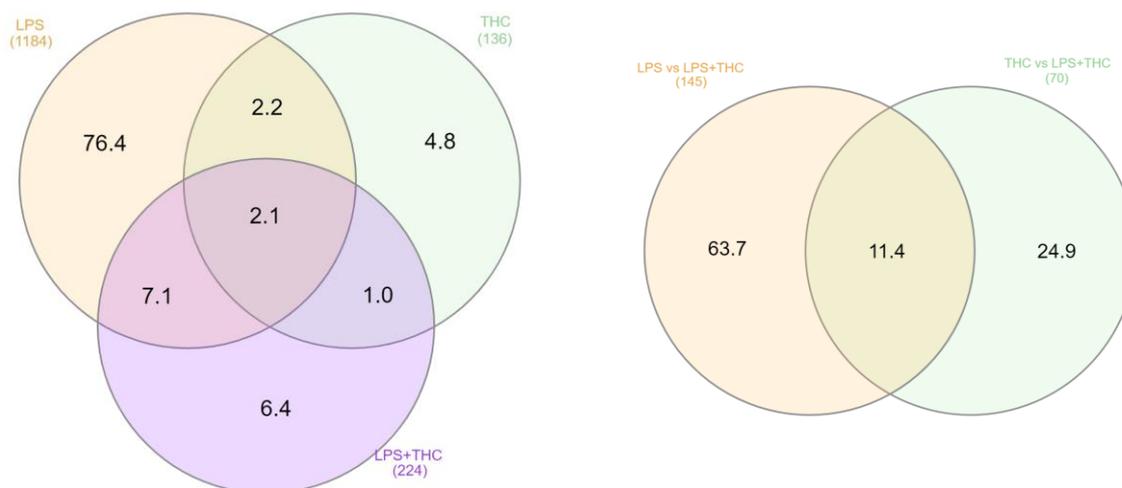


Figura R2.22. Distribución de los genes diferencialmente expresados en COF en función del impacto. A) y B) *Izquierda*: Se representan en un diagrama de Venn los porcentajes de genes diferencialmente (DE) expresados al comparar los grupos LPS veh (amarillo), sal THC (verde) y LPS THC (lila) con sal veh. A) y B) *Derecha*: Se representa la distribución de genes DE al comparar el grupo LPS THC con LPS veh (amarillo) y sal THC (verde). Junto al grupo comparado se muestra el número total de genes DE. Realizado con InteractiVenn (Heberle et al., 2015).

Para obtener una visión general del significado de los cambios causados por la AIM, el THC o su combinación, se realizó un análisis de ontologías de los genes DE, prestando especial atención a ontologías relacionadas con axones, sinapsis, mielinización, comportamiento y respuesta celular a distintos compuestos.

En los machos, la AIM provocó alteraciones transcriptómicas en un número muy elevado de genes que, en su mayoría, fueron regulados a la baja (**Figura R2.23A**). Entre las ontologías más significativas se encontraron algunas relacionadas con las sinapsis, la proyección neuronal y el comportamiento (**Figura R2.23B**). La regulación

general a la baja se mantuvo en los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas (**Figura R2.23C-D**).

Los cambios producidos por el THC en los machos fueron notablemente menores que los de AIM con tan solo 187 genes DE, aproximadamente una décima parte. Además, se invirtió la direccionalidad ya que se observó una regulación al alza en la mayoría de los mismos (**Figura R2.24A-C**). En cuanto a las ontologías, destacaron las relacionadas con sinapsis y comportamiento, aunque sus alteraciones no tuvieron una direccionalidad clara (**Figura R2.24D**).

Con la combinación de los dos impactos, se observó un ligero aumento respecto a los genes DE del THC, pero una importante bajada comparado con el efecto de AIM (**Figura R2.25A,C**). La mayoría de estos genes mantuvieron la direccionalidad de los cambios del THC, es decir, una regulación al alza. Las ontologías más significativas (**Figura R2.25B**) estuvieron relacionadas con el potencial de membrana, los niveles de neurotransmisores y el desarrollo del cerebro anterior. Se observó una clara regulación al alza de los genes que componen estas ontologías (**Figura R2.25D**).

Estos datos parecen indicar no solo que no existe efecto sinérgico, sino que el THC estaría de alguna manera actuando como protector frente a los cambios ejercidos por el LPS. No solo por la prevención del número de genes DE sino porque cambia la dirección de los cambios hacia una regulación al alza. Esto último podría apuntar hacia mecanismos compensadores, aunque son necesarios más estudios para confirmar estos resultados.

Machos

M LPS veh vs M sal veh

COF

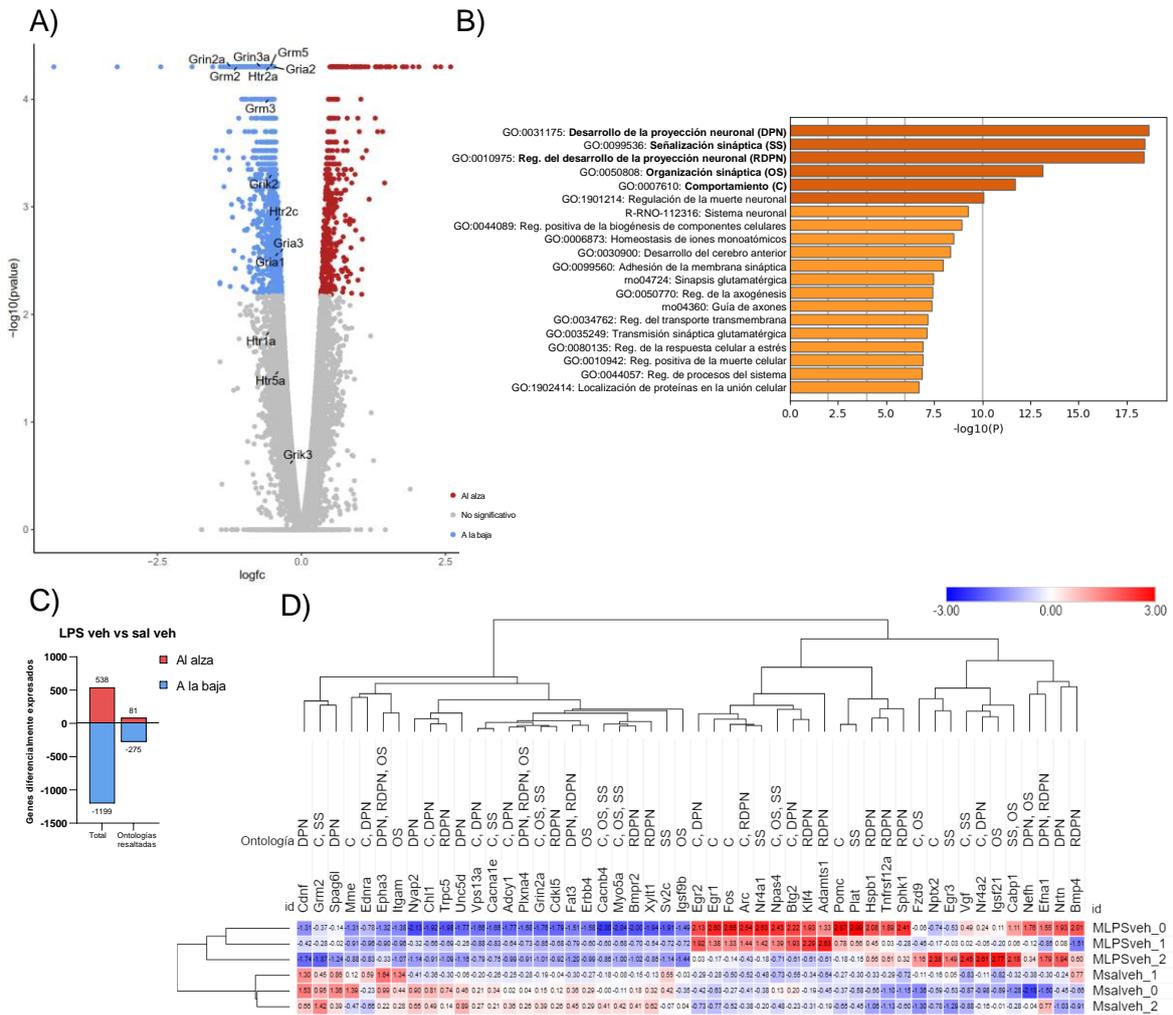


Figura R2.23. Efecto de AIM en COF de los machos. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor *p* sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor *p* ajustado < 0,05). Se muestran los genes de receptores glutamatergicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

Machos M sal THC vs M sal veh COF

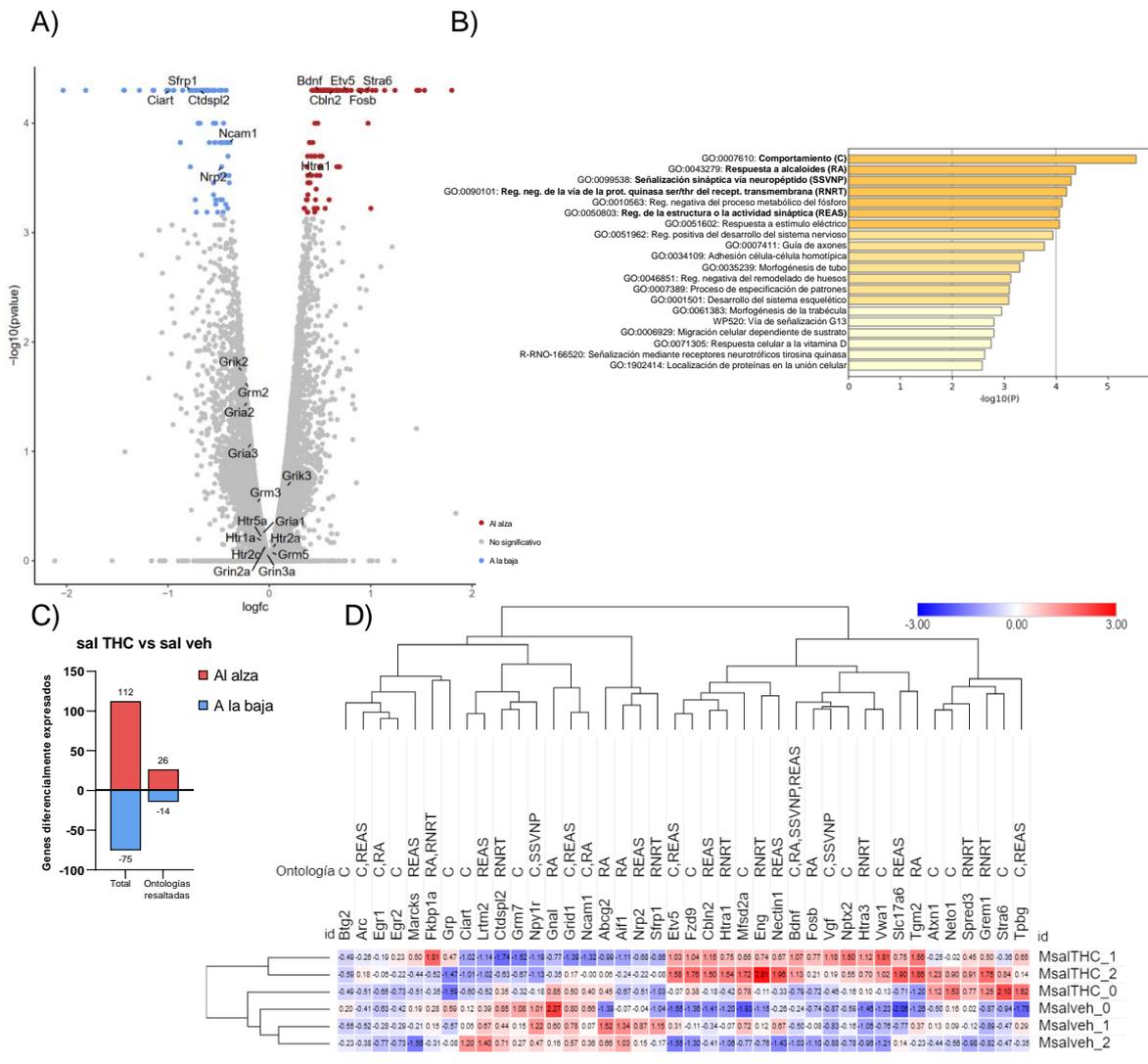


Figura R2.24. Efecto del THC en COF de los machos. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor *p* sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor *p* ajustado < 0,05). Se muestran los genes de receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación además de genes con relevancia en esquizofrenia o valores extremos dentro de las ontologías destacadas. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se muestran los genes de receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

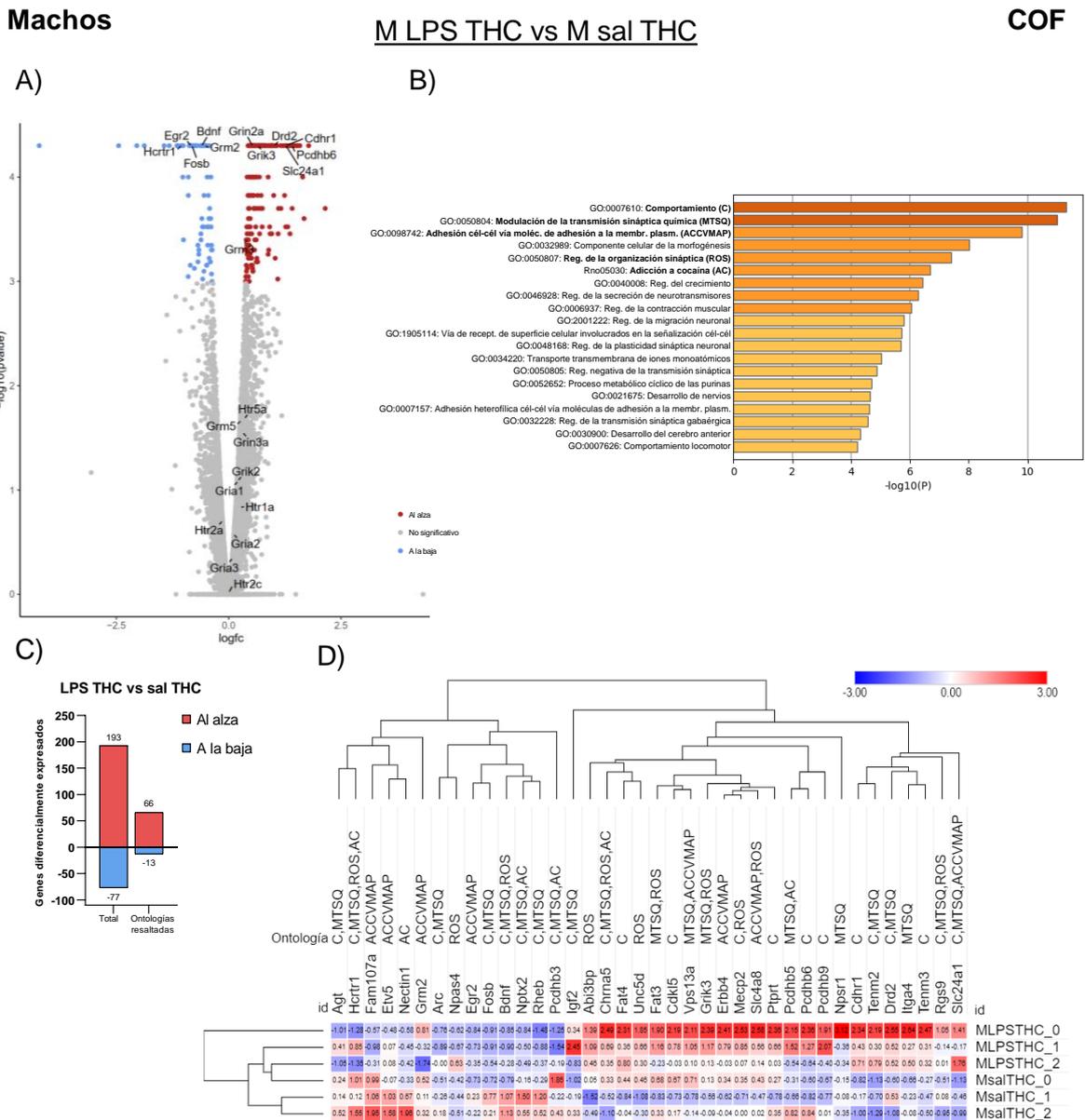


Figura R2.27. Efecto de los dos impactos versus THC en COF de los machos. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del número p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se muestran los genes de receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación además de genes con relevancia en esquizofrenia o valores extremos dentro de las ontologías destacadas. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todos los machos. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

En las hembras, la AIM produjo un efecto importante en comparación con el THC alterando la expresión de 1.185 genes frente a 136 alterados por el THC (**Figuras R2.28A y R2.28A**). Los genes alterados por la AIM pertenecen a ontologías relacionadas con la sinapsis y la proyección neuronal y, de manera similar a los ocurrido en los machos, fueron regulados mayormente a la baja (**Figura R2.28B-D y Figura R2.23B-D**). Sin embargo, la administración de THC provocó una regulación general a la baja y las principales ontologías encontradas estuvieron relacionadas con la mielinización y la plasticidad sináptica (**Figura R2.29 B-D**).

Analizando los efectos de la combinación de los dos impactos, se encontraron 224 genes DE (**Figura R2.30A,C**), un número muy inferior comparado con el efecto de AIM, aunque superior a los alterados a causa del THC. En este caso, se observó una regulación al alza general de los genes DE, de manera similar a lo ocurrido con el THC. Entre las ontologías más significativas no se encontraron ontologías relacionadas con la sinapsis, aunque se encontraron dos genes pertenecientes a la quimiorrepulsión del axón regulados a la baja (**Figura R2.30B,D**). Estos datos parecen apuntar hacia un efecto protector del THC frente a los cambios de expresión génica producidos por la AIM.

En la comparación de los dos impactos con AIM, en contra de lo esperado, no se vieron cambios en la expresión de un elevado número de genes (**Figura R2.31A,C**). Además, las ontologías afectadas tampoco estuvieron relacionadas con la sinapsis o la proyección neuronal (**Figura R2.31B**). Sin embargo, sí se observó una regulación global al alza en la expresión de los genes alterados (**Figura R2.31D**). Comparando el efecto de los dos impactos con el THC se observaron un número aún menor de genes DE (**Figura R2.32A,C**). Entre las ontologías destacadas, tampoco se encontró ninguna relacionada con la mielinización o la plasticidad sináptica (**Figura R2.32B,D**).

Estos resultados parecen indicar que el posible efecto protector observado en los machos, sería menor en las hembras ya que evita un elevado número de alteraciones transcripómicas, pero no se observa la inversión en la dirección de los cambios en ontologías alteradas por la AIM (como mielinización o plasticidad sináptica) cuando se compara con los dos impactos.

Hembras F sal THC vs F sal veh COF

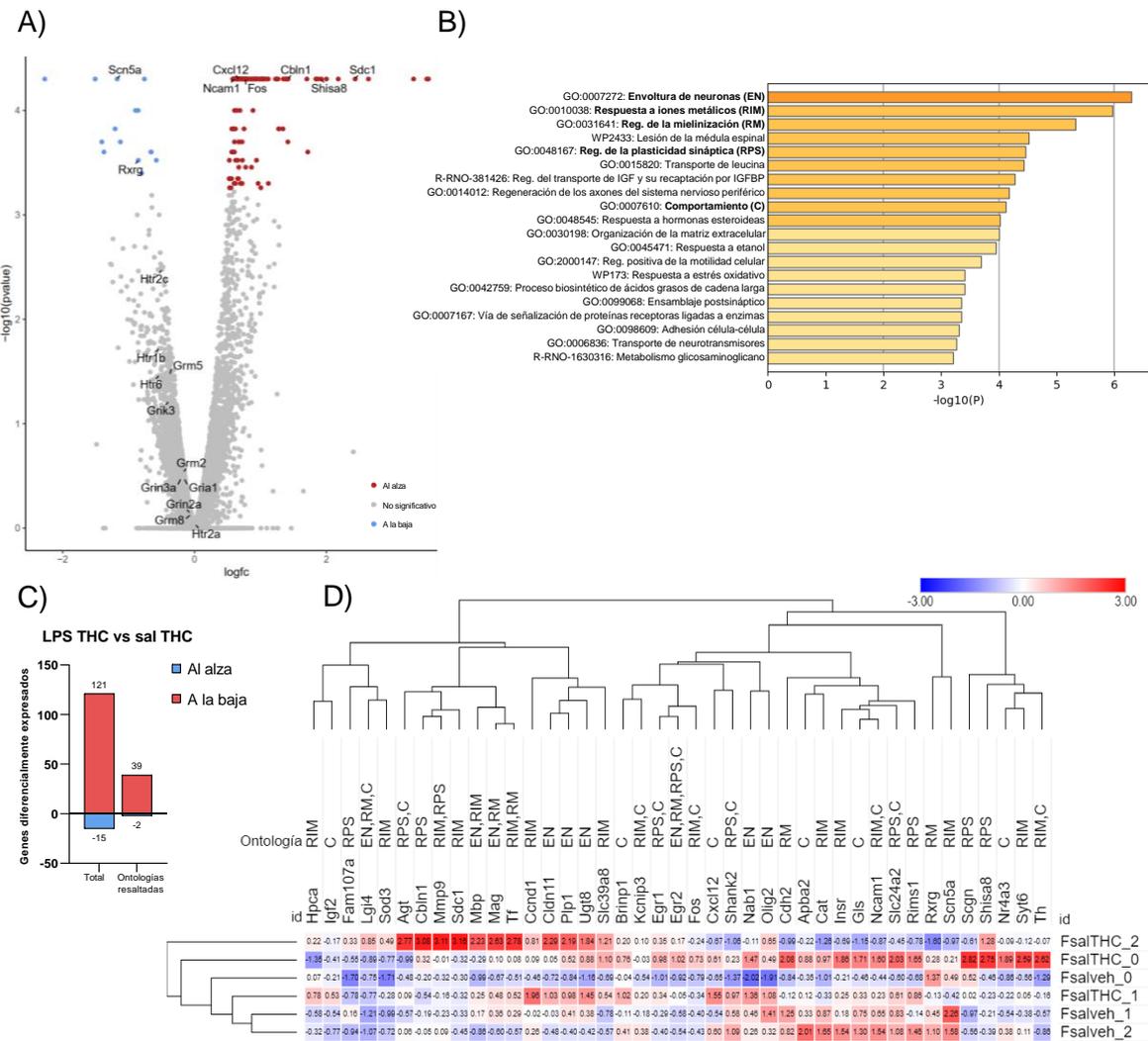


Figura R2.29. Efecto del THC en COF de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se muestran los genes de receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación además de genes con relevancia en esquizofrenia o valores extremos dentro de las ontologías destacadas. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

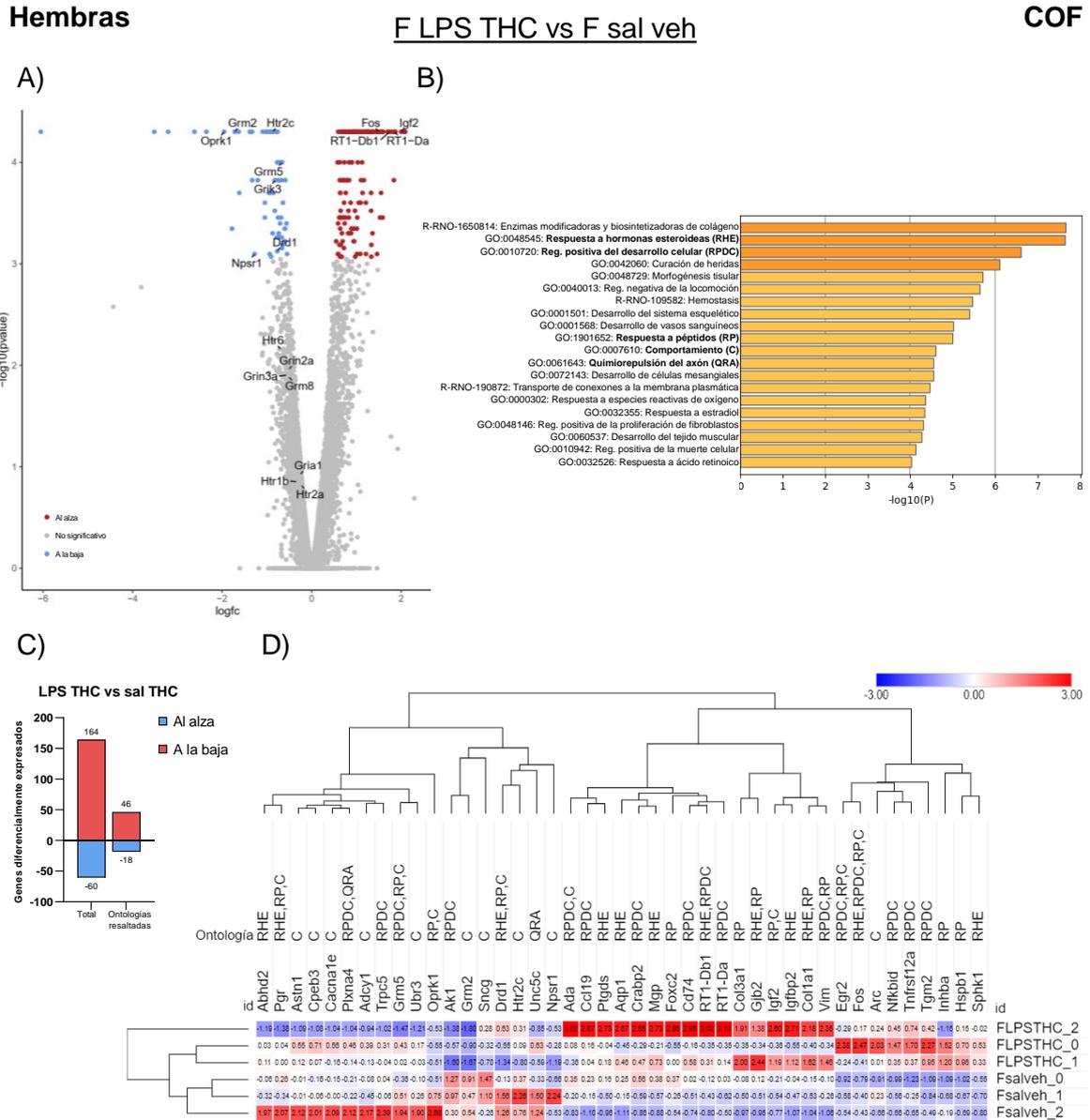


Figura R2.30. Efecto de los dos impactos en COF de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se muestran los genes de receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados además de genes con relevancia en esquizofrenia o valores extremos dentro de las ontologías destacadas. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

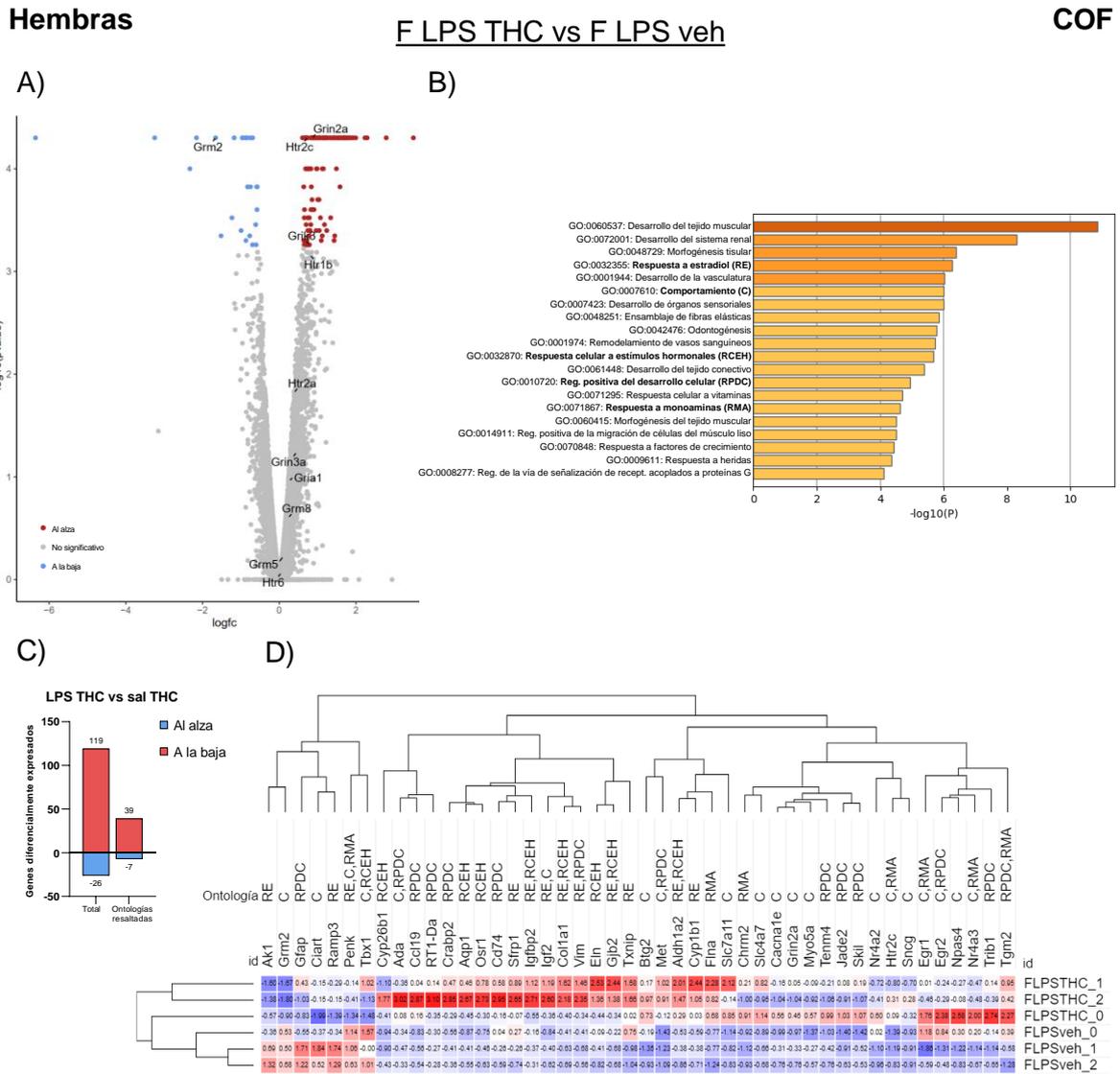


Figura R2.31. Efecto de los dos impactos versus AIM en PBMC de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor p sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor p ajustado $< 0,05$). Se muestran los genes de receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

Hembras

F LPS THC vs F sal THC

COF

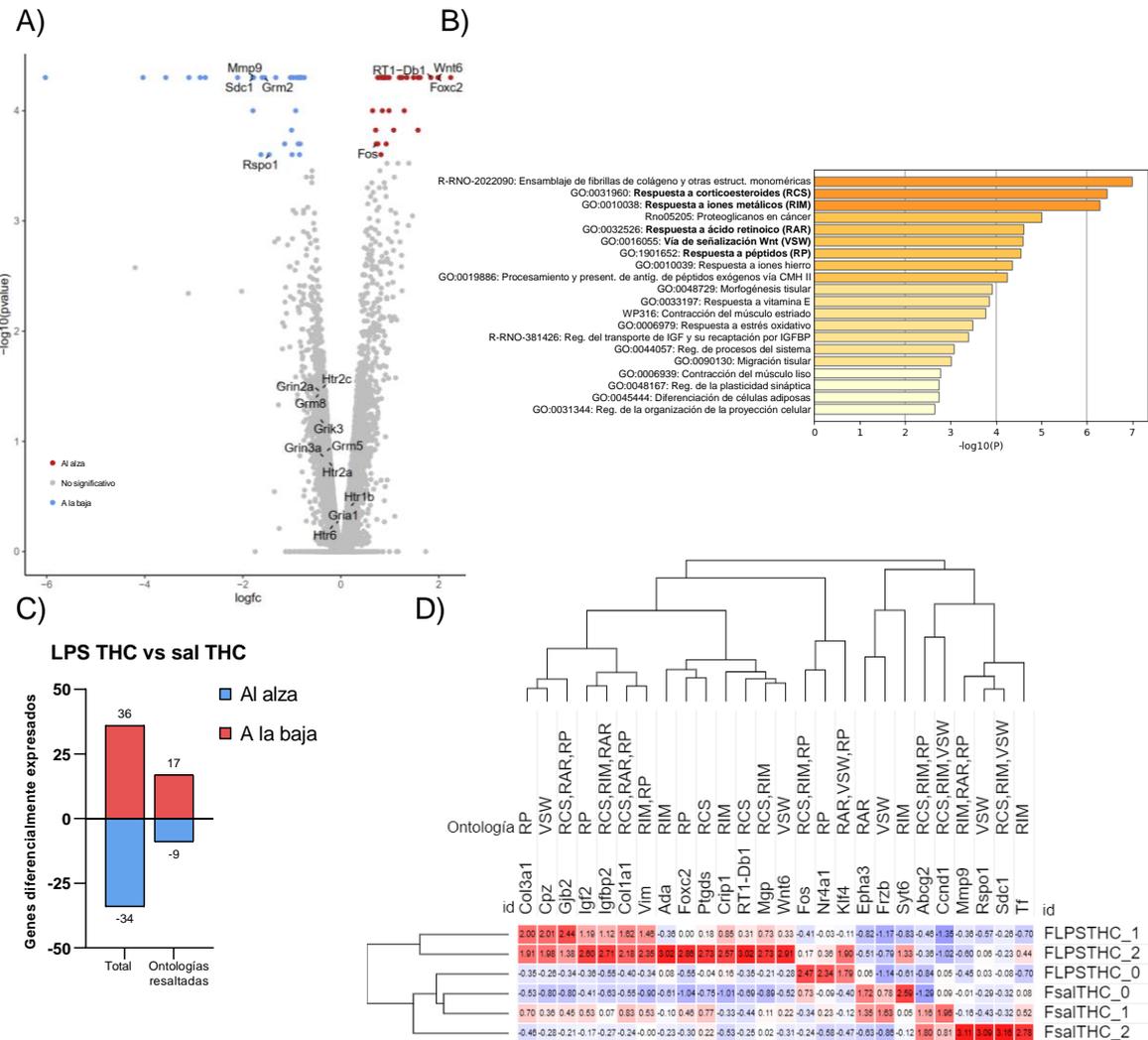


Figura R2.32. Efecto de los dos impactos versus THC en PBMC de las hembras. A) Se representa el negativo del logaritmo en base 10 del valor *p* sin ajustar frente al logaritmo de FC (del inglés *fold change*; número de veces de cambio). En color rojo o azul los genes diferencialmente expresados al alza o a la baja respectivamente (valor *p* ajustado < 0,05). Se muestran los genes de receptores glutamatérgicos, serotoninérgicos o sus subunidades afectados por la exposición a LPS, THC o su combinación además de genes con relevancia en esquizofrenia o valores extremos dentro de las ontologías destacadas. B) Ontologías enriquecidas significativamente con los genes diferencialmente expresados. C) Representación gráfica del número de genes diferencialmente expresados tanto totales (Total) como solo de las 5 ontologías resaltadas en negrita (ontologías resaltadas). D) Mapa de calor con el número de fragmentos de cada muestra normalizado a puntuación Z utilizando para cada gen la media y la desviación estándar de fragmentos de todas las hembras. Se representan todos los genes pertenecientes a las ontologías resaltadas.

DISCUSIÓN

La controversia respecto al papel como agente causal del cannabis en la esquizofrenia solo va a poder resolverse con buenos modelos animales. Además, un buen modelo animal que permita reproducir total o parcialmente la compleja variedad de síntomas de la esquizofrenia es vital para avanzar en la búsqueda de tratamientos contra esta enfermedad. Asimismo, el estudio de los factores de predisposición a esta enfermedad es de vital importancia para analizar tanto el impacto que suponen por separado como sus posibles interacciones, tanto negativas como positivas o compensatorias.

Los resultados de la presente tesis doctoral no permiten proponer un papel desencadenante claro del THC en la adolescencia sobre los síntomas manifiestos de la enfermedad, aunque sí muestran efectos en la expresión génica que podrían apuntar a un cierto papel desencadenante que hay que explorar en profundidad.

1. Efecto de la activación inmune prenatal en las madres

Los resultados recogidos en la presente tesis doctoral indican que con las concentraciones y condiciones utilizadas en la administración de LPS existe una activación del sistema inmune de la madre. Tanto en el objetivo 1 como en el objetivo 2 se observó una disminución de la temperatura rectal de las madres gestantes dentro de las 4 horas posteriores a las inyecciones (**Figuras R1.1C-D** y **R2.1C-D**). La administración sistémica de LPS es un método bien establecido de activación del sistema inmune que, mediante la liberación de citoquinas inflamatorias, produce diversos efectos como el aumento de la temperatura corporal (Borrell et al., 2002; Pauli et al., 1998). Aunque nuestros resultados parecen chocar con la respuesta clásica a LPS basada en un aumento de temperatura, esto se debe a la gestación. Otros estudios con ratas gestantes también han observado esta “inversión” de la hipertermia normal tras la administración de LPS (Tsang et al., 2006). Una de las explicaciones propuestas es la desviación que se produce en el equilibrio de citoquinas piréticas y antipiréticas hacia estas últimas cuando el pirógeno se administra durante la gestación (Fofie et al., 2005). Respecto a la disminución en la ganancia de peso observada por otros autores (Mouihate, 2016; Ribeiro et al., 2013), los resultados no son concluyentes ya que utilizando la misma dosis solo se pudo apreciar la disminución de la ganancia de peso en el experimento 2 (**Figura R2.1B**). Este fenómeno parece estar mediado por una reducción de la ingesta inducida por citoquinas proinflamatorias (Bretibat et al., 1995; Goehler et al., 1999). Estas diferencias podrían tener su base en el propio LPS ya que el lote utilizado en ambos objetivos fue diferente y según varios autores, esto podría afectar al grado de respuesta de este inmunógeno (Kentner et al., 2019; Parusel et al., 2017). Esto se ve reforzado por la diferente dinámica de la respuesta en ambos experimentos. En el experimento 1 se produce una respuesta de menor intensidad, pero más sostenida con las temperaturas disminuyendo de manera similar a lo largo en los dos días. Sin embargo, en el segundo experimento, la disminución de temperatura es muy potente el primer día y más caótica el segundo día. Este potente efecto del primer día podría haber sido suficiente para inhibir la ingesta y disminuir el aumento de peso normal de la gestación. En cambio, en el objetivo 1, el efecto paulatino podría no haber

provocado una inhibición suficiente de la ingesta como para disminuir el incremento peso.

2. Efectos de la exposición a LPS durante la gestación y a una dosis alta o baja de THC durante la adolescencia

2.1. Peso corporal

Los resultados de la presente tesis doctoral muestran que tanto la AIM como el THC producen alteraciones en el aumento normal del peso corporal asociado al crecimiento.

La AIM, en el objetivo 1, provocó una disminución del crecimiento corporal no dependiente de sexo o THC. Sin embargo, en el objetivo 2 causó el efecto contrario, incrementando el aumento normal de peso, aunque únicamente en los animales que no recibieron THC. Estos efectos dispares de la AIM están en línea con la literatura donde estudios similares reportan aumentos de peso (Ni et al., 2022; Wei et al., 2007), mientras que otros observan disminuciones (Bakos et al., 2004; Izvolkskaia et al., 2016) o no reportan cambios (Harvey & Boksa, 2014). Los motivos de estas discrepancias aún no se conocen. En el estudio de Harvey y Boksa no encontraron alteraciones en el peso corporal utilizando la misma cepa de rata, dosis, vía de administración y periodo de gestación. Además, analizan el peso durante un periodo equiparable al nuestro (desde DP30 a DP60) por lo que las diferencias entre nuestros estudios no parecen deberse a la cepa, la administración de LPS (periodo y dosis) o al momento del desarrollo analizado. De nuevo, estas diferencias podrían deberse a diferencias en el LPS, ya que a pesar de que en todos los casos proviene de *Escherichia coli* (serotipo 0111:B4), los lotes utilizados son diferentes.

En línea con otras investigaciones (Keeley et al., 2015; Klein et al., 2011), los resultados de la presente tesis doctoral muestran que la administración de THC reduce el incremento de peso asociado al crecimiento, tanto a una dosis baja (**Figura R1.2.B**) como a dosis crecientes (**Figura R2.2.B**) e incluso tras la finalización de la administración. Parece claro que este efecto se debe a una reducción en la ingesta. Se ha propuesto que esta reducción de la ingesta podría deberse, en parte a la reducción de la actividad motora (Rubino et al., 2008) aunque también se ha sugerido que la reducción de los receptores CB₁R hipotalámicos podrían reducir la habilidad del sistema endocannabinoide para estimular señales orexigénicas (Matias & Di Marzo, 2007; Rubino et al., 2008). Nuestros resultados parecen ser una combinación de ambas hipótesis debido a que el efecto del THC se inicia demasiado pronto como para ser debido a cambios de expresión, pero se ve potenciado por el tiempo y la dosis. No se encontraron efectos sinérgicos entre los dos impactos. Sin embargo, en el objetivo 2, el potente efecto del THC fue capaz inhibir el incremento de peso producido por el LPS. Posiblemente debido a que la dosis de THC se aumentó notablemente mientras que la de LPS se mantuvo igual.

2.2. Síntomas cognitivos: memoria de trabajo y filtrado preatencional

La AIM ha sido asociada con déficits en estos dos dominios cognitivos. La memoria de trabajo, analizada mediante el laberinto en Y, se vio alterada en la descendencia expuesta a AIM, aunque solo en machos y en el objetivo 1. La mayoría de estudios aportan evidencias de que la AIM produce déficits en la memoria de trabajo (da Rosa et al., 2022; Santos-Toscano et al., 2016; Wischhof, Irrsack, Osorio, et al., 2015) aunque algunos autores no reportan cambios en este sentido (Nakamura et al., 2021; Rocha-Gomes et al., 2022). Estas diferencias podrían deberse a las diferencias en el modelo utilizado (rata o ratón), al inmunógeno y a la ventana de actuación. Estudios en humanos con trastornos del espectro autista también han aportado evidencias de subtipos con mejoras en la memoria espacial (Caron et al., 2004). Una posible explicación de las diferencias en nuestro modelo es que las diferencias genéticas debido a las cepas utilizadas (SD-OFA y SD-CD) o la propia variabilidad de la prueba pudieran estar detrás de estos fenotipos diferentes. Recientemente, se han propuesto técnicas más robustas basadas en procedimientos o patentes que exploraremos en futuros trabajos (Stupart et al., 2022).

El THC no afectó a la memoria de trabajo ni tampoco provocó efectos sinérgicos. Otros estudios han demostrado que la administración de THC durante la adolescencia no altera las puntuaciones obtenidas en el laberinto en Y (Cadoni et al., 2015). Incluso se ha visto que la autoadministración de THC durante la adolescencia mejora levemente la memoria de trabajo en una tarea de igualación a la muestra (Zamberletti & Rubino, 2022). En general, los efectos en la cognición de la exposición a cannabinoides durante la adolescencia son complejos y dependen de múltiples factores como el tipo de administración (pasiva o voluntaria), edad de exposición, tarea utilizada o cannabinoide utilizado (Higuera-Matas et al., 2015; Osborne, Solowij, Babic, Lum, Huang, et al., 2019; Zamberletti & Rubino, 2022).

Los déficits en el filtrado preatencional, analizados mediante la prueba de PPI, han sido utilizados tradicionalmente para evaluar los síntomas positivos, de manera indirecta, tanto en humanos como en modelos animales (Schmidt-Hansen & Le Pelley, 2012; Wynn et al., 2004). Los resultados de esta tesis doctoral muestran una reducción en la PPI, asociada a AIM, independiente del sexo y solo en el objetivo 1. Estos datos siguen la línea de otros estudios que también han observado esta disminución tanto en machos como en hembras (Wischhof, Irrsack, Osorio, et al., 2015). Sin embargo, en el objetivo 2, solo se encontró un PPI disminuido en machos sin efecto de AIM, THC o su interacción. Evidencias previas sugieren que la PPI está aumentado en machos de ratas Wistar (Lehmann et al., 1999) mientras que otros realizados en SD parecen apuntar hacia la ausencia de cambios (Faraday, 2002). Esta controversia en los datos podría deberse a la influencia que el ciclo estral tiene en la realización de esta prueba (Koch, 1998), por lo que la monitorización de las etapas del ciclo durante la PPI podría ser interesante en el futuro.

Respecto al THC, no se han encontrado cambios en el filtrado preatencional. Sin embargo, otros autores sí que han apreciado déficits en modelos similares al nuestro (Abela et al., 2019; Renard et al., 2017). En el estudio de Renard, se utilizó la misma cepa, dosis y forma de administración de THC (incluido el vehículo) aunque la exposición a THC se inició 5 días más tarde. La complejidad y la velocidad a la que se producen los cambios durante la pubertad podría sugerir que la distinta ventana de

administración podría ser un factor explicativo importante debido a posibles cambios madurativos en el SEC. Es importante destacar que tampoco se han encontrado efectos sinérgicos, en este dominio, derivados de la combinación de AIM y una exposición a THC durante la adolescencia y que esta ausencia de interacciones también se ha encontrado en otros modelos de dobles impacto (García-Mompo et al., 2020; Guma et al., 2023; Stollenwerk & Hillard, 2021).

2.3. Síntomas negativos: sociabilidad, preferencia por la novedad social y anhedonia

Los síntomas negativos están asociados con una reducción de la calidad de vida y la funcionalidad del paciente (Möller, 2016). En esta tesis doctoral se analizaron dos componentes de la interacción social y la posible presencia de anhedonia. Los resultados muestran, en el objetivo 1, un incremento general de ambos componentes sociales causado por la AIM. También se observó una mayor sociabilidad basal en los machos que ha sido reportada por estudios previos (Cossio et al., 2020). En cambio, en el objetivo 2, estos efectos desaparecen casi en su totalidad. Las evidencias previas sobre los efectos de la AIM en la interacción social no son claras. Mientras que algunos estudios han encontrado déficits significativos en la sociabilidad (G. A. Lee et al., 2021; Talukdar et al., 2020), otros no encuentran diferencias en este aspecto (Batinić et al., 2016). Además, citoquinas como la IL-17a, asociadas a la AIM parecen prevenir los déficits presentes en modelos del espectro autista y la descendencia expuesta a AIM (Reed et al., 2020). Estas diferencias pueden ser explicadas en parte debido a las diferentes dosis, ventanas de administración y animales utilizados. Aunque estos factores no pueden explicar las variaciones en nuestros resultados, sí podrían hacerlo las diferencias en los lotes, ya comentadas, que son capaces de inducir respuestas de distinta potencia (Mueller et al., 2019).

En cambio, el THC produjo, en el objetivo 1, una disminución de la preferencia por la novedad social en ambos sexos. Estos resultados concuerdan con las evidencias presentes en la literatura sobre los efectos perjudiciales de una exposición de THC en la adolescencia en los comportamientos sociales (McDonald et al., 2021; O'Tuathaigh et al., 2010). Sorprendentemente, en el objetivo 2, los resultados son contrarios y el THC produce un aumento de la preferencia por la novedad social pero solo en los animales expuestos a LPS durante la gestación. Parece que este efecto podría ser explicado, en parte, por el rescate que hace del déficit producido por el LPS. Otros autores han aportado evidencias de que el CBD es capaz de rescatar los déficits sociales inducidos por la AIM (Osborne et al., 2017), por lo que el sistema endocannabinoide podría ser un factor importante en este sentido.

Los resultados de la presente tesis doctoral muestran un incremento general de la preferencia por sacarosa en todos los animales expuestos a LPS durante la gestación. De manera contraria a nuestras predicciones, estos datos apuntan hacia una respuesta hedónica incrementada causada por la AIM que va en contra de la anhedonia observada por otros autores en modelos similares (da Silveira et al., 2017; Hu et al., 2019; Missault et al., 2014). Cabe destacar que no hay estudios que analicen el efecto de la AIM inducida mediante LPS en la preferencia de sacarosa. Además, en

la última década, la heterogeneidad de la dimensión anhedónica en las enfermedades mentales ha planteado la necesidad de una definición más compleja de anhedonia. “La falta de habilidad para experimentar placer” está siendo reemplazada por “deterioro en la habilidad para perseguir, experimentar y/o aprender sobre el placer” (Thomsen et al., 2015). Esto ha permitido una mejor comprensión de la anhedonia en la esquizofrenia ya que, como evidencias recientes demuestran, el proceso psicológico que en realidad está alterado en estos individuos es la capacidad de anticipar el placer (Šagud et al., 2019) y no la dimensión del placer que atañe al consumo (Fortunati et al., 2015). En conjunto, estas evidencias requieren estudios más detallados en todas las dimensiones de la anhedonia en futuros modelos animales.

2.4. Síntomas positivos: formación de asociaciones incidentales

En esta tesis doctoral se ha evaluado la exactitud de las representaciones mentales de la realidad, un fenómeno que podría subyacer a características únicas de enfermedades mentales humanas como las alucinaciones en esquizofrenia (Busquets-García et al., 2017; M. McDannald & Schoenbaum, 2009). Para ello, se analizó la formación de asociaciones incidentales a través de un paradigma de preconditionamiento sensorial y condicionamiento mediado. En el objetivo 1, se observó una disminución general de la preferencia por mCS+ en todos los grupos. Esto parece sugerir que la fase de preconditionamiento sensorial, es insuficiente para que ninguno de los grupos separe con claridad la representación mental de ambos estímulos. Sin embargo, esto nos permite comprobar que en esta cepa de ratas y con nuestras condiciones experimentales, los animales son capaces de experimentar condicionamiento mediado, un requisito para poder realizar los experimentos siguientes. Los datos del objetivo 2 parecen confirmar esta hipótesis mediante la reducción del condicionamiento mediado general a una tendencia. Aunque esta tendencia parece estar influenciada notablemente por las diferencias en los machos con ambos impactos y las hembras no expuestas a AIM no existen interacciones ni efectos simples. En el caso de las hembras, parece que la duración del preconditionamiento sensorial estaría cerca a ser el óptimo para producir condicionamiento mediado solo en algunos grupos. Aunque el efecto podría ser el contrario al esperado, ya que la exposición a THC podría estar evitando el condicionamiento mediado. En cualquier caso, son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis. En el caso de los machos, la inspección visual de los datos sugiere que quizás con una fase de preconditionamiento ligeramente más corta, se produciría condicionamiento mediado solo en el caso de los animales expuestos a los dos impactos. Las diferencias con otros estudios en la duración del preconditionamiento necesario para obtener condicionamiento mediado podría deberse al tipo de condicionamiento. Los experimentos previos están basados en condicionamiento operante y no en condicionamiento clásico, lo que podría explicar en parte la divergencia de los resultados (M. A. McDannald et al., 2011). Respecto al condicionamiento directo, parece claro que una sesión no es suficiente. El potente efecto de este condicionamiento en el objetivo 2 parece demostrar que 3 sesiones es una duración adecuada para evitar la extinción antes de los test.

2.5. Marcadores tempranos de la severidad de los síntomas

Existe un creciente interés en encontrar marcadores de la respuesta inmune tras una infección materna que puedan predecir si la esquizofrenia o enfermedades relacionadas con el neurodesarrollo se manifestarán en la descendencia. Los modelos de AIM han sido cruciales en este empeño y se han basado en la reactividad inmune basal a un inmunógeno y la pérdida de peso o cambios en la temperatura rectal tras el contacto con el inmunógeno (Bronson et al., 2011; Estes et al., 2020; Lins et al., 2018; Missault et al., 2014; Vorhees et al., 2012). En un intento de aportar evidencias en este sentido, en esta tesis doctoral se analizó si rasgos del comportamiento (puntuaciones en laberinto de campo abierto y laberinto en cruz elevado), previos a la gestación y al contacto con el inmunógeno, sumados a las medidas clásicas (pérdida de peso y temperatura rectal tras el contacto con el inmunógeno) podrían combinarse para generar un índice predictivo.

Sin embargo, en el experimento 1 los índices de las madres o sus componentes no fueron capaces de predecir la severidad o la presencia de síntomas en la descendencia. Para realizar las correlaciones, se calcularon índices utilizando la media de las puntuaciones obtenidas en las pruebas de comportamiento por la descendencia biológica de cada madre, así como los datos obtenidos de dicha madre. La utilización de la media en el caso de las crías, provocó una reducción notable del tamaño de la muestra, perdiendo potencia estadística en el proceso que podría explicar la falta de resultados.

En el experimento 2, con un mayor tamaño de la muestra, se analizaron también las poblaciones de las PBMC tras una inyección de LPS. Es importante destacar que los análisis estadísticos no evidenciaron diferencias en ningún caso en función de si la inyección de LPS había sido en primer o segundo lugar. Nuestros resultados sugieren que una exposición a LPS condiciona la respuesta de los linfocitos T en exposiciones sucesivas evitando la disminución de dicha población. Tras analizar los índices de las madres y sus componentes, se encontró una correlación entre la pérdida de peso tras la administración de LPS durante la gestación y peores puntuaciones en las pruebas de conducta de la descendencia. Estudios previos han demostrado que la pérdida de peso tras la AIM conlleva incrementos de citoquinas como TNF α en las madres y una mayor severidad de alteraciones en la descendencia como déficits en la locomoción inducida por anfetaminas o preferencia por sacarosa (Bronson et al., 2011; Missault et al., 2014) aunque no de PPI (Wolff & Bilkey, 2010).

3. Cambios en la actividad cerebral causados por AIM y la exposición a una dosis alta de THC durante la adolescencia

Los resultados de imagen mostraron que, en corteza cerebral, la AIM produjo una disminución de la actividad asociada a la edad. En línea con estos resultados, estudios en humanos con esquizofrenia han observado una disminución de la actividad en el lóbulo frontal (Bralet et al., 2016). Por otro lado, otros estudios en animales han observado un aumento de la actividad en la corteza frontal asociativa causada por la

AIM que solo se manifestaba en la etapa adulta (Guerrin et al., 2022). Sin embargo, estos autores utilizan poli I:C y analizan la actividad en periodos más tempranos. Además, en estudios longitudinales en humanos, se aprecia un incremento general de la actividad en algunas regiones frontales desde la niñez hasta la etapa adulta temprana (Trotta et al., 2016). Por tanto, las diferencias en los tiempos de medición y, en parte, la utilización de un inmunógeno distinto podrían explicar las diferencias en estos resultados.

En el caso del CAB, la AIM provocó efectos contrarios, aumentando los niveles de actividad con la edad. Estudios en ratones han evidenciado que alteraciones en la actividad de CAB pueden regular la actividad de corteza y causar alteraciones similares a síntomas de esquizofrenia como déficits locomotores y en el reconocimiento de objetos (T. Kim et al., 2015; McNally et al., 2021). Esto podría estar relacionado con la disminución de la actividad en corteza comentada anteriormente. También se ha demostrado que diferentes poblaciones del CAB están implicadas en comportamientos sociales y que su eliminación produce déficits en ese sentido (Okada et al., 2021). El aumento de actividad observado en nuestros resultados podría estar implicado en el incremento de los comportamientos sociales causado por la AIM en el experimento 1. Sin embargo, en el experimento 2, no se observaron dichos efectos. La ausencia de este fenómeno podría deberse, en primer lugar, a una disminución general de los efectos en el comportamiento que, como se ha comentado podría estar causada por diferencias en el LPS o por las diferentes cepas utilizadas. No obstante, también podría deberse a la ventana de tiempo en la que se realizan las pruebas de interacción social. El aumento de actividad de esta región se observa el DP120 mientras que las pruebas se realizan alrededor del día 72 por lo que quizás todavía no estaban presentes las alteraciones de la actividad en CAB.

En el cerebro medio y el hipotálamo, la exposición a LPS durante la gestación produce una disminución de la actividad solo en las hembras a DP60 (P1). En DP60 también se apreció una disminución de la actividad en los colículos causada por el LPS, aunque se dio en los dos sexos. La disminución de la actividad en hipotálamo se ha observado también en estudios de imagen similares llevados a cabo en pacientes con esquizofrenia, aunque en ambos sexos (Mitelman et al., 2018). Otros estudios en humanos han demostrado alteraciones estructurales en los colículos inferiores y una disminución de interneuronas parvalbúmina positivas así como de las redes perineuronales que las sustentan (Kang et al., 2008; Kilonzo et al., 2020). Esta disminución de neuronas podría explicar la disminución de actividad en esa región. Estudios en animales y en cerebros postmortem de humanos con esquizofrenia han revelado una disminución de tiroxina hidroxilasa en el área tegmental ventral (Perez-Costas et al., 2012; Rice et al., 2016; Tomasella et al., 2020). Esto parece sugerir que existen alteraciones en las neuronas de esas zonas, que podrían no ser del todo funcionales y tener dificultades para captar glucosa.

Sin embargo, los efectos comentados en cerebro medio, hipotálamo y colículos desaparecen con la edad, ya que no están presentes en el segundo PET. Una posible hipótesis es que algunas de estas alteraciones repliquen el patrón de fluctuaciones que ocurre en los síntomas de la esquizofrenia en humanos con un patrón, en ocasiones episódico y con picos y remisiones periódicos, aunque con un incremento de fondo a lo largo de la vida. En contra de esta hipótesis se encuentra la ausencia de

resultados en segundo PET. Aunque sería necesario un seguimiento más duradero a lo largo de la vida para confirmar la ausencia de efectos o la presencia de más episodios.

4. Cambios en la expresión génica causados por AIM y la exposición a una dosis alta de THC durante la adolescencia

4.1. PBMC

Con el fin de realizar un análisis exploratorio en búsqueda de posibles alteraciones en el sistema inmune de la descendencia se realizó una secuenciación masiva de las PBMC. Estas células, debido a su facilidad de obtención, manejo y conservación suponen una diana de suma importancia en la que buscar marcadores que ayuden a predecir predisposición o alteraciones de la enfermedad.

En los machos, el LPS parece estar participando mediante cambios en genes relacionados con la respuesta inflamatoria. También se encontraron alteraciones debidas tanto al THC como a su combinación con LPS que parecen afectar a ontologías relacionadas con la activación celular y sugieren que podrían estar contribuyendo a una desregulación del sistema inmune. Entre los genes alterados, se han encontrado varios miembros de la familia TLR. En concreto se encontró una regulación al alza de *Tlr7*, *Tlr8* y *Tlr13*. Estos receptores se encuentran en el interior de endosomas y detectan ARN de cadena simple (*Tlr7* y *Tlr8*) y ARN ribosómico bacteriano (*Tlr13*) (Fitzgerald & Kagan, 2020). Una activación aberrante de esta familia de receptores se ha relacionado con enfermedades autoinmunes (Lau et al., 2005; Leadbetter et al., 2002). Además, diversos estudios han demostrado que la exposición a una activación inmune prenatal produce alteraciones a largo plazo en el sistema inmune de la descendencia (Hsiao et al., 2012; Labouesse et al., 2015). Se han observado alteraciones tales como una mayor activación microglial y muerte neuronal hasta en DP60, además de signos de neuroinflamación en DP120 (Dada et al., 2014). Estas disrupciones del sistema inmune a largo plazo constituyen una diana interesante para futuros estudios que permitan arrojar luz sobre el papel que podrían llevar a cabo en el desarrollo o empeoramiento de los síntomas.

Al comparar los efectos del THC o AIM por separado con la combinación de ambos, encontramos que la combinación comparada con LPS, produce una regulación a la baja en un mayor número de genes relacionados con la inflamación. Por ejemplo, se han encontrado regulados a la baja genes de la familia Cxcl, como *Cxcl2*, *Cxcl10* y *Cxcl16*, que son activados por infecciones o citoquinas proinflamatorias como *IL-6* o *IL-1 β* (Elemam et al., 2022; Gao et al., 2018; Korbecki et al., 2021). Esto puede deberse a las propiedades antiinflamatorias del THC mediadas a través de CB₂R que se encuentra regulado al alza (Eisenstein & Meissler, 2015; Nagoor Meeran et al., 2021). Sin embargo, otros genes importantes en el proceso inflamatorio continúan regulados al alza a pesar del THC como es el caso de *s100a8* y *s100a9* (S. Wang et al., 2018). Estos cambios, sumados a la menor intensidad de las alteraciones al comparar el efecto del THC con la combinación de ambos impactos parece sugerir

que el THC está regulando la inflamación. Una posible hipótesis es que realice esta modulación a través de CB₂R que se encuentra regulado al alza (Eisenstein & Meissler, 2015), aunque a estas dosis no es capaz de normalizar por completo el proceso inflamatorio.

Sorprendentemente, el efecto del LPS fue notablemente menor en las hembras. Este podría ser uno de los múltiples factores que hacen que, en estos modelos, exista un menor número de alteraciones en las hembras (Alizadeh et al., 2020; Foley et al., 2015). Sin embargo, son especialmente interesantes los efectos del THC, que activa genes de respuesta a LPS, y de la combinación de impactos, que alteran la expresión de genes relacionados con la proliferación de linfocitos y el procesamiento de antígenos. En la combinación de los dos impactos se encuentran regulados al alza *RT1-M3-1* y *RT1-Db1*, genes de la familia del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) Ib y II respectivamente. La función de ambos es presentar antígenos a linfocitos T CD8+ o CD4+ que, en presencia de infecciones, activan a la liberación de citoquinas inflamatorias como IFN γ o TNF α iniciando la respuesta inmune (Anderson & Brossay, 2016; Rock et al., 2016). Diversos estudios han relacionado alteraciones de CMH con el desarrollo de la esquizofrenia (Debnath et al., 2013; Robinson-Agramonte et al., 2022; Severance & Yolken, 2020). Además, esta desregulación del sistema inmune periférico a largo plazo es muy relevante en las hembras ya que incluso en ausencia de síntomas, podría influir en el neurodesarrollo de su posible descendencia que sí podría desarrollar los síntomas. Otros autores han reportado los efectos transgeneracionales de la activación inmune materna transmitidos por vía paterna (Weber-Stadlbauer et al., 2017) o por modificaciones en el cuidado materno (Berger et al., 2018; Ronovsky et al., 2017). Es posible que alteraciones en los CMH puedan producir, durante la gestación, una respuesta desmesurada frente a infecciones o de manera basal produciendo así alteraciones en su descendencia.

4.2. Corteza orbitofrontal

En esta tesis doctoral también se realizó un análisis exploratorio en búsqueda de diferencias transcriptómicas en la corteza orbitofrontal de la descendencia. Esta región tiene un papel fundamental en el razonamiento basado en modelos, es decir, en obtener información del mundo que nos rodea y realizar inferencias en tiempo real (Hart et al., 2020). Estos procesos podrían ser los que subyacen a síntomas positivos como los delirios en los que las inferencias conducen sistemáticamente a información errónea. Además, daños en esta región han sido relacionados con “confusiones de realidad” como dificultades para saber qué pensamientos pertenecen a la realidad (Thézé et al., 2019).

La exposición a LPS en ambos sexos provocó una disminución de la expresión de un elevado número de genes, muchos de ellos relacionados con las sinapsis y la proyección neuronal. Entre ellos encontramos a varios receptores de glutamato metabotrópicos y subunidades de receptores ionotrópicos como NMDA, AMPA y de kainato. En el caso de los metabotrópicos, encontramos disminuida la expresión de *Grm2*, *Grm3* y *Grm5* en machos y *Grm5* y *Grm8* en hembras. Alteraciones de estos receptores en corteza prefrontal o polimorfismos se han relacionado con la

esquizofrenia en estudios genéticos o postmortem (Kinoshita et al., 2015; Mössner et al., 2008; H. Y. Wang et al., 2020; Zhang et al., 2014), a excepción de *GRM2* para el que no se ha encontrado esta asociación (Dean et al., 2019; Tsunoka et al., 2010). En cuanto a los receptores NMDA, observamos una regulación a la baja de los genes *Grin2a* y *Grin3a* en ambos sexos. Como se ha comentado en la introducción, la hipofunción de los receptores de glutamato NMDA se ha propuesto como uno de los mecanismos patogénicos de la esquizofrenia (Nakazawa & Sapkota, 2020; Negrete-Díaz et al., 2022). Respecto a los receptores AMPA, en los machos se apreció una disminución de la expresión de *Gria1*, *Gria2* y *Gria3*, mientras que en las hembras esta disminución solo se encontró en *Gria1*. En ratones se ha visto que un bloqueo completo o *knockout* (KO) de la subunidad *Gria1* de los receptores AMPA produce ciertos déficits en la habituación (Barkus et al., 2014). En la esquizofrenia se dan alteraciones similares en la habituación que pueden equipararse con déficits en el filtrado preatencional que ocurren en la PPI ante un estímulo sonoro repetido (Ludewig et al., 2003). Además, disminuciones de la expresión de *Gria2* y polimorfismos de *Gria3* se han relacionado con la esquizofrenia (Magri et al., 2008; Vawter et al., 2002). Referente a las subunidades de los receptores de kainato, encontramos, en machos, una disminución de la expresión de *Grik2* y, en hembras, una disminución de *Grik3*. En pacientes de esquizofrenia, los resultados son contradictorios, con estudios de unión indicando incrementos, disminuciones o ausencia de cambios en estas subunidades (Meador-Woodruff et al., 2001; Rubio et al., 2012). La exposición a THC durante la adolescencia, tan solo produjo una disminución de la expresión de *Grm7* cuyas mutaciones se han asociado con alteraciones en el neurodesarrollo debido a su control del crecimiento axonal (Song et al., 2021). Sorprendentemente, la combinación de AIM y THC en la adolescencia, en los machos, provocó la regulación al alza de *Grin2a* y *Grik3* y a la baja en el caso de *Grm2* sugiriendo una reversión de los cambios en este sentido mediada por el THC. Esta hipótesis se ve reforzada al comparar el efecto de los dos impactos con el de la exposición a LPS, donde se ve una regulación al alza de los genes *Grin2a*, *Grin3a*, *Gria1*, *Gria2*, *Grik2*, *Grik3*, *Grm1*, *Grm3* y *Grm5*. En las hembras, el THC también suaviza los efectos del LPS, aunque en menor medida ya que se sigue apreciando una regulación a la baja de *Grm2*, *Grm5* y *Grik3*. Al igual que en los machos, la comparación de la combinación de efectos con la exposición a LPS se observan regulaciones al alza en *Grin2a* y *Grik3*, aunque no en *Grm2* que es regulado a la baja.

En conjunto, estos resultados parecen sugerir que el LPS, en corteza orbitofrontal, disminuye la expresión de numerosos genes y subunidades de los receptores glutamatérgicos relacionados con la esquizofrenia. En cambio, la exposición a THC durante la adolescencia no produce estos cambios y parece tener un papel protector frente a ellos.

Los receptores serotoninérgicos son la base de la hipótesis serotoninérgica de la esquizofrenia. Esta hipótesis, ya comentada, está basada en una sobreexpresión de los receptores 5-HT_{2A} o una excesiva liberación de serotonina en corteza. La exposición a LPS disminuyó los niveles de expresión de *Htr2a* y *Htr2c* en ambos sexos *Htr1b* y *Htr6* solo en hembras. El bloqueo de estos receptores es utilizado como mecanismo terapéutico por los antipsicóticos atípicos (Kusumi et al., 2015), a excepción de *Htr1b* (Hong et al., 2004; López-Figueroa et al., 2004). De manera similar

a los receptores glutamatérgicos, el THC no provocó cambios por sí solo, pero revirtió parte de los cambios causados por la exposición a LPS. Al comparar la combinación de impactos con el efecto del LPS se observó una regulación al alza de *Htr2c* en ambos sexos y *Htr2a*, *Htr1a* y *Htr5a* solo en los machos. Por otro lado, la expresión del gen monoamina oxidasa a (*Maoa*) también se encuentra disminuida en machos LPS, pero no en la combinación de impactos. Estos resultados, de manera contraria a la hipótesis serotoninérgica parecen indicar que la exposición a LPS durante la gestación produce una disminución de serotonina en la corteza orbitofrontal.

En conjunto, los datos de la presente tesis doctoral no parecen apoyar de manera clara los posibles efectos desencadenantes del THC sobre los dominios conductuales examinados, aunque sí que parecen darse cambios a nivel transcriptómico y de función cerebral que sustentarian una interesante interacción. En concreto, el THC parece revertir parcialmente los efectos de la AIM. En este sentido sería interesante realizar estudios que permitan estudiar esta hipotética reversión durante la vida del individuo con pruebas comportamentales previas y posteriores a la administración de THC.

CONCLUSIONES

1. No se encontraron efectos sinérgicos ni combinados derivados de la exposición a LPS prenatal y THC durante la adolescencia en las pruebas de síntomas similares a cognitivos, negativos o positivos.
2. La exposición a LPS durante la gestación provoca déficits cognitivos y alteraciones sociales en determinadas condiciones del filtrado preatencional, la memoria de trabajo y las interacciones sociales.
3. A nivel conductual, la exposición a THC durante la gestación únicamente causó déficits en la preferencia por la novedad social.
4. La pérdida de peso materna tras la exposición a LPS se correlaciona con peores puntuaciones de la descendencia en pruebas de comportamiento cognitivas, sociales y de anhedonia.
5. La exposición prenatal a LPS produce, al inicio de la etapa adulta, una reducción en la actividad metabólica de hipotálamo y cerebro medio en hembras que desaparece con la edad. También causa una disminución de actividad en los colículos en ambos sexos que se mantiene en el tiempo.
6. La combinación de activación inmune prenatal y exposición a THC durante la adolescencia produce alteraciones diferentes, en función del sexo, en la expresión de genes del sistema inmune de las PBMC.
7. La exposición a LPS durante la gestación produce una disminución generalizada de la expresión de los receptores glutamatérgicos y serotoninérgicos durante la etapa adulta en corteza orbitofrontal.
8. La exposición a dosis crecientes de THC durante la adolescencia revierte parcialmente los efectos de la exposición a LPS prenatal en la expresión de numerosos genes de corteza orbitofrontal durante la etapa adulta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, M. W., Larsen, N., Grove, J., Norgaard-Pedersen, B., Thorsen, P., Mortensen, E. L., & Hougaard, D. M. (2013). Amniotic fluid inflammatory cytokines: Potential markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *World Journal of Biological Psychiatry*, *14*(7), 528–538. <https://doi.org/10.3109/15622975.2011.639803>
- Abdallah, M. W., Larsen, N., Grove, J., Nørgaard-Pedersen, B., Thorsen, P., Mortensen, E. L., & Hougaard, D. M. (2012). Amniotic fluid chemokines and autism spectrum disorders: An exploratory study utilizing a Danish Historic Birth Cohort. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(1), 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.09.003>
- Abela, A. R., Rahbarnia, A., Wood, S., Lê, A. D., & Fletcher, P. J. (2019). Adolescent exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol delays acquisition of paired-associates learning in adulthood. *Psychopharmacology*, *236*(6), 1875–1886. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-5171-1>
- Adinoff, B. (2004). Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harvard Review of Psychiatry*, *12*(6), 305–320. <https://doi.org/10.1080/10673220490910844>
- Agorastos, A., Pervanidou, P., Chrousos, G. P., & Baker, D. G. (2019). Developmental trajectories of early life stress and trauma: A narrative review on neurobiological aspects beyond stress system dysregulation. *Frontiers in Psychiatry*, *10*(118). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00118>
- Albus, M., Hubmann, W., Scherer, J., Dreikorn, B., Hecht, S., Sobizack, N., & Mohr, F. (2002). A prospective 2-year follow-up study of neurocognitive functioning in patients with first-episode schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *252*(6), 262–267. <https://doi.org/10.1007/s00406-002-0391-4>
- Alizadeh, F., Davoodian, N., Kazemi, H., Ghasemi-Kasman, M., & Shaerzadeh, F. (2020). Prenatal zinc supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced behavioral impairments in maternal immune activation model. *Behavioural Brain Research*, *377*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112247>
- American Psychiatric Association. (2022). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425787>
- Anderson, C. K., & Brossay, L. (2016). The role of MHC class Ib-restricted T cells during infection. *Immunogenetics*, *68*(8), 677–691. <https://doi.org/10.1007/s00251-016-0932-z>
- Andersson, J., Nagy, S., Björk, L., Abrams, J., Holm, S., & Andersson, U. (1992). Bacterial Toxin-Induced Cytokine Production Studied at the Single-Cell Level. *Immunological Reviews*, *127*(1), 69–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1992.tb01409.x>
- Andréasson, S., Engström, A., Allebeck, P., & Rydberg, U. (1987). CANNABIS AND SCHIZOPHRENIA A Longitudinal Study of Swedish Conscripts. *The Lancet*, *330*(8574), 1483–1486. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92620-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92620-1)
- Arsenault, D., St-Amour, I., Cisbani, G., Rousseau, L. S., & Cicchetti, F. (2014). The different effects of LPS and poly I: C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, *38*, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.016>
- Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A., & Moffitt, T. E. (2002). Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: Longitudinal prospective study. *British Medical Journal*, *325*(7374), 1212–1213. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7374.1212>
- Avagliano, L., Massa, V., George, T. M., Qureshy, S., Bulfamante, G. Pietro, & Finnell, R. H. (2019). Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. *Birth Defects Research*, *111*(19), 1455–1467. <https://doi.org/10.1002/BDR2.1380>
- Baharoori, M., Bhardwaj, S. K., & Srivastava, L. K. (2012). Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: A prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophrenia Bulletin*, *38*(3), 444–456. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq098>
- Baharoori, M., Bhardwaj, S. K., & Srivastava, L. K. (2013). Effect of Maternal Lipopolysaccharide Administration on the Development of Dopaminergic Receptors and Transporter in the Rat

- Offspring. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054439>
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., & Lantos, P. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121(5), 889–905. <https://doi.org/10.1093/brain/121.5.889>
- Bakos, J., Duncko, R., Makatsori, A., Pirnik, Z., Kiss, A., & Jezova, D. (2004). Prenatal immune challenge affects growth, behavior, and brain dopamine in offspring. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018, 281–287. <https://doi.org/10.1196/annals.1296.033>
- Bangalore, S. S., Prasad, K. M. R., Montrose, D. M., Goradia, D. D., Diwadkar, V. A., & Keshavan, M. S. (2008). Cannabis use and brain structural alterations in first episode schizophrenia - A region of interest, voxel based morphometric study. *Schizophrenia Research*, 99(1–3), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.11.029>
- Bao, M., Hofsink, N., & Plösch, T. (2022). LPS vs. Poly I:C Model: Comparison of Long-Term Effects of Bacterial and Viral Maternal Immune Activation (MIA) on the Offspring. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 322(2). <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00087.2021>
- Barkus, C., Sanderson, D. J., Rawlins, J. N. P., Walton, M. E., Harrison, P. J., & Bannerman, D. M. (2014). What causes aberrant salience in schizophrenia? A role for impaired short-term habituation and the GRIA1 (GluA1) AMPA receptor subunit. *Molecular Psychiatry*, 19(10), 1060–1070. <https://doi.org/10.1038/MP.2014.91>
- Bassett, A. S. (1991). Linkage analysis of schizophrenia: challenges and promise. *Social Biology*, 38(3–4), 189–196. <https://doi.org/10.1080/19485565.1991.9988787>
- Bassett, A. S., & Chow, E. W. C. (2008). Schizophrenia and 22q11.2 deletion syndrome. *Current Psychiatry Reports*, 10(2), 148–157. <https://doi.org/10.1007/s11920-008-0026-1>
- Basta-Kaim, A., Budziszewska, B., Leśkiewicz, M., Fijał, K., Regulaska, M., Kubera, M., Wędzony, K., & Lasoń, W. (2011). Hyperactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in lipopolysaccharide-induced neurodevelopmental model of schizophrenia in rats: Effects of antipsychotic drugs. *European Journal of Pharmacology*, 650(2–3), 586–595. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.083>
- Basta-Kaim, A., Fijał, K., Budziszewska, B., Regulaska, M., Leśkiewicz, M., Kubera, M., Gołmbiowska, K., Lasoń, W., & Wędzony, K. (2011). Prenatal lipopolysaccharide treatment enhances MK-801-induced psychotomimetic effects in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(2), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.026>
- Basta-Kaim, A., Szczęeny, E., Leśkiewicz, M., Głombik, K., Ślusarczyk, J., Budziszewska, B., Regulaska, M., Kubera, M., Nowak, W., Wędzony, K., & Lasoń, W. (2012). Maternal immune activation leads to age-related behavioral and immunological changes in male rat offspring - The effect of antipsychotic drugs. *Pharmacological Reports*, 64(6), 1400–1410. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70937-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70937-4)
- Batinić, B., Santrač, A., Divović, B., Timić, T., Stanković, T., Obradović, A. L., Joksimović, S., & Savić, M. M. (2016). Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. *Behavioural Brain Research*, 299, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.025>
- Batinić, B., Santrač, A., Jančić, I., Li, G., Vidojević, A., Marković, B., Cook, J. M., & Savić, M. M. (2017). Positive modulation of $\alpha 5$ GABAA receptors in preadolescence prevents reduced locomotor response to amphetamine in adult female but not male rats prenatally exposed to lipopolysaccharide. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 61, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.06.001>
- Bayer, T. A., Falkai, P., & Maier, W. (1999). Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: The basis of the “Two hit hypothesis.” *Journal of Psychiatric Research*, 33(6), 543–548. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(99\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(99)00039-4)
- Becker, A., Grecksch, G., Bernstein, H. G., Höllt, V., & Bogerts, B. (1999). Social behaviour in rats

- lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: Quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology*, 144(4), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s002130051015>
- Belzung, C., & Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/2045-5380-1-9>
- Benros, M. E., Mortensen, P. B., & Eaton, W. W. (2012). Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1262(1), 56–66. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06638.x>
- Berger, S., Ronovsky, M., Horvath, O., Berger, A., & Pollak, D. D. (2018). Impact of maternal immune activation on maternal care behavior, offspring emotionality and intergenerational transmission in C3H/He mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 70, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.008>
- Bioque, M., García-Bueno, B., MacDowell, K. S., Meseguer, A., Saiz, P. A., Parellada, M., Gonzalez-Pinto, A., Rodriguez-Jimenez, R., Lobo, A., Leza, J. C., & Bernardo, M. (2013). Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 38(13), 2568–2577. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.165>
- Biswas, B., Narmadha, G., Choudhary, M., French, F. S., Hall, S. H., & Yenugu, S. (2009). Identification of toll-like receptors in the rat (*rattus norvegicus*): Messenger rna expression in the male reproductive tract under conditions of androgen variation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 62(4), 243–252. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00732.x>
- Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(6), 881–897. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>
- Bonner-Jackson, A., Grossman, L. S., Harrow, M., & Rosen, C. (2010). Neurocognition in schizophrenia: A 20-year multi-follow-up of the course of processing speed and stored knowledge. *Comprehensive Psychiatry*, 51(5), 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2010.02.005>
- Borgan, F., Laurikainen, H., Veronese, M., Marques, T. R., Haaparanta-Solin, M., Solin, O., Dahoun, T., Rogdaki, M., Salokangas, R. K. R., Karukivi, M., Di Forti, M., Turkheimer, F., Hietala, J., & Howes, O. (2019). In Vivo Availability of Cannabinoid 1 Receptor Levels in Patients with First-Episode Psychosis. *JAMA Psychiatry*, 76(10), 1074–1084. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1427>
- Borrell, J., Vela, J. M., Arévalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., & Guaza, C. (2002). Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats: Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), 204–215. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00360-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00360-8)
- Bradbury, T. N., & Miller, G. A. (1985). Season of Birth in Schizophrenia. A Review of Evidence, Methodology, and Etiology. *Psychological Bulletin*, 98(3), 569–594. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.98.3.569>
- Bralet, M. C., Buchsbaum, M. S., DeCastro, A., Shihabuddin, L., & Mitelman, S. A. (2016). FDG-PET scans in patients with Kraepelinian and non-Kraepelinian schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 266(6), 481–494. <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0633-x>
- Brethibat, J. L., Bluthé, R. M., Kent, S., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (1995). Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. *Brain Behavior and Immunity*, 9(3), 242–246. <https://doi.org/10.1006/brbi.1995.1023>
- Bronson, S. L., Ahlbrand, R., Horn, P. S., Kern, J. R., & Richtand, N. M. (2011). Individual differences in maternal response to immune challenge predict offspring behavior: Contribution of environmental factors. *Behavioural Brain Research*, 220(1), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.12.040>
- Brown, A. S. (2000). Prenatal Infection and Adult Schizophrenia: A Review and Synthesis.

- International Journal of Mental Health*, 29(4), 22–37.
<https://doi.org/10.1080/00207411.2000.11449501>
- Brown, A. S., Begg, M. D., Gravenstein, S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Bresnahan, M., Babulas, V. P., & Susser, E. S. (2004). Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 61(8), 774–780.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.8.774>
- Brown, A. S., Cohen, P., Harkavy-Friedman, J., Babulas, V., Malaspina, D., Gorman, J. M., & Susser, E. S. (2001). Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 49(6), 473–486. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01068-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01068-X)
- Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *The American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280.
<https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2009.09030361>
- Brown, A. S., Hooton, J., Schaefer, C. A., Zhang, H., Petkova, E., Babulas, V., Perrin, M., Gorman, J. M., & Susser, E. S. (2004). Elevated Maternal Interleukin-8 Levels and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring. *American Journal of Psychiatry*, 161(5), 889–895.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.5.889>
- Buka, S. L., Tsuang, M. T., Torrey, E. F., Klebanoff, M. A., Wagner, R. L., & Yolken, R. H. (2001). Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 15(4), 411–420. <https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0644>
- Burdick, K. E., Goldberg, J. F., Harrow, M., Faull, R. N., & Malhotra, A. K. (2006). Neurocognition as a stable endophenotype in bipolar disorder and schizophrenia. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 194(4), 255–260. <https://doi.org/10.1097/01.nmd.0000207360.70337.7e>
- Busquets-Garcia, A., Soria-Gómez, E., Ferreira, G., & Marsicano, G. (2017). Representation-mediated Aversion as a Model to Study Psychotic-like States in Mice. *Bio-Protocol*, 7(12).
<https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2358>
- Buuse, M., Garner, B., & Koch, M. (2005). Neurodevelopmental Animal Models of Schizophrenia: Effects on Prepulse Inhibition. *Current Molecular Medicine*, 3(5), 459–471.
<https://doi.org/10.2174/1566524033479627>
- Cabral, G. A., Raborn, E. S., Griffin, L., Dennis, J., & Marciano-Cabral, F. (2008). CB 2 receptors in the brain: Role in central immune function. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 240–251.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707584>
- Cadoni, C., Simola, N., Espa, E., Fenu, S., & Di Chiara, G. (2015). Strain dependence of adolescent Cannabis influence on heroin reward and mesolimbic dopamine transmission in adult Lewis and Fischer 344 rats. *Addiction Biology*, 20(1), 132–142. <https://doi.org/10.1111/adb.12085>
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35 Suppl.2, 101–111.
<https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Canetta, S., Sourander, A., Surcel, H. M., Hinkka-Yli-Salomäki, S., Leiviskä, J., Kellendonk, C., McKeague, I. W., & Brown, A. S. (2014). Elevated maternal C-reactive protein and increased risk of schizophrenia in a national birth cohort. *American Journal of Psychiatry*, 171(9), 960–968.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.13121579>
- Capellán, R., Moreno-Fernández, M., Orihuel, J., Roura-Martínez, D., Ucha, M., Ambrosio, E., & Higuera-Matas, A. (2022). Ex vivo 1H-MRS brain metabolic profiling in a two-hit model of neurodevelopmental disorders: Prenatal immune activation and peripubertal stress. *Schizophrenia Research*, 243, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.11.007>
- Capellán, R., Orihuel, J., Marcos, A., Ucha, M., Moreno-Fernández, M., Casquero-Veiga, M., Soto-Montenegro, M. L., Desco, M., Oteo-Vives, M., Ibáñez-Moragues, M., Magro-Calvo, N., Morcillo, M. Á., Ambrosio, E., & Higuera-Matas, A. (2023). Interaction between maternal immune activation and peripubertal stress in rats: impact on cocaine addiction-like behaviour, morphofunctional brain parameters and striatal transcriptome. *Translational Psychiatry*, 13(1), 84. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02378-6>

- Caron, M. J., Mottron, L., Rainville, C., & Chouinard, S. (2004). Do high functioning persons with autism present superior spatial abilities? *Neuropsychologia*, *42*(4), 467–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2003.08.015>
- Caspi, A., Moffitt, T. E., Cannon, M., McClay, J., Murray, R., Harrington, H. L., Taylor, A., Arseneault, L., Williams, B., Braithwaite, A., Poulton, R., & Craig, I. W. (2005). Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: Longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biological Psychiatry*, *57*(10), 1117–1127. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.026>
- Castle, D., & Murray, R. (2004). *Marijuana and madness* (Cambridge (ed.)).
- Cattabeni, F., & Di Luca, M. (1997). Developmental models of brain dysfunctions induced by targeted cellular ablations with methylazoxymethanol. *Physiological Reviews*, *77*(1), 199–215. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.1.199>
- Ceccarini, J., De Hert, M., Van Winkel, R., Peuskens, J., Bormans, G., Kranaster, L., Enning, F., Koethe, D., Leweke, F. M., & Van Laere, K. (2013). Increased ventral striatal CB1 receptor binding is related to negative symptoms in drug-free patients with schizophrenia. *NeuroImage*, *79*, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.04.052>
- Chambers, R. A., Moore, J., McEvoy, J. P., & Levin, E. D. (1996). Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *15*(6), 587–594. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00132-7)
- Chamera, K., Curzytek, K., Kamińska, K., Trojan, E., & Basta-Kaim, A. (2022). Quetiapine Ameliorates MIA-Induced Impairment of Sensorimotor Gating: Focus on Neuron-Microglia Communication and the Inflammatory Response in the Frontal Cortex of Adult Offspring of Wistar Rats. *Cells*, *11*(18). <https://doi.org/10.3390/cells11182788>
- Chamera, K., Szuster-Gluszczak, M., Trojan, E., & Basta-Kaim, A. (2020). Maternal Immune Activation Sensitizes Male Offspring Rats to Lipopolysaccharide-Induced Microglial Deficits Involving the Dysfunction of CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1 Systems. *Cells*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071676>
- Chang, Y. C., Li, W. Y., Lee, L. J. H., & Lee, L. J. (2020). Interplay of prenatal and postnatal risk factors in the behavioral and histological features of a “two-hit” non-genetic mouse model of schizophrenia. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21228518>
- Chase, K. A., Feiner, B., Rosen, C., Gavin, D. P., & Sharma, R. P. (2016). Characterization of peripheral cannabinoid receptor expression and clinical correlates in schizophrenia. *Psychiatry Research*, *245*, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.08.055>
- Chen, Y. J. J., Johnson, M. A., Lieberman, M. D., Goodchild, R. E., Schobel, S., Lewandowski, N., Rosoklija, G., Liu, R. C., Gingrich, J. A., Small, S., Moore, H., Dwork, A. J., Talmage, D. A., & Role, L. W. (2008). Type III neuregulin-1 is required for normal sensorimotor gating, memory-related behaviors, and corticostriatal circuit components. *Journal of Neuroscience*, *28*(27), 6872–6883. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1815-08.2008>
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S. S. V., Kim, H., Kim, S. S. V., Hoeffler, C. A., Littman, D. R., & Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, *351*(6276), 933–939. <https://doi.org/10.1126/science.aad0314>
- Chong, H. Y., Teoh, S. L., Wu, D. B. C., Kotirum, S., Chiou, C. F., & Chaiyakunapruk, N. (2016). Global economic burden of schizophrenia: A systematic review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *12*, 357–373. <https://doi.org/10.2147/NDT.S96649>
- Conrad, C. D., Lupien, S. J., Thanasoulis, L. C., & McEwen, B. S. (1997). The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Research*, *759*(1), 76–83. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00236-9)
- Cossio, D., Stadler, H., Michas, Z., Johnston, C., & Lopez, H. H. (2020). Disrupting the endocannabinoid system in early adolescence negatively impacts sociability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *188*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172832>

- Coussons-Read, M. E., Okun, M. L., & Nettles, C. D. (2007). Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(3), 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.08.006>
- Coussons-Read, M. E., Okun, M. L., Schmitt, M. P., & Giese, S. (2005). Prenatal stress alters cytokine levels in a manner that may endanger human pregnancy. *Psychosomatic Medicine*, 67(4), 625–631. <https://doi.org/10.1097/01.psy.0000170331.74960.ad>
- Cox, M. M., Tucker, A. M., Tang, J., Talbot, K., Richer, D. C., Yeh, L., & Arnold, S. E. (2009). Neurobehavioral abnormalities in the dysbindin-1 mutant, sandy, on a C57BL/6J genetic background. *Genes, Brain and Behavior*, 8(4), 390–397. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00477.x>
- Coyle, J. T. (1996). The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harvard Review of Psychiatry*, 3(5), 241–253. <https://doi.org/10.3109/10673229609017192>
- Coyle, J. T. (2006). Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(4–6), 365–384. <https://doi.org/10.1007/S10571-006-9062-8>
- Coyle, P., Tran, N., Fung, J. N. T., Summers, B. L., & Rofe, A. M. (2009). Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. *Behavioural Brain Research*, 197(1), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.022>
- Crocq, M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223–228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/MCROCQ>
- Cui, K., Ashdown, H., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2009). Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophrenia Research*, 113(2–3), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.05.003>
- Culhane, J. F., Rauh, V., McCollum, K. F., Hogan, V. K., Agnew, K., & Wadhwa, P. D. (2001). Maternal stress is associated with bacterial vaginosis in human pregnancy. *Maternal and Child Health Journal*, 5(2), 127–134. <https://doi.org/10.1023/A:1011305300690>
- da Rosa, N., de Medeiros, F. D., de Oliveira, J., Laurentino, A. O. M., Peretti, E. M., Machado, R. S., Fortunato, J. J., & Petronilho, F. (2022). 6-Shogaol improves behavior and memory in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharide. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 82(1), 39–49. <https://doi.org/10.1002/jdn.10157>
- da Silveira, V. T., Medeiros, D. de C., Ropke, J., Guidine, P. A., Rezende, G. H., Moraes, M. F. D., Mendes, E. M. A. M., Macedo, D., Moreira, F. A., & de Oliveira, A. C. P. (2017). Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavioral and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 58, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.01.009>
- Dabbah-Assadi, F., Alon, D., Golani, I., Doron, R., Kremer, I., Beloosesky, R., & Shamir, A. (2019). The influence of immune activation at early vs late gestation on fetal NRG1-ErbB4 expression and behavior in juvenile and adult mice offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.002>
- Dada, T., Rosenzweig, J. M., Al Shammary, M., Firdaus, W., Al Rebh, S., Borbiev, T., Tekes, A., Zhang, J., Alqahtani, E., Mori, S., Pletnikov, M. V., Johnston, M. V., & Burd, I. (2014). Mouse model of intrauterine inflammation: Sex-specific differences in long-term neurologic and immune sequelae. *Brain, Behavior, and Immunity*, 38, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.014>
- Dalton, V. S., Long, L. E., Weickert, C. S., & Zavitsanou, K. (2011). Paranoid schizophrenia is characterized by increased CB 1 receptor binding in the dorsolateral prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 36(8), 1620–1630. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.43>
- Dalton, V. S., Verdurand, M., Walker, A., Hodgson, D. M., & Zavitsanou, K. (2012). Synergistic Effect between Maternal Infection and Adolescent Cannabinoid Exposure on Serotonin 5HT 1A Receptor Binding in the Hippocampus: Testing the “Two Hit” Hypothesis for the Development of Schizophrenia. *ISRN Psychiatry*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.5402/2012/451865>

- Davies, G., Welham, J., Chant, D., Torrey, E. F., & McGrath, J. (2003). A Systematic Review and Meta-analysis of Northern Hemisphere Season of Birth Studies in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 29(3), 587–593. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a007030>
- Davis, J., Eyre, H., Jacka, F. N., Dodd, S., Dean, O., McEwen, S., Debnath, M., McGrath, J., Maes, M., Amminger, P., McGorry, P. D., Pantelis, C., & Berk, M. (2016). A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 65, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.017>
- Dean, B., Duncan, C., & Gibbons, A. (2019). Changes in levels of cortical metabotropic glutamate 2 receptors with gender and suicide but not psychiatric diagnoses. *Journal of Affective Disorders*, 244, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.10.088>
- Debnath, M., Cannon, D. M., & Venkatasubramanian, G. (2013). Variation in the major histocompatibility complex [MHC] gene family in schizophrenia: associations and functional implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 42, 49–62. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2012.07.009>
- DeRosse, P., & Barber, A. D. (2021). Overlapping Neurobiological Substrates for Early-Life Stress and Resilience to Psychosis. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(2), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.09.003>
- Desbonnet, L., Konkoth, A., Laigneath, A., McKernan, D., Holleran, L., McDonald, C., Morris, D. W., Donohoe, G., & Kelly, J. (2022). Dual hit mouse model to examine the long-term effects of maternal immune activation and post-weaning social isolation on schizophrenia endophenotypes. *Behavioural Brain Research*, 430. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113930>
- Deslauriers, J., Larouche, A., Sarret, P., & Grignon, S. (2013). Combination of prenatal immune challenge and restraint stress affects prepulse inhibition and dopaminergic/GABAergic markers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.05.006>
- Deslauriers, J., Racine, W., Sarret, P., & Grignon, S. (2014). Preventive effect of α -lipoic acid on prepulse inhibition deficits in a juvenile two-hit model of schizophrenia. *Neuroscience*, 272, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.061>
- Devane, W. A., Breuer, A., Sheskin, T., Järbe, T. U. C., Eisen, M. S., Mechoulam, R., & Järbe, T. U. C. (1992). A Novel Probe for the Cannabinoid Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(11), 2065–2069. <https://doi.org/10.1021/jm00089a018>
- Dhein, S. (2020). Different Effects of Cannabis Abuse on Adolescent and Adult Brain. *Pharmacology*, 105(11–12), 609–617. <https://doi.org/10.1159/000509377>
- Di Marzo, V., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (2005). The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168(168), 147–185. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_5
- Ding, S., Hu, Y., Luo, B., Cai, Y., Hao, K., Yang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Ding, M., Zhang, H., Li, W., & Lv, L. (2019). Age-related changes in neuroinflammation and prepulse inhibition in offspring of rats treated with Poly I:C in early gestation. *Behavioral and Brain Functions*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12993-019-0154-2>
- Divac, N., Prostran, M., Jakovcevski, I., & Cerovac, N. (2014). Second-generation antipsychotics and extrapyramidal adverse effects. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/656370>
- Dodd, S., F. Carvalho, A., Puri, B. K., Maes, M., Bortolaschi, C. C., Morris, G., & Berk, M. (2021). Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1): A new drug target for psychiatry? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 120, 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.028>
- Domínguez Rubio, A. P., Correa, F., Aisemberg, J., Dorfman, D., Bariani, M. V., Rosenstein, R. E., Zorrilla Zubilete, M., & Franchi, A. M. (2017). Maternal administration of melatonin exerts short- and long-term neuroprotective effects on the offspring from lipopolysaccharide-treated mice. *Journal of Pineal Research*, 63(4). <https://doi.org/10.1111/jpi.12439>

- Dowling, D. J., & Levy, O. (2014). Ontogeny of early life immunity. *Trends in Immunology*, *35*(7), 299–310. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2014.04.007>
- Eaton, W. W., Byrne, M., Ewald, H., Mors, O., Chen, C. Y., Agerbo, E., & Mortensen, P. B. (2006). Association of schizophrenia and autoimmune diseases: Linkage of Danish national registers. *American Journal of Psychiatry*, *163*(3), 521–528. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.3.521>
- Eggen, S. M., Hashimoto, T., & Lewis, D. A. (2008). Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *65*(7), 772–784. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.65.7.772>
- Eisenstein, T. K., & Meissler, J. J. (2015). Effects of Cannabinoids on T-cell Function and Resistance to Infection. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *10*(2), 204–216. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9603-3>
- Elemam, N. M., Talaat, I. M., & Maghazachi, A. A. (2022). CXCL10 Chemokine: A Critical Player in RNA and DNA Viral Infections. *Viruses*, *14*(11). <https://doi.org/10.3390/V14112445>
- Elkis, H., & Buckley, P. F. (2016). Treatment-Resistant Schizophrenia. *Psychiatric Clinics of North America*, *39*(2), 239–265. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2016.01.006>
- Ellegood, J., Markx, S., Lerch, J. P., Steadman, P. E., Genç, C., Provenzano, F., Kushner, S. A., Henkelman, R. M., Karayiorgou, M., & Gogos, J. A. (2014). Neuroanatomical phenotypes in a mouse model of the 22q11.2 microdeletion. *Molecular Psychiatry*, *19*(1), 99–107. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.112>
- Ellgren, M., Spano, S. M., & Hurd, Y. L. (2007). Adolescent cannabis exposure alters opiate intake and opioid limbic neuronal populations in adult rats. *Neuropsychopharmacology*, *32*(3), 607–615. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301127>
- Escobar, M., Crouzin, N., Cavalier, M., Quentin, J., Roussel, J., Lanté, F., Batista-Novais, A. R., Cohen-Solal, C., De Jesus Ferreira, M. C., Guiramand, J., Barbanel, G., & Vignes, M. (2011). Early, time-dependent disturbances of hippocampal synaptic transmission and plasticity after in utero immune challenge. *Biological Psychiatry*, *70*(10), 992–999. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.009>
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, *353*(6301), 772–777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
- Estes, M. L., Prendergast, K., MacMahon, J. A., Cameron, S., Paul Aboubechara, J., Farrelly, K., Sell, G. L., Haapanen, L., Schauer, J. D., Horta, A., Shaffer, I. C., Le, C. T., Kincheloe, G. N., Tan, D. J., van der List, D., Bauman, M. D., Carter, C. S., Van de Water, J., & McAllister, A. K. (2020). Baseline immunoreactivity before pregnancy and poly(I:C) dose combine to dictate susceptibility and resilience of offspring to maternal immune activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *88*, 619–630. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.061>
- Eyles, D. W. (2021). How do established developmental risk-factors for schizophrenia change the way the brain develops? *Translational Psychiatry*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41398-021-01273-2>
- Faraday, M. M. (2002). Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiology and Behavior*, *75*(4), 507–522. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00645-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00645-5)
- Farrell, M. S., Werge, T., Sklar, P., Owen, M. J., Ophoff, R. A., O'donovan, M. C., Corvin, A., Cichon, S., & Sullivan, P. F. (2015). Evaluating historical candidate genes for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *20*(5), 555–562. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.16>
- Featherstone, R. E., Rizos, Z., Kapur, S., & Fletcher, P. J. (2008). A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behavioural Brain Research*, *189*(1), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.032>
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, *180*(6), 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Flagstad, P., Mørk, A., Glenthøj, B. Y., Van Beek, J., Michael-Titus, A. T., & Didriksen, M. (2004). Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant

- to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 29(11), 2052–2064. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300516>
- Fofie, A. E., Fewell, J. E., & Moore, S. L. (2005). Pregnancy influences the plasma cytokine response to intraperitoneal administration of bacterial endotoxin in rats. *Experimental Physiology*, 90(1), 95–101. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.028613>
- Foley, K. A., MacFabe, D. F., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. P. (2015). Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide, and prenatal and postnatal exposure to propionic acid, on acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorders. *Behavioural Brain Research*, 278, 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.032>
- Fortier, M. È., Jooper, R., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2004). Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *Journal of Psychiatric Research*, 38(3), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2003.10.001>
- Fortunati, R., Ossola, P., Camerlengo, A., Bettini, E., De Panfilis, C., Tonna, M., Maggini, C., & Marchesi, C. (2015). Anhedonia in schizophrenia: The role of subjective experiences. *Comprehensive Psychiatry*, 62, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2015.07.011>
- Fortunato, J. J., da Rosa, N., Martins Laurentino, A. O., Goulart, M., Michalak, C., Borges, L. P., da Cruz Cittadin Soares, E., Reis, P. A., de Castro Faria Neto, H. C., & Petronilho, F. (2017). Effects of ω -3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharides. *Nutrition*, 35, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.10.019>
- Frye, G. D., & Breese, G. R. (1981). An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. *Psychopharmacology*, 75(4), 372–379. <https://doi.org/10.1007/BF00435856>
- Fu, B., Tian, Z., & Wei, H. (2014). TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. *Cellular and Molecular Immunology*, 11(6), 564–570. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.54>
- Fusar-Poli, P., Deste, G., Smieskova, R., Barlati, S., Yung, A. R., Howes, O., Stieglitz, R. D., Vita, A., McGuire, P., & Borgwardt, S. (2012). Cognitive functioning in prodromal psychosis: A meta-analysis. *Archives of General Psychiatry*, 69(6), 562–571. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.1592>
- Gałecka, M., Bliźniewska-Kowalska, K., Maes, M., Su, K. P., & Gałecki, P. (2021). Update on the neurodevelopmental theory of depression: is there any 'unconscious code'? *Pharmacological Reports*, 73(2), 346–356. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00202-2>
- Gao, H., Zhang, Q., Chen, J., Cooper, D. K. C., Hara, H., Chen, P., Wei, L., Zhao, Y., Xu, J., Li, Z., Cai, Z., Luan, S., & Mou, L. (2018). Porcine IL-6, IL-1 β , and TNF- α regulate the expression of pro-inflammatory-related genes and tissue factor in human umbilical vein endothelial cells. *Xenotransplantation*, 25(5). <https://doi.org/10.1111/xen.12408>
- Garcia-Mompo, C., Curto, Y., Carceller, H., Gilabert-Juan, J., Rodriguez-Flores, E., Guirado, R., & Nacher, J. (2020). Δ -9-Tetrahydrocannabinol treatment during adolescence and alterations in the inhibitory networks of the adult prefrontal cortex in mice subjected to perinatal NMDA receptor antagonist injection and to postweaning social isolation. *Translational Psychiatry*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0853-3>
- Garcia-Partida, J. A., Torres-Sanchez, S., MacDowell, K., Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Soto-Montenegro, M. L., Romero-Miguel, D., Lamanna-Rama, N., Leza, J. C., Desco, M., & Berrocoso, E. (2022). The effects of mango leaf extract during adolescence and adulthood in a rat model of schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.886514>
- Ghimire, S., Mantziou, V., Moris, N., & Martinez Arias, A. (2021). Human gastrulation: The embryo and its models. *Developmental Biology*, 474, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.01.006>
- Gilbert, S. F. (2003). *Developmental Biology* (7th ed). Sinauer Associates Inc.

- Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Feldon, J., Riva, M. A., Schedlowski, M., & Meyer, U. (2016). Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 6(4). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.38>
- Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Voget, M., Willi, R., Winter, C., Riva, M. A., Mortensen, P. B., Schedlowski, M., & Meyer, U. (2013). Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science*, 339(6123), 1100–1102. <https://doi.org/10.1126/science.1228261>
- Giuffrida, A., Leweke, F. M., Gerth, C. W., Schreiber, D., Koethe, D., Faulhaber, J., Klosterkötter, J., & Piomelli, D. (2004). Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology*, 29(11), 2108–2114. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300558>
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P. A., Nguyen, K. T., Lee, J. E., Tilders, F. J. H., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (1999). Interleukin-1 β in immune cells of the abdominal vagus nerve: A link between the immune and nervous systems? *Journal of Neuroscience*, 19(7), 2799–2806. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-07-02799.1999>
- Gogos, A., Sbisà, A., Witkamp, D., & van den Buuse, M. (2020). Sex differences in the effect of maternal immune activation on cognitive and psychosis-like behaviour in Long Evans rats. *European Journal of Neuroscience*, 52(1), 2614–2626. <https://doi.org/10.1111/ejn.14671>
- Goines, P. E., Croen, L. A., Braunschweig, D., Yoshida, C. K., Grether, J., Hansen, R., Kharrazi, M., Ashwood, P., & Van De Water, J. (2011). Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Molecular Autism*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-13>
- Gomes, F. V., & Grace, A. A. (2021). Beyond dopamine receptor antagonism: New targets for schizophrenia treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094467>
- Gonzalez-Burgos, G., Cho, R. Y., & Lewis, D. A. (2015). Alterations in cortical network oscillations and parvalbumin neurons in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 77(12), 1031–1040. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.010>
- Gore-Langton, J. K., Flax, S. M., Pomfrey, R. L., Wetzell, B. B., & Riley, A. L. (2015). Measures of the aversive effects of drugs: A comparison of conditioned taste and place aversions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 134, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.002>
- Graciarena, M., Depino, A. M., & Pitossi, F. J. (2010). Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGF β 1 downregulation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(8), 1301–1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.06.005>
- Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2014). Neural tube defects. *Annual Review of Neuroscience*, 37, 221–242. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170354>
- Guerrin, C. G. J., Shoji, A., Doorduyn, J., & de Vries, E. F. J. (2022). Immune Activation in Pregnant Rats Affects Brain Glucose Consumption, Anxiety-like Behaviour and Recognition Memory in their Male Offspring. *Molecular Imaging and Biology*, 24(5), 740–749. <https://doi.org/10.1007/s11307-022-01723-3>
- Guma, E., Cupo, L., Ma, W., Gallino, D., Moquin, L., Gratton, A., Devenyi, G. A., & Chakravarty, M. M. (2023). Investigating the “two-hit hypothesis”: Effects of prenatal maternal immune activation and adolescent cannabis use on neurodevelopment in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110642>
- Gur, R. E., Cowell, P., Turetsky, B. I., Gallacher, F., Cannon, T., Bilker, W., & Gur, R. C. (1998). A follow-up magnetic resonance imaging study of schizophrenia: Relationship of neuroanatomical changes to clinical and neurobehavioral measures. *Archives of General Psychiatry*, 55(2), 145–152. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.2.145>
- Gurrera, R. J., Gearin, P. F., Love, J., Li, K. J., Xu, A., Donaghey, F. H., & Gerace, M. R. (2022). Recognition and management of clozapine adverse effects: A systematic review and qualitative

- synthesis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 145(5), 423–441. <https://doi.org/10.1111/acps.13406>
- Gzielo, K., Potasiewicz, A., Litwa, E., Piotrowska, D., Popik, P., & Nikiforuk, A. (2021). The effect of maternal immune activation on social play-induced ultrasonic vocalization in rats. *Brain Sciences*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/brainsci11030344>
- Haddad, F. L., Lu, L., Baines, K. J., & Schmid, S. (2020). Sensory filtering disruption caused by poly I:C - Timing of exposure and other experimental considerations. *Brain, Behavior, and Immunity - Health*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100156>
- Häfner, H., Maurer, K., Löffler, W., An Der Heiden, W., Munk-Jørgensen, P., Hambrecht, M., & Riecher-Rössler, A. (1998). The ABC schizophrenia study: A preliminary overview of the results. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 33(8), 380–386. <https://doi.org/10.1007/S001270050069/METRICS>
- Hahn, B. (2018). The Potential of Cannabidiol Treatment for Cannabis Users with Recent-Onset Psychosis. *Schizophrenia Bulletin*, 44(1), 46–53. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx105>
- Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., & Dale, R. C. (2021). Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neurology*, 17(9), 564–579. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00530-8>
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00504983>
- Hanna, R. C., Shalvoy, A., Cullum, C. M., Ivleva, E. I., Keshavan, M., Pearlson, G., Hill, S. K., Sweeney, J. A., Tamminga, C. A., & Ghose, S. (2016). Cognitive Function in Individuals with Psychosis: Moderation by Adolescent Cannabis Use. *Schizophrenia Bulletin*, 42(6), 1496–1503. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw030>
- Hart, E. E., Sharpe, M. J., Gardner, M. P. H., & Schoenbaum, G. (2020). Responding to preconditioned cues is devaluation sensitive and requires orbitofrontal cortex during cue-cue learning. *ELife*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.59998>
- Harvey, L., & Boksa, P. (2014). Additive effects of maternal iron deficiency and prenatal immune activation on adult behaviors in rat offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 40, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.005>
- Hatanaka, Y., Zhu, Y., Torigoe, M., Kita, Y., & Murakami, F. (2016). From migration to settlement: the pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 92(1), 1–19. <https://doi.org/10.2183/PJAB.92.1>
- He, L. W., Zeng, L., Tian, N., Li, Y., He, T., Tan, D. M., Zhang, Q., & Tan, Y. (2020). Optimization of food deprivation and sucrose preference test in SD rat model undergoing chronic unpredictable mild stress. *Animal Models and Experimental Medicine*, 3(1), 69–78. <https://doi.org/10.1002/ame2.12107>
- Heberle, H., Meirelles, V. G., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- Heilbronner, U., Samara, M., Leucht, S., Falkai, P., & Schulze, T. G. (2016). The Longitudinal Course of Schizophrenia Across the Lifespan: Clinical, Cognitive, and Neurobiological Aspects. *Harvard Review of Psychiatry*, 24(2), 118–128. <https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000092>
- Henquet, C., Krabbendam, L., Spauwen, J., Kaplan, C., Lieb, R., Wittchen, H. U., & Van Os, J. (2005). Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *British Medical Journal*, 330(7481), 11–14. <https://doi.org/10.1136/bmj.38267.664086.63>
- Hester, M. S., Tulina, N., Brown, A., Barila, G., & Elovitz, M. A. (2018). Intrauterine inflammation reduces postnatal neurogenesis in the hippocampal subgranular zone and leads to accumulation of hilar ectopic granule cells. *Brain Research*, 1685, 51–59.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.005>

- Higuera-Matas, A., Botreau, F., Miguéns, M., Del Olmo, N., Borcel, E., Pérez-Álvarez, L., García-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2009). Chronic periadolescent cannabinoid treatment enhances adult hippocampal PSA-NCAM expression in male Wistar rats but only has marginal effects on anxiety, learning and memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *93*(4), 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.06.013>
- Higuera-Matas, A., Ucha, M., & Ambrosio, E. (2015). Long-term consequences of perinatal and adolescent cannabinoid exposure on neural and psychological processes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *55*, 119–146. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.020>
- Himanshu, Dharmila, Sarkar, D., & Nutan. (2020). A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, *18*(3), 341–351. <https://doi.org/10.9758/CPN.2020.18.3.341>
- Hjorthøj, C., Stürup, A. E., McGrath, J. J., & Nordentoft, M. (2017). Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*, *4*(4), 295–301. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(17\)30078-0](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(17)30078-0)
- Holland, P. C. (1981). Acquisition of representation-mediated conditioned food aversions. *Learning and Motivation*, *12*(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90022-9)
- Hollins, S. L., Zavitsanou, K., Walker, F. R., & Cairns, M. J. (2014). Alteration of imprinted Dlk1-Dio3 miRNA cluster expression in the entorhinal cortex induced by maternal immune activation and adolescent cannabinoid exposure. *Translational Psychiatry*, *4*(9). <https://doi.org/10.1038/tp.2014.99>
- Hollins, S. L., Zavitsanou, K., Walker, F. R., & Cairns, M. J. (2016). Alteration of transcriptional networks in the entorhinal cortex after maternal immune activation and adolescent cannabinoid exposure. *Brain, Behavior, and Immunity*, *56*, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.021>
- Hong, C. J., Pan, G. M., & Tsai, S. J. (2004). Association study of onset age, attempted suicide, aggressive behavior, and schizophrenia with a serotonin 1B receptor (A-161T) genetic polymorphism. *Neuropsychobiology*, *49*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1159/000075330>
- Howland, J. G., Hannesson, D. K., & Phillips, A. G. (2004). Delayed onset of prepulse inhibition deficits following kainic acid treatment on postnatal day 7 in rats. *European Journal of Neuroscience*, *20*(10), 2639–2648. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03731.x>
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, *54*(2), 161–202. <https://doi.org/10.1124/PR.54.2.161>
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Chow, J., Mazmanian, S. K., & Patterson, P. H. (2012). Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12776–12781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202556109>
- Hu, Y., Hong, X. Y., Yang, X. F., Ma, R. H., Wang, X., Zhang, J. F., Feng, Q., Li, X. G., Sun, D. S., Li, X., Wan, H. L., Li, T., Wang, Q., Ke, D., Wang, J. Z., & Liu, G. P. (2019). Inflammation-dependent ISG15 upregulation mediates MIA-induced dendrite damages and depression by disrupting NEDD4/Rap2A signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1865*(6), 1477–1489. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.02.020>
- Hughes, R. N. (2004). The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*(5), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.006>
- Huot, P., Johnston, T. H., Darr, T., Hazrati, L. N., Visanji, N. P., Pires, D., Brotchie, J. M., & Fox, S. H. (2010). Increased 5-HT_{2A} receptors in the temporal cortex of Parkinsonian patients with visual hallucinations. *Movement Disorders*, *25*(10), 1399–1408. <https://doi.org/10.1002/mds.23083>
- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). (2020). *GBD 2019*. Seattle, WA: IHME, University

- of Washington, 2020. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>
- Ismail, F. Y., & Shapiro, B. K. (2019). What are neurodevelopmental disorders? *Current Opinion in Neurology*, 32(4), 611–616. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000710>
- Izvolkskaia, M. S., Tillet, Y., Sharova, V. S., Voronova, S. N., & Zakharova, L. A. (2016). Disruptions in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in rat offspring following prenatal maternal exposure to lipopolysaccharide. *Stress*, 19(2), 198–205. <https://doi.org/10.3109/10253890.2016.1149695>
- Jaaro-Peled, H. (2009). Gene models of schizophrenia: DISC1 mouse models. *Progress in Brain Research*, 179(C), 75–86. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17909-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17909-8)
- Jääskeläinen, E., Juola, P., Hirvonen, N., McGrath, J. J., Saha, S., Isohanni, M., Veijola, J., & Miettunen, J. (2013). A systematic review and meta-analysis of recovery in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 39(6), 1296–1306. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs130>
- Jauhar, S., Johnstone, M., & McKenna, P. J. (2022). Schizophrenia. *The Lancet*, 399(10323), 473–486. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01730-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01730-X)
- Jiang, N. M., Cowan, M., Moonah, S. N., & Petri, W. A. (2018). The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. *Trends in Molecular Medicine*, 24(9), 794–804. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2018.06.008>
- Jimenez Naranjo, C., Osborne, A. L., & Weston-Green, K. (2019). Effect of cannabidiol on muscarinic neurotransmission in the pre-frontal cortex and hippocampus of the poly I:C rat model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109640>
- Johnson, B. A., Smith, B. L., & Taylor, P. (1988). CANNABIS AND SCHIZOPHRENIA. *The Lancet*, 331(8585), 592–593. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)91389-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)91389-X)
- Jones, K. L., Croen, L. A., Yoshida, C. K., Heuer, L., Hansen, R., Zerbo, O., Delorenze, G. N., Kharrazi, M., Yolken, R., Ashwood, P., & Van De Water, J. (2017). Autism with intellectual disability is associated with increased levels of maternal cytokines and chemokines during gestation. *Molecular Psychiatry*, 22(2), 273–279. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.77>
- Jones, P. B., Barnes, T. R. E., Davies, L., Dunn, G., Lloyd, H., Hayhurst, K. P., Murray, R. M., Markwick, A., & Lewis, S. W. (2006). Randomized controlled trial of the effect on quality of life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia: Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study (CUtLASS 1). *Archives of General Psychiatry*, 63(10), 1079–1087. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.10.1079>
- Jongsma, H. E., Turner, C., Kirkbride, J. B., & Jones, P. B. (2019). International incidence of psychotic disorders, 2002–17: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Public Health*, 4(5), 229–244. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(19\)30056-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(19)30056-8)
- Juan, L. W., Liao, C. C., Lai, W. S., Chang, C. Y., Pei, J. C., Wong, W. R., Liu, C. M., Hwu, H. G., & Lee, L. J. (2014). Phenotypic characterization of C57BL/6J mice carrying the Disc1 gene from the 129S6/SvEv strain. *Brain Structure and Function*, 219(4), 1417–1431. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0577-8>
- Kadosh, K. C., Muhardi, L., Parikh, P., Basso, M., Mohamed, H. J. J., Prawitasari, T., Samuel, F., Ma, G., & Geurts, J. M. W. (2021). Nutritional support of neurodevelopment and cognitive function in infants and young children—an update and novel insights. *Nutrients*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/nu13010199>
- Kahn, R. S., & Keefe, R. S. E. (2013). Schizophrenia is a cognitive illness: Time for a change in focus. *JAMA Psychiatry*, 70(10), 1107–1112. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.155>
- Kahn, R. S., & Sommer, I. E. (2015). The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 84–97. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.66>
- Kalinichev, M., Robbins, M. J., Hartfield, E. M., Maycox, P. R., Moore, S. H., Savage, K. M., Austin, N. E., & Jones, D. N. C. (2008). Comparison between intraperitoneal and subcutaneous phencyclidine administration in Sprague-Dawley rats: A locomotor activity and gene induction

- study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(2), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.09.008>
- Kane, J., Honigfeld, G., Singer, J., & Meltzer, H. (1988). Clozapine for the Treatment-Resistant Schizophrenic: A Double-blind Comparison With Chlorpromazine. *Archives of General Psychiatry*, 45(9), 789–796. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1988.01800330013001>
- Kane, J. M., & Correll, C. U. (2010). Past and present progress in the pharmacologic treatment of schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry*, 71(9), 1115–1124. <https://doi.org/10.4088/JCP.10r06264yel>
- Kang, D. H., Kwon, K. W., Gu, B. M., Choi, J. S., Jang, J. H., & Kwon, J. S. (2008). Structural abnormalities of the right inferior colliculus in schizophrenia. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 164(2), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2007.12.023>
- Keeley, R. J., Trow, J., & McDonald, R. J. (2015). Strain and sex differences in puberty onset and the effects of THC administration on weight gain and brain volumes. *Neuroscience*, 305, 328–342. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.024>
- Kemper, T. L., & Bauman, M. (1998). Neuropathology of infantile autism. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(7), 645–652. <https://doi.org/10.1097/00005072-199807000-00001>
- Kendler, K. S. (1983). Overview: A current perspective on twin studies of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 140(11), 1413–1425. <https://doi.org/10.1176/ajp.140.11.1413>
- Kendler, K. S., & Diehl, S. R. (1993). The genetics of schizophrenia: A current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophrenia Bulletin*, 19(2), 261–285. <https://doi.org/10.1093/schbul/19.2.261>
- Kentner, A. C., Bilbo, S. D., Brown, A. S., Hsiao, E. Y., McAllister, A. K., Meyer, U., Pearce, B. D., Pletnikov, M. V., Yolken, R. H., & Bauman, M. D. (2019). Maternal immune activation: reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. *Neuropsychopharmacology*, 44(2), 245–258. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0185-7>
- Khandaker, G. M., Cousins, L., Deakin, J., Lennox, B. R., Yolken, R., & Jones, P. B. (2015). Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. *The Lancet. Psychiatry*, 2(3), 258–270. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(14\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(14)00122-9)
- Kilonzo, V. W., Sweet, R. A., Glausier, J. R., & Pitts, M. W. (2020). Deficits in glutamic acid decarboxylase 67 immunoreactivity, parvalbumin interneurons, and perineuronal nets in the inferior colliculus of subjects with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 46(5), 1053–1059. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa082>
- Kim, H. J., & Koh, H. Y. (2016). Impaired reality testing in mice lacking phospholipase Cβ1: Observed by persistent representation-mediated taste aversion. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146376>
- Kim, T., Thankachan, S., McKenna, J. T., McNally, J. M., Yang, C., Choi, J. H., Chen, L., Kocsis, B., Deisseroth, K., Strecker, R. E., Basheer, R., Brown, R. E., & McCarley, R. W. (2015). Cortically projecting basal forebrain parvalbumin neurons regulate cortical gamma band oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3535–3540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413625112>
- Kinoshita, A., Takizawa, R., Koike, S., Satomura, Y., Kawasaki, S., Kawakubo, Y., Marumo, K., Tochigi, M., Sasaki, T., Nishimura, Y., & Kasai, K. (2015). Effect of metabotropic glutamate receptor-3 variants on prefrontal brain activity in schizophrenia: An imaging genetics study using multi-channel near-infrared spectroscopy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 62, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.006>
- Kirsten, T. B., Taricano, M., Maiorka, P. C., Palermo-Neto, J., & Bernardi, M. M. (2010). Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *NeuroImmunoModulation*, 17(4), 240–251. <https://doi.org/10.1159/000290040>
- Klein, C., Karanges, E., Spiro, A., Wong, A., Spencer, J., Huynh, T., Gunasekaran, N., Karl, T., Long, L. E., Huang, X. F., Liu, K., Arnold, J. C., & McGregor, I. S. (2011). Cannabidiol potentiates Δ 9-

- tetrahydrocannabinol (THC) behavioural effects and alters THC pharmacokinetics during acute and chronic treatment in adolescent rats. *Psychopharmacology*, 218(2), 443–457. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2342-0>
- Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., Toovey, S., & Prinssen, E. P. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), 643–660. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.187>
- Koch, M. (1998). Sensorimotor gating changes across the estrous cycle in female rats. *Physiology and Behavior*, 64(5), 625–628. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00098-5)
- Koenigs, M., & Grafman, J. (2009). The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 201(2), 239–243. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2009.03.004>
- Korbecki, J., Bajdak-Rusinek, K., Kupnicka, P., Kapczuk, P., Simińska, D., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2021). The role of cxcl16 in the pathogenesis of cancer and other diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073490>
- Kreitz, S., Zambon, A., Ronovsky, M., Budinsky, L., Helbich, T. H., Sideromenos, S., Ivan, C., Konerth, L., Wank, I., Berger, A., Pollak, A., Hess, A., & Pollak, D. D. (2020). Maternal immune activation during pregnancy impacts on brain structure and function in the adult offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 83, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.09.011>
- Krueger, D. D., Howell, J. L., Hebert, B. F., Olausson, P., Taylor, J. R., & Nairn, A. C. (2006). Assessment of cognitive function in the heterozygous reeler mouse. *Psychopharmacology*, 189(1), 95–104. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0530-0>
- Kuepper, R., Van Os, J., Lieb, R., Wittchen, H. U., Höfler, M., & Henquet, C. (2011). Continued cannabis use and risk of incidence and persistence of psychotic symptoms: 10 Year follow-up cohort study. *BMJ*, 342(7796), 537. <https://doi.org/10.1136/bmj.d738>
- Kusumi, I., Boku, S., & Takahashi, Y. (2015). Psychopharmacology of atypical antipsychotic drugs: From the receptor binding profile to neuroprotection and neurogenesis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 69(5), 243–258. <https://doi.org/10.1111/pcn.12242>
- Labouesse, M. A., Langhans, W., & Meyer, U. (2015). Long-term pathological consequences of prenatal infection: Beyond brain disorders. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 309(1), R1–R12. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00087.2015>
- Labrie, V., Fukumura, R., Rastogi, A., Fick, L. J., Wang, W., Boutros, P. C., Kennedy, J. L., Semeralul, M. O., Lee, F. H., Baker, G. B., Belsham, D. D., Barger, S. W., Gondo, Y., Wong, A. H. C., & Roder, J. C. (2009). Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. *Human Molecular Genetics*, 18(17), 3227–3243. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp261>
- Lainiola, M., Procaccini, C., & Linden, A. M. (2014). MGLuR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behavioural Brain Research*, 266, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.008>
- Lally, J., & MacCabe, J. H. (2015). Antipsychotic medication in schizophrenia: A review. *British Medical Bulletin*, 114(1), 169–179. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv017>
- Lapiz, M. D. S., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., & Marsden, C. A. (2003). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33(1), 13–29. <https://doi.org/10.1023/A:1021171129766>
- Laruelle, M. (2014). Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. *Current Opinion in Pharmacology*, 14(1), 97–102. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2014.01.001>
- Lau, C. M., Broughton, C., Tabor, A. S., Akira, S., Flavell, R. A., Mamula, M. J., Christensen, S. R.,

- Shlomchik, M. J., Viglianti, G. A., Rifkin, I. R., & Marshak-Rothstein, A. (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(9), 1171–1177. <https://doi.org/10.1084/jem.20050630>
- Le Pen, G., Gourevitch, R., Hazane, F., Hoareau, C., Jay, T. M., & Krebs, M. O. (2006). Peri-pubertal maturation after developmental disturbance: A model for psychosis onset in the rat. *Neuroscience*, *143*(2), 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.004>
- Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J., & Marshak-Rothstein, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, *416*(6881), 603–607. <https://doi.org/10.1038/416603a>
- Lecca, S., Luchicchi, A., Scherma, M., Fadda, P., Muntoni, A. L., & Pistis, M. (2019). Δ 9-Tetrahydrocannabinol During Adolescence Attenuates Disruption of Dopamine Function Induced in Rats by Maternal Immune Activation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00202>
- Lee, A. J., Kandiah, N., Karimi, K., Clark, D. A., & Ashkar, A. A. (2013). Interleukin-15 is required for maximal lipopolysaccharide-induced abortion. *Journal of Leukocyte Biology*, *93*(6), 905–912. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912442>
- Lee, G. A., Lin, Y. K., Lai, J. H., Lo, Y. C., Yang, Y. C. S. H., Ye, S. Y., Lee, C. J., Wang, C. C., Chiang, Y. H., & Tseng, S. H. (2021). Maternal immune activation causes social behavior deficits and hypomyelination in male rat offspring with an autism-like microbiota profile. *Brain Sciences*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/brainsci11081085>
- Lee, J. Y., Song, H., Dash, O., Park, M., Shin, N. E., McLane, M. W., Lei, J., Hwang, J. Y., & Burd, I. (2019). Administration of melatonin for prevention of preterm birth and fetal brain injury associated with premature birth in a mouse model. *American Journal of Reproductive Immunology*, *82*(3). <https://doi.org/10.1111/aji.13151>
- Legge, S. E., Santoro, M. L., Periyasamy, S., Okewole, A., Arsalan, A., & Kowalec, K. (2021). Genetic architecture of schizophrenia: a review of major advancements. *Psychological Medicine*, *51*(13), 2168–2177. <https://doi.org/10.1017/S0033291720005334>
- Lehmann, J., Pryce, C. R., & Feldon, J. (1999). Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, *104*(1–2), 113–117. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00058-3)
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, *86*(6), 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Leweke, F. M., Giuffrida, A., Koethe, D., Schreiber, D., Nolden, B. M., Kranaster, L., Neatby, M. A., Schneider, M., Gerth, C. W., Hellmich, M., Klosterkötter, J., & Piomelli, D. (2007). Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: Impact of cannabis use. *Schizophrenia Research*, *94*(1–3), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.04.025>
- Lieberman, J. A., Stroup, T. S., McEvoy, J. P., Swartz, M. S., Rosenheck, R. A., Perkins, D. O., Keefe, R. S. E., Davis, S. M., Davis, C. E., Lebowitz, B. D., Severe, J., & Hsiao, J. K. (2005). Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia. *New England Journal of Medicine*, *353*(12), 1209–1223. <https://doi.org/10.1056/nejmoa051688>
- Lin, C. H., Lin, C. H., Chang, Y. C., Huang, Y. J., Chen, P. W., Yang, H. T., & Lane, H. Y. (2018). Sodium Benzoate, a D-Amino Acid Oxidase Inhibitor, Added to Clozapine for the Treatment of Schizophrenia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Biological Psychiatry*, *84*(6), 422–432. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.12.006>
- Lin, Y. L., & Wang, S. (2014). Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behavioural Brain Research*, *259*, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.034>
- Lins, B. R., Hurtubise, J. L., Roebuck, A. J., Marks, W. N., Zabder, N. K., Scott, G. A., Greba, Q., Dawicki, W., Zhang, X., Rudulier, C. D., Gordon, J. R., & Howland, J. G. (2018). Prospective

- analysis of the effects of maternal immune activation on rat cytokines during pregnancy and behavior of the male offspring relevant to Schizophrenia. *ENeuro*, 5(4).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0249-18.2018>
- Lins, B. R., Marks, W. N., Zabder, N. K., Greba, Q., & Howland, J. G. (2019). Maternal immune activation during pregnancy alters the behavior profile of female offspring of sprague dawley rats. *ENeuro*, 6(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0437-18.2019>
- Lipska, B. K., Jaskiw, G. E., & Weinberger, D. R. (1993). Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: A potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 9(1), 67–75.
<https://doi.org/10.1038/npp.1993.44>
- Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (1993). Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Developmental Brain Research*, 75(2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90026-7)
- Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (1994). Subchronic treatment with haloperidol and clozapine in rats with neonatal excitotoxic hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology*, 10(3), 199–205.
<https://doi.org/10.1038/npp.1994.22>
- López-Figueroa, A. L., Norton, C. S., López-Figueroa, M. O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., López, J. F., & Watson, S. J. (2004). Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 55(3), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.09.017>
- Lotter, J., Möller, M., Dean, O., Berk, M., & Harvey, B. H. (2020). Studies on Haloperidol and Adjunctive α -Mangostin or Raw Garcinia mangostana Linn Pericarp on Bio-Behavioral Markers in an Immune-Inflammatory Model of Schizophrenia in Male Rats. *Frontiers in Psychiatry*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00121>
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615.
<https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Lubman, D. I., Cheetham, A., & Yücel, M. (2015). Cannabis and adolescent brain development. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2014.11.009>
- Ludewig, K., Geyer, M. A., & Vollenweider, F. X. (2003). Deficits in prepulse inhibition and habituation in never-medicated, first-episode schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 54(2), 121–128.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01925-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01925-X)
- MacDowell, K. S., Munarriz-Cuevza, E., Meana, J. J., Leza, J. C., & Ortega, J. E. (2021). Paliperidone Reversion of Maternal Immune Activation-Induced Changes on Brain Serotonin and Kynurenine Pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.682602>
- Magri, C., Gardella, R., Valsecchi, P., Barlati, S. D., Guizzetti, L., Imperadori, L., Bonvicini, C., Tura, G. B., Gennarelli, M., Sacchetti, E., & Barlati, S. (2008). Study on GRIA2, GRIA3 and GRIA4 genes highlights a positive association between schizophrenia and GRIA3 in female patients. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147(6), 745–753.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30674>
- Malchow, B., Hasan, A., Fusar-Poli, P., Schmitt, A., Falkai, P., & Wobrock, T. (2013). Cannabis abuse and brain morphology in schizophrenia: a review of the available evidence. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 263(1), 3–13. <https://doi.org/10.1007/S00406-012-0346-3>
- Maleninska, K., Janikova, M., Radostova, D., Vojtechova, I., Petrasek, T., Kirdajova, D., Anderova, M., Svoboda, J., & Stuchlik, A. (2022). Selective deficits in attentional set-shifting in mice induced by maternal immune activation with poly(I:C). *Behavioural Brain Research*, 419.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113678>
- Malkova, N. V., Yu, C. Z., Hsiao, E. Y., Moore, M. J., & Patterson, P. H. (2012). Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.011>

- Mandolini, G. M., Lazzaretti, M., Pigoni, A., Oldani, L., Delvecchio, G., & Brambilla, P. (2018). Pharmacological properties of cannabidiol in the treatment of psychiatric disorders: a critical overview. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*, *27*(4), 327–335. <https://doi.org/10.1017/S2045796018000239>
- Manrique-Garcia, E., Zammit, S., Dalman, C., Hemmingsson, T., & Allebeck, P. (2012). Cannabis use and depression: a longitudinal study of a national cohort of Swedish conscripts. *BMC Psychiatry*, *12*(112). <https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-112>
- Mansbach, R. S., & Geyer, M. A. (1989). Effects of phencyclidine and phencyclidine biologs on sensorimotor gating in the rat. *Neuropsychopharmacology*, *2*(4), 299–308. [https://doi.org/10.1016/0893-133x\(89\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0893-133x(89)90035-3)
- Mathieson, I., Munafò, M. R., & Flint, J. (2012). Meta-analysis indicates that common variants at the DISC1 locus are not associated with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *17*(6), 634–641. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.41>
- Matias, I., & Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *18*(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.006>
- Matsumoto, M., & Seya, T. (2008). TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(7), 805–812. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.11.005>
- McCutcheon, R. A., Abi-Dargham, A., & Howes, O. D. (2019). Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. *Trends in Neurosciences*, *42*(3), 205–220. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.12.004>
- McCutcheon, R. A., Reis Marques, T., & Howes, O. D. (2020). Schizophrenia - An Overview. *JAMA Psychiatry*, *77*(2), 201–210. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.3360>
- McDannald, M. A., Whitt, J. P., Calhoun, G. G., Piantadosi, P. T., Karlsson, R. M., O'Donnell, P., & Schoenbaum, G. (2011). Impaired reality testing in an animal model of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *70*(12), 1122–1126. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.014>
- McDannald, M., & Schoenbaum, G. (2009). Toward a model of impaired reality testing in rats. *Schizophrenia Bulletin*, *35*(4), 664–667. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp050>
- McDonald, R., Keeley, R., Himmler, S., & Pellis, S. (2021). Chronic exposure to 9-tetrahydrocannabinol in adolescence decreases social play behaviours. *F1000Research*, *10*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.53891.1>
- McNally, J. M., Aguilar, D. D., Katsuki, F., Radzik, L. K., Schiffino, F. L., Uygun, D. S., McKenna, J. T., Strecker, R. E., Deisseroth, K., Spencer, K. M., & Brown, R. E. (2021). Optogenetic manipulation of an ascending arousal system tunes cortical broadband gamma power and reveals functional deficits relevant to schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *26*(7), 3461–3475. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0840-3>
- Meador-Woodruff, J. H., Davis, K. L., & Haroutunian, V. (2001). Abnormal kainate receptor expression in prefrontal cortex in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *24*(5), 545–552. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00189-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00189-5)
- Meehan, C., Harms, L., Frost, J. D., Barreto, R., Todd, J., Schall, U., Shannon Weickert, C., Zavitsanou, K., Michie, P. T., & Hodgson, D. M. (2017). Effects of immune activation during early or late gestation on schizophrenia-related behaviour in adult rat offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, *63*, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.144>
- Meyer, U. (2014). Prenatal Poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biological Psychiatry*, *75*(4), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.07.011>
- Miedel, C. J., Patton, J. M., Miedel, A. N., Miedel, E. S., & Levenson, J. M. (2017). Assessment of spontaneous alternation, novel object recognition and limb claspings in transgenic mouse models of amyloid- β and tau neuropathology. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(123). <https://doi.org/10.3791/55523>

- Millar, J. K., Wilson-Annan, J. C., Anderson, S., Christie, S., Taylor, M. S., Semple, C. A. M., Devon, R. S., St Clair, D. M., Muir, W. J., Blackwood, D. H. R., & Porteous, D. J. (2000). Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 9(9), 1415–1423. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.9.1415>
- Missault, S., Van den Eynde, K., Vanden Berghe, W., Fransen, E., Weeren, A., Timmermans, J. P., Kumar-Singh, S., & Dedeurwaerdere, S. (2014). The risk for behavioural deficits is determined by the maternal immune response to prenatal immune challenge in a neurodevelopmental model. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.013>
- Mitazaki, S., Nakagawasai, O., Onogi, H., Watanabe, K., Takahashi, K., Tan-No, K., Quirion, R., Srivastava, L. K., & Tadano, T. (2020). Role of prefrontal cortical 5-HT_{2A} receptors and serotonin transporter in the behavioral deficits in post-pubertal rats following neonatal lesion of the ventral hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 377. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112226>
- Mitelman, S. A., Bralet, M. C., Mehmet Haznedar, M., Hollander, E., Shihabuddin, L., Hazlett, E. A., & Buchsbaum, M. S. (2018). Positron emission tomography assessment of cerebral glucose metabolic rates in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Brain Imaging and Behavior*, 12(2), 532–546. <https://doi.org/10.1007/s11682-017-9721-z>
- Molè, M. A., Weberling, A., & Zernicka-Goetz, M. (2020). Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation. *Current Topics in Developmental Biology*, 136, 113–138. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.10.002>
- Möller, H. J. (2016). The relevance of negative symptoms in schizophrenia and how to treat them with psychopharmaceuticals? *Psychiatria Danubina*, 28(4), 435–440. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27855437/>
- Moore, H., Jentsch, J. D., Ghajarnia, M., Geyer, M. A., & Grace, A. A. (2006). A Neurobehavioral Systems Analysis of Adult Rats Exposed to Methylazoxymethanol Acetate on E17: Implications for the Neuropathology of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 60(3), 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.01.003>
- Moreno-Fernández, M., Ucha Tortuero, M., Capellán Martín, R., & Higuera-Matas, A. (2022). Capítulo VI: Esquizofrenia y adicción: el problema del huevo y la gallina. In McGraw Hill (Ed.), *Neurociencia del comportamiento: del laboratorio a la vida real* (pp. 231–269).
- Morrison, A. P. (2017). A manualised treatment protocol to guide delivery of evidence-based cognitive therapy for people with distressing psychosis: learning from clinical trials. *Psychosis*, 9(3), 271–281. <https://doi.org/10.1080/17522439.2017.1295098>
- Mortensen, P. B., Nørgaard-Pedersen, B., Waltoft, B. L., Sørensen, T. L., Hougaard, D., Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2007). *Toxoplasma gondii* as a Risk Factor for Early-Onset Schizophrenia: Analysis of Filter Paper Blood Samples Obtained at Birth. *Biological Psychiatry*, 61(5), 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.05.024>
- Mössner, R., Schuhmacher, A., Schulze-Rauschenbach, S., Kühn, K. U., Rujescu, D., Rietschel, M., Zobel, A., Franke, P., Wölwer, W., Gaebel, W., Häfner, H., Wagner, M., & Maier, W. (2008). Further evidence for a functional role of the glutamate receptor gene GRM3 in schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, 18(10), 768–772. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.05.007>
- Mouihate, A. (2016). Prenatal activation of toll-like receptor-4 dampens adult hippocampal neurogenesis in an IL-6 dependent manner. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(Jun). <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00173>
- Mouihate, A., Kalakh, S., Almutairi, R., & Alashqar, A. (2019). Prenatal Inflammation Dampens Neurogenesis and Enhances Serotonin Transporter Expression in the Hippocampus of Adult Female Rats. *Medical Principles and Practice*, 28(4), 352–360. <https://doi.org/10.1159/000499658>
- Mueller, F. S., Richetto, J., Hayes, L. N., Zambon, A., Pollak, D. D., Sawa, A., Meyer, U., & Weber-Stadlbauer, U. (2019). Influence of poly(I:C) variability on thermoregulation, immune responses

- and pregnancy outcomes in mouse models of maternal immune activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80, 406–418. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.019>
- Muguruza, C., Lehtonen, M., Aaltonen, N., Morentin, B., Meana, J. J., & Callado, L. F. (2013). Quantification of endocannabinoids in postmortem brain of schizophrenic subjects. *Schizophrenia Research*, 148(1–3), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.06.013>
- Muguruza, C., Morentin, B., Meana, J. J., Alexander, S. P. H., & Callado, L. F. (2019). Endocannabinoid system imbalance in the postmortem prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology*, 33(9), 1132–1140. <https://doi.org/10.1177/0269881119857205>
- Murphy, C. A., Di Iorio, L., & Feldon, J. (2001). Effects of psychostimulant withdrawal on latent inhibition of conditioned active avoidance and prepulse inhibition of the acoustic startle response. *Psychopharmacology*, 156(2–3), 155–164. <https://doi.org/10.1007/s002130100759>
- Murray, B. G., Davies, D. A., Molder, J. J., & Howland, J. G. (2017). Maternal immune activation during pregnancy in rats impairs working memory capacity of the offspring. *Neurobiology of Learning and Memory*, 141, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.04.005>
- Nagoor Meeran, M. F., Sharma, C., Goyal, S. N., Kumar, S., & Ojha, S. (2021). CB2 receptor-selective agonists as candidates for targeting infection, inflammation, and immunity in SARS-CoV-2 infections. *Drug Development Research*, 82(1), 7–11. <https://doi.org/10.1002/ddr.21752>
- Nakamura, J. P., Gillespie, B., Gibbons, A., Jaehne, E. J., Du, X., Chan, A., Schroeder, A., van den Buuse, M., Sundram, S., & Hill, R. A. (2021). Maternal immune activation targeted to a window of parvalbumin interneuron development improves spatial working memory: Implications for autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 91, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.012>
- Nakazawa, K., & Sapkota, K. (2020). The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Pharmacology & Therapeutics*, 205. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2019.107426>
- Negrete-Díaz, J. V., Falcón-Moya, R., & Rodríguez-Moreno, A. (2022). Kainate receptors: from synaptic activity to disease. *The FEBS Journal*, 289(17), 5074–5088. <https://doi.org/10.1111/febs.16081>
- Negrete, J. C. (1989). Cannabis and Schizophrenia. *British Journal of Addiction*, 84(4), 349–351. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1989.tb00576.x>
- Newell, K. A., Deng, C., & Huang, X. F. (2006). Increased cannabinoid receptor density in the posterior cingulate cortex in schizophrenia. *Experimental Brain Research*, 172(4), 556–560. <https://doi.org/10.1007/s00221-006-0503-x>
- Ni, M., Zhang, Q., Zhao, J., Yao, D., Wang, T., Shen, Q., Li, W., Li, B., Ding, X., & Liu, Z. (2022). Prenatal inflammation causes obesity and abnormal lipid metabolism via impaired energy expenditure in male offspring. *Nutrition and Metabolism*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00642-y>
- O'Tuathaigh, C. M. P., Hryniewiecka, M., Behan, A., Tighe, O., Coughlan, C., Desbonnet, L., Cannon, M., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., Cotter, D. R., & Waddington, J. L. (2010). Chronic adolescent exposure to Δ -9-tetrahydrocannabinol in COMT mutant mice: Impact on psychosis-related and other phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 35(11), 2262–2273. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.100>
- Oblak, A. L., Rosene, D. L., Kemper, T. L., Bauman, M. L., & Blatt, G. J. (2011). Altered posterior cingulate cortical cytoarchitecture, but normal density of neurons and interneurons in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *Autism Research*, 4(3), 200–211. <https://doi.org/10.1002/aur.188>
- Okada, K., Nishizawa, K., Kobayashi, T., Sakata, S., Hashimoto, K., & Kobayashi, K. (2021). Different cholinergic cell groups in the basal forebrain regulate social interaction and social recognition memory. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93045-7>
- Okano, H., Takashima, K., Takahashi, Y., Ojiro, R., Tang, Q., Ozawa, S., Zou, X., Koyanagi, M., Maronpot, R. R., Yoshida, T., & Shibutani, M. (2023). Progressive disruption of

- neurodevelopment by mid-gestation exposure to lipopolysaccharides and the ameliorating effect of continuous alpha-glycosyl isoquercitrin treatment. *Environmental Toxicology*, 38(1), 49–69. <https://doi.org/10.1002/tox.23661>
- Orihuel, J., Capellán, R., Roura-Martínez, D., Ucha, M., Ambrosio, E., & Higuera-Matas, A. (2021). Δ 9-Tetrahydrocannabinol during adolescence reprograms the nucleus accumbens transcriptome, affecting reward processing, impulsivity, and specific aspects of cocaine addiction-like behavior in a sex-dependent manner. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 24(11), 920–933. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyab058>
- Orihuel, J., Gómez-Rubio, L., Valverde, C., Capellán, R., Roura-Martínez, D., Ucha, M., Ambrosio, E., & Higuera-Matas, A. (2021). Cocaine-induced Fos expression in the rat brain: Modulation by prior Δ 9-tetrahydrocannabinol exposure during adolescence and sex-specific effects. *Brain Research*, 1764. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147480>
- Orzelska-Górka, J., Mikulska, J., Wiszniewska, A., & Biała, G. (2022). New Atypical Antipsychotics in the Treatment of Schizophrenia and Depression. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 18). Int J Mol Sci. <https://doi.org/10.3390/ijms231810624>
- Osborne, A. L., Solowij, N., Babic, I., Huang, X. F., & Weston-Green, K. (2017). Improved Social Interaction, Recognition and Working Memory with Cannabidiol Treatment in a Prenatal Infection (poly I:C) Rat Model. *Neuropsychopharmacology*, 42(7), 1447–1457. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.40>
- Osborne, A. L., Solowij, N., Babic, I., Lum, J. S., Huang, X. F., Newell, K. A., & Weston-Green, K. (2019). Cannabidiol improves behavioural and neurochemical deficits in adult female offspring of the maternal immune activation (poly I:C) model of neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 81, 574–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.018>
- Osborne, A. L., Solowij, N., Babic, I., Lum, J. S., Newell, K. A., Huang, X. F., & Weston-Green, K. (2019). Effect of cannabidiol on endocannabinoid, glutamatergic and GABAergic signalling markers in male offspring of a maternal immune activation (poly I:C) model relevant to schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 95. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109666>
- Pan, Y. H., Wu, N., & Yuan, X. B. (2019). Toward a better understanding of neuronal migration deficits in autism spectrum disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 205. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00205>
- Pang, Y., Dai, X., Roller, A., Carter, K., Paul, I., Bhatt, A. J., Lin, R. C. S., & Fan, L. W. (2016). Early postnatal lipopolysaccharide exposure leads to enhanced neurogenesis and impaired communicative functions in rats. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164403>
- Parusel, R., Steimle, A., Lange, A., Schäfer, A., Maerz, J. K., Bender, A., & Frick, J. S. (2017). An important question: Which LPS do you use? *Virulence*, 8(8), 1890–1893. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1361100>
- Pauli, S., Linthorst, A. C. E., & Reul, J. M. H. M. (1998). Tumour necrosis factor- α and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 10(3), 868–878. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00093.x>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Elsevier (ed.); 6th ed).
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M., Rice, M. W., Conley, R. R., & Roberts, R. C. (2012). Dopamine pathology in schizophrenia: Analysis of total and phosphorylated tyrosine hydroxylase in the substantia nigra. *Frontiers in Psychiatry*, 3(APR). <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2012.00031>
- Perkins, D. O., Jeffries, C. D., & Do, K. Q. (2020). Potential Roles of Redox Dysregulation in the Development of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 88(4), 326–336.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.03.016>

- Piontkewitz, Y., Arad, M., & Weiner, I. (2012). Tracing the development of psychosis and its prevention: What can be learned from animal models. *Neuropharmacology*, *62*(3), 1273–1289. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.019>
- Popovic, D., Schmitt, A., Kaurani, L., Senner, F., Papiol, S., Malchow, B., Fischer, A., Schulze, T. G., Koutsouleris, N., & Falkai, P. (2019). Childhood Trauma in Schizophrenia: Current Findings and Research Perspectives. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00274>
- Pressler, R., & Auvin, S. (2013). Comparison of brain maturation among species: An example in translational research suggesting the possible use of bumetanide in newborn. *Frontiers in Neurology*, *4*, 1. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00036>
- Prieur, E., & Jadavji, N. (2019). Assessing Spatial Working Memory Using the Spontaneous Alternation Y-maze Test in Aged Male Mice. *Bio-Protocol*, *9*(3). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3162>
- Rahimi, S., Peeri, M., Azarbayjani, M. A., Anoosheh, L., Ghasemzadeh, E., Khalifeh, N., Noroozi-Mahyari, S., Deravi, S., Saffari-Anaraki, S., Hemat Zangeneh, F., & Salari, A. A. (2020). Long-term exercise from adolescence to adulthood reduces anxiety- and depression-like behaviors following maternal immune activation in offspring. *Physiology and Behavior*, *226*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113130>
- Ranaei, E., Torshizi, S., Amini, A., Heidari, M. H., Namvarpour, Z., Fathabady, F. F., & Salari, A. A. (2020). Peripubertal stress following maternal immune activation sex-dependently alters depression-like behaviors in offspring. *Behavioural Brain Research*, *393*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112800>
- Ranganathan, M., Cortes-Briones, J., Radhakrishnan, R., Thurnauer, H., Planeta, B., Skosnik, P., Gao, H., Labaree, D., Neumeister, A., Pittman, B., Surti, T., Huang, Y., Carson, R. E., & D'Souza, D. C. (2016). Reduced Brain Cannabinoid Receptor Availability in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *79*(12), 997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.021>
- Ravi, K., Divasha, Hassan, S., Pasi, R., Mittra, S., & Kumar, R. (2021). Neural tube defects: Different types and brief review of neurulation process and its clinical implication. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, *10*(12), 4383. https://doi.org/10.4103/JFMPC.JFMPC_904_21
- Reed, M. D., Yim, Y. S., Wimmer, R. D., Kim, H., Ryu, C., Welch, G. M., Andina, M., King, H. O., Waisman, A., Halassa, M. M., Huh, J. R., & Choi, G. B. (2020). IL-17a promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Nature*, *577*(7789), 249–253. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1843-6>
- Renard, J., Rosen, L. G., Loureiro, M., De Oliveira, C., Schmid, S., Rushlow, W. J., & Laviolette, S. R. (2017). Adolescent Cannabinoid Exposure Induces a Persistent Sub-Cortical Hyper-Dopaminergic State and Associated Molecular Adaptations in the Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, *27*(2), 1297–1310. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv335>
- Reuter, A. R., Bumb, J. M., Mueller, J. K., Rohleder, C., Pahlisch, F., Hanke, F., Arens, E., Leweke, F. M., Koethe, D., & Schwarz, E. (2017). Association of anandamide with altered binocular depth inversion illusion in schizophrenia. *World Journal of Biological Psychiatry*, *18*(6), 483–488. <https://doi.org/10.1080/15622975.2016.1246750>
- Ribeiro, D. E., Maiolini, V. M., Soncini, R., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L. K., Vilela, F. C., & Giusti-Paiva, A. (2013). Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *103*(3), 535–540. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.022>
- Rice, M. W., Roberts, R. C., Melendez-Ferro, M., & Perez-Costas, E. (2016). Mapping dopaminergic deficiencies in the substantia nigra/ventral tegmental area in schizophrenia. *Brain Structure and Function*, *221*(1), 185–201. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0901-y>
- Rieger, N. S., Ng, A. J., Lee, S., Brady, B. H., & Christianson, J. P. (2023). Maternal immune activation alters social affective behavior and sensitivity to corticotropin releasing factor in male but not female rats. *Hormones and Behavior*, *149*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2023.105313>

- Rivera-Pérez, J. A., & Hadjantonakis, A. K. (2015). The dynamics of morphogenesis in the early mouse embryo. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015867>
- Robinson-Agramonte, M. de los A., García, E. N., Guerra, J. F., Hurtado, Y. V., Antonucci, N., Semprún-Hernández, N., Schultz, S., & Siniscalco, D. (2022). Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know about It? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/ijms23063033>
- Rocha-Gomes, A., Teixeira, A. E., Santiago, C. M. O., Oliveira, D. G. de, Silva, A. A. da, Lacerda, A. C. R., Riul, T. R., Mendonça, V. A., Rocha-Vieira, E., & Leite, H. R. (2022). Prenatal LPS exposure increases hippocampus IL-10 and prevents short-term memory loss in the male adolescent offspring of high-fat diet fed dams. *Physiology and Behavior*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113628>
- Rock, K. L., Reits, E., & Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology*, 37(11), 724–737. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2016.08.010>
- Romeo, B., Willaime, L., Rari, E., Benyamina, A., & Martelli, C. (2023). Efficacy of 5-HT2A antagonists on negative symptoms in patients with schizophrenia: A meta-analysis. *Psychiatry Research*, 321. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2023.115104>
- Romero, E., Ali, C., Molina-Holgado, E., Castellano, B., Guaza, C., & Borrell, J. (2007). Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1791–1804. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301292>
- Ronovsky, M., Berger, S., Zambon, A., Reisinger, S. N., Horvath, O., Pollak, A., Lindtner, C., Berger, A., & Pollak, D. D. (2017). Maternal immune activation transgenerationally modulates maternal care and offspring depression-like behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 63, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.10.016>
- Rosen, C., Grossman, L. S., Harrow, M., Bonner-Jackson, A., & Faull, R. (2011). Diagnostic and prognostic significance of Schneiderian first-rank symptoms: A 20-year longitudinal study of schizophrenia and bipolar disorder. *Comprehensive Psychiatry*, 52(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2010.06.005>
- Rousset, C. I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P., & Saliba, E. (2006). Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatric Research*, 59(3), 428–433. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000199905.08848.55>
- Rubino, T., Vigano', D., Realini, N., Guidali, C., Braidà, D., Capurro, V., Castiglioni, C., Cherubino, F., Romualdi, P., Candeletti, S., Sala, M., & Parolaro, D. (2008). Chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: Behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology*, 33(11), 2760–2771. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301664>
- Rubio, M. D., Drummond, J. B., & Meador-Woodruff, J. H. (2012). Glutamate receptor abnormalities in schizophrenia: Implications for innovative treatments. *Biomolecules and Therapeutics*, 20(1), 1–18. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.1.001>
- Rudolph, M. D., Graham, A. M., Feczko, E., Miranda-Dominguez, O., Rasmussen, J. M., Nardos, R., Entringer, S., Wadhwa, P. D., Buss, C., & Fair, D. A. (2018). Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. *Nature Neuroscience*, 21(5), 765–772. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0128-y>
- Sadacca, B. F., Wied, H. M., Lopatina, N., Saini, G. K., Nemirovsky, D., & Schoenbaum, G. (2018). Orbitofrontal neurons signal sensory associations underlying model-based inference in a sensory preconditioning task. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.30373>
- Šagud, M., Filippiū, I. Š., Jakšičū, N., Šimuniū, L., Jezernik, D., Tudor, L., Madžarac, Z., Stefanoviū, I., Rajabiū, B. ., Peleš, A. ., Vuksan-Ūusa, B., Mikuliū, S. ., & Pivac, N. (2019). Anhedonia in schizophrenia: Mini-review. *Psychiatria Danubina*, 31, S143–S147.

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31158114/>
- Sams-Dodd, F. (1995). Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. *Behavioural Pharmacology*, 6(1), 55–65. <https://doi.org/10.1097/00008877-199501000-00009>
- Sams-Dodd, F. (1998). A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and d-amphetamine. *Neuropsychopharmacology*, 18(4), 293–304. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00161-9)
- Santos-Toscano, R., Borcel, É., Ucha, M., Orihuel, J., Capellán, R., Roura-Martínez, D., Ambrosio, E., & Higuera-Matas, A. (2016). Unaltered cocaine self-administration in the prenatal LPS rat model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 69, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.04.008>
- Santos-Toscano, R., Ucha, M., Borcel, É., Ambrosio, E., & Higuera-Matas, A. (2020). Maternal immune activation is associated with a lower number of dopamine receptor 3-expressing granulocytes with no alterations in cocaine reward, resistance to extinction or cue-induced reinstatement. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172930>
- Scheinost, D., Sinha, R., Cross, S. N., Kwon, S. H., Sze, G., Constable, R. T., & Ment, L. R. (2017). Does prenatal stress alter the developing connectome? *Pediatric Research*, 81(1–2), 214–226. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.197>
- Schmidt-Hansen, M., & Le Pelley, M. (2012). The positive symptoms of acute schizophrenia and latent inhibition in humans and animals: Underpinned by the same process(es)? *Cognitive Neuropsychiatry*, 17(6), 473–505. <https://doi.org/10.1080/13546805.2012.667202>
- Schmitt, A., Falkai, P., & Papiol, S. (2022). Neurodevelopmental disturbances in schizophrenia: evidence from genetic and environmental factors. *Journal of Neural Transmission*, 130(3). <https://doi.org/10.1007/s00702-022-02567-5>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106–107, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.04.001>
- Severance, E. G., & Yolken, R. H. (2020). Deciphering microbiome and neuroactive immune gene interactions in schizophrenia. *Neurobiology of Disease*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.11.016>
- Shalaby, A. S., Bahanan, A. O., Alshehri, M. H., & Elag, K. A. (2022). Sleep Deprivation & Amphetamine Induced Psychosis. *Psychopharmacology Bulletin*, 52(3), 31–40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35815175/>
- Shen, W. W. (1999). A history of antipsychotic drug development. *Comprehensive Psychiatry*, 40(6), 407–414. [https://doi.org/10.1016/S0010-440X\(99\)90082-2](https://doi.org/10.1016/S0010-440X(99)90082-2)
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *Journal of Neuroscience*, 23(1), 297–302. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-01-00297.2003>
- Shi, L., Tu, N., & Patterson, P. H. (2005). Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: The virus is not detected in the fetus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(2-3 SPEC. ISS.), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.005>
- Simms, M. L., Kemper, T. L., Timbie, C. M., Bauman, M. L., & Blatt, G. J. (2009). The anterior cingulate cortex in autism: Heterogeneity of qualitative and quantitative cytoarchitectonic features suggests possible subgroups. *Acta Neuropathologica*, 118(5), 673–684. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0568-2>
- Skoglund, G., Nockert, M., & Holst, B. (2013). Viking and early middle ages northern scandinavian textiles proven to be made with hemp. *Scientific Reports*, 3. <https://doi.org/10.1038/srep02686>

- Song, J. M., Kang, M., Park, D. H., Park, S., Lee, S., & Suh, Y. H. (2021). Pathogenic grm7 mutations associated with neurodevelopmental disorders impair axon outgrowth and presynaptic terminal development. *Journal of Neuroscience*, 41(11), 2344–2359. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2108-20.2021>
- Stahl, S. M. (2016). Parkinson's disease psychosis as a serotonin-dopamine imbalance syndrome. *CNS Spectrums*, 21(5), 355–359. <https://doi.org/10.1017/S1092852916000602>
- Stahl, S. M. (2018). Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: Dopamine, serotonin, and glutamate. *CNS Spectrums*, 23(3), 187–191. <https://doi.org/10.1017/S1092852918001013>
- Stahl, S. M. (2023). *Psicofarmacología esencial de Stahl. Bases Neurocientíficas y Aplicaciones Prácticas* (Aula Médica (ed.); 5ª Ed).
- Stilo, S. A., & Murray, R. M. (2019). Non-Genetic Factors in Schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*, 21(10). <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1091-3>
- Stollenwerk, T. M., & Hillard, C. J. (2021). Adolescent thc treatment does not potentiate the behavioral effects in adulthood of maternal immune activation. *Cells*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/cells10123503>
- Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., Wynshaw-Boris, A., Colamarino, S. A., Lein, E. S., & Courchesne, E. (2014). Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1209–1219. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1307491>
- Stupart, O., Robbins, T. W., & Dalley, J. W. (2022). “The wrong tools for the right job”: a critical meta-analysis of traditional tests to assess behavioural impacts of maternal separation. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/S00213-022-06275-6>
- Talukdar, P. M., Abdul, F., Maes, M., Binu, V., Venkatasubramanian, G., Kutty, B. M., & Debnath, M. (2020). Maternal Immune Activation Causes Schizophrenia-like Behaviors in the Offspring through Activation of Immune-Inflammatory, Oxidative and Apoptotic Pathways, and Lowered Antioxidant Defenses and Neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, 57(10), 4345–4361. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02028-8>
- Tau, G. Z., & Peterson, B. S. (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 147–168. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.115>
- Tennant, M. F. S., & Groesbeck, M. C. J. (1972). Psychiatric Effects of Hashish. *Archives of General Psychiatry*, 27(1), 133–136. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1972.01750250117016>
- Thézé, R., Manuel, A. L., Pedrazzini, E., Chantraine, F., Patru, M. C., Nahum, L., Guggisberg, A. G., & Schneider, A. (2019). Neural correlates of reality filtering in schizophrenia spectrum disorder. *Schizophrenia Research*, 204, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.07.036>
- Thomsen, K. R., Whybrow, P. C., & Kringelbach, M. L. (2015). Reconceptualizing anhedonia: novel perspectives on balancing the pleasure networks in the human brain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2015.00049>
- Tomasella, E., Falasco, G., Urrutia, L., Bechelli, L., Padilla, L., & Gelman, D. M. (2020). Impaired brain glucose metabolism and presynaptic dopaminergic functioning in a mouse model of schizophrenia. *EJNMMI Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13550-020-00629-x>
- Tordoff, M. G., Alarcon, L. K., & Lawler, M. P. (2008). Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. *Physiology and Behavior*, 95(3), 308–332. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.06.010>
- Trotta, N., Archambaud, F., Goldman, S., Baete, K., Van Laere, K., Wens, V., Van Bogaert, P., Chiron, C., & De Tiège, X. (2016). Functional integration changes in regional brain glucose metabolism from childhood to adulthood. *Human Brain Mapping*, 37(8), 3017–3030. <https://doi.org/10.1002/hbm.23223>
- Trubetskoy, V., Pardiñas, A. F., Qi, T., Panagiotaropoulou, G., Awasthi, S., Bigdeli, T. B., Bryois, J.,

- Chen, C. Y., Dennison, C. A., Hall, L. S., Lam, M., Watanabe, K., Frei, O., Ge, T., Harwood, J. C., Koopmans, F., Magnusson, S., Richards, A. L., Sidorenko, J., ... van Os, J. (2022). Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, *604*(7906), 502–508. <https://doi.org/10.1038/S41586-022-04434-5>
- Tsang, M., Fewell, J. E., & Moore, S. L. (2006). LPS induced hypothermia in pregnant rats: A regulated thermoregulatory response. *Physiology and Behavior*, *89*(2), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.06.005>
- Tse, M. T., Piantadosi, P. T., & Floresco, S. B. (2015). Prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid transmission and cognitive function: Drawing links to schizophrenia from preclinical research. *Biological Psychiatry*, *77*(11), 929–939. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.09.007>
- Tseng, K. Y., Chambers, R. A., & Lipska, B. K. (2009). The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, *204*(2), 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.039>
- Tsunoka, T., Kishi, T., Kitajima, T., Okochi, T., Okumura, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Naitoh, H., Inada, T., Ujike, H., Yamada, M., Uchimura, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N., & Iwata, N. (2010). Association analysis of GRM2 and HTR2A with methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia in the Japanese population. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *34*(4), 639–644. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.03.002>
- Upthegrove, R., & Khandaker, G. M. (2020). Cytokines, Oxidative Stress and Cellular Markers of Inflammation in Schizophrenia. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *44*, 49–66. https://doi.org/10.1007/7854_2018_88
- Van Den Buuse, M. (2010). Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: Pharmacology and methodology aspects. *Schizophrenia Bulletin*, *36*(2), 246–270. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp132>
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, *57*(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
- Vasiliu, O. (2022). Third-generation antipsychotics in patients with schizophrenia and non-responsivity or intolerance to clozapine regimen: What is the evidence? *Frontiers in Psychiatry*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.1069432>
- Vawter, M. P., Crook, J. M., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R., Becker, K. G., & Freed, W. J. (2002). Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: A preliminary study. *Schizophrenia Research*, *58*(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(01\)00377-2](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(01)00377-2)
- Verdurand, M., Dalton, V. S., Nguyen, V., Grégoire, M. C., Zahra, D., Wyatt, N., Burgess, L., Greguric, I., & Zavitsanou, K. (2014). Prenatal poly I: C age-dependently alters cannabinoid type 1 receptors in offspring: A longitudinal small animal PET study using [18F]MK-9470. *Experimental Neurology*, *257*, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.05.004>
- Vojtechova, I., Maleninska, K., Kutna, V., Klovrcza, O., Tuckova, K., Petrasek, T., & Stuchlik, A. (2021). Behavioral alterations and decreased number of parvalbumin-positive interneurons in wistar rats after maternal immune activation by lipopolysaccharide: Sex matters. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063274>
- Vorhees, C. V., Graham, D. L., Braun, A. A., Schaefer, T. L., Skelton, M. R., Richtand, N. M., & Williams, M. T. (2012). Prenatal immune challenge in rats: Altered responses to dopaminergic and glutamatergic agents, prepulse inhibition of acoustic startle, and reduced route-based learning as a function of maternal body weight gain after prenatal exposure to poly IC. *Synapse*, *66*(8), 725–737. <https://doi.org/10.1002/syn.21561>
- Vos, T., Abajobir, A. A., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abate, K. H., Abd-Allah, F., Abdulle, A. M., Abebo, T. A., Abera, S. F., Aboyans, V., Abu-Raddad, L. J., Ackerman, I. N., Adamu, A. A., Adetokunboh, O., Afarideh, M., Afshin, A., Agarwal, S. K., Aggarwal, R., Agrawal, A., ... Murray,

- C. J. L. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, *390*(10100), 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
- Wang, F., Zhang, Z. Z., Cao, L., Yang, Q. G., Lu, Q. F., & Chen, G. H. (2020). Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis triggers and drives Alzheimer-like behavioral and neuropathological changes in CD-1 mice. *Brain and Behavior*, *10*(3). <https://doi.org/10.1002/brb3.1546>
- Wang, H., Meng, X. H., Ning, H., Zhao, X. F., Wang, Q., Liu, P., Zhang, H., Zhang, C., Chen, G. H., & Xu, D. X. (2010). Age- and gender-dependent impairments of neurobehaviors in mice whose mothers were exposed to lipopolysaccharide during pregnancy. *Toxicology Letters*, *192*(2), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.030>
- Wang, H. Y., Liu, Y., Yan, J. W., Hu, X. L., Zhu, D. M., Xu, X. T., & Li, X. S. (2018). Gene polymorphisms of DISC1 is associated with schizophrenia: Evidence from a meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *81*, 64–73. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2017.10.008>
- Wang, H. Y., MacDonald, M. L., Borgmann-Winter, K. E., Banerjee, A., Sleiman, P., Tom, A., Khan, A., Lee, K. C., Roussos, P., Siegel, S. J., Hemby, S. E., Bilker, W. B., Gur, R. E., & Hahn, C. G. (2020). mGluR5 hypofunction is integral to glutamatergic dysregulation in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *25*(4), 750–760. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0234-y>
- Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., & Ma, J. (2018). S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *9*(1298). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01298>
- Ward, K. M., & Citrome, L. (2018). Antipsychotic-Related Movement Disorders: Drug-Induced Parkinsonism vs. Tardive Dyskinesia-Key Differences in Pathophysiology and Clinical Management. *Neurology and Therapy*, *7*(2), 233–248. <https://doi.org/10.1007/S40120-018-0105-0>
- Watts, J. J., Jacobson, M. R., Lalang, N., Boileau, I., Tyndale, R. F., Kiang, M., Ross, R. A., Houle, S., Wilson, A. A., Rusjan, P., & Mizrahi, R. (2020). Imaging Brain Fatty Acid Amide Hydrolase in Untreated Patients With Psychosis. *Biological Psychiatry*, *88*(9), 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.03.003>
- Weber-Stadlbauer, U., Richetto, J., Labouesse, M. A., Bohacek, J., Mansuy, I. M., & Meyer, U. (2017). Transgenerational transmission and modification of pathological traits induced by prenatal immune activation. *Molecular Psychiatry*, *22*(1), 102–112. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.41>
- Wei, Y. L., Li, X. H., & Zhou, J. Z. (2007). Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, *28*(5), 651–656. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00593.x>
- Weinberger, D. R. (2017). The neurodevelopmental origins of schizophrenia in the penumbra of genomic medicine. *World Psychiatry*, *16*(3), 225–226. <https://doi.org/10.1002/wps.20474>
- Wessely, S., Castle, D., Der, G., & Murray, R. (1991). Schizophrenia and Afro-Caribbeans. A case-control study. *British Journal of Psychiatry*, *159*, 795–801. <https://doi.org/10.1192/bjp.159.6.795>
- Wheeler, D. S., Chang, S. E., & Holland, P. C. (2013). Odor-mediated taste learning requires dorsal hippocampus, but not basolateral amygdala activity. *Neurobiology of Learning and Memory*, *101*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.12.015>
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, *83*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/BF00427414>
- Winship, I. R., Dursun, S. M., Baker, G. B., Balista, P. A., Kandratavicius, L., Maia-de-Oliveira, J. P., Hallak, J., & Howland, J. G. (2019). An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Canadian Journal of Psychiatry*, *64*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>
- Wischhof, L., Irrsack, E., Dietz, F., & Koch, M. (2015). Maternal lipopolysaccharide treatment differentially affects 5-HT_{2A} and mGlu_{2/3} receptor function in the adult male and female rat

- offspring. *Neuropharmacology*, 97, 275–288. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.029>
- Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., & Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure - a neurodevelopmental rat model of schizophrenia - differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 57, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.10.004>
- Wiseman Harris, L., Sharp, T., Gartlon, J., Jones, D. N. C., & Harrison, P. J. (2003). Long-term behavioural, molecular and morphological effects of neonatal NMDA receptor antagonism. *European Journal of Neuroscience*, 18(6), 1706–1710. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02902.x>
- Wolff, A. R., & Bilkey, D. K. (2010). The maternal immune activation (MIA) model of schizophrenia produces pre-pulse inhibition (PPI) deficits in both juvenile and adult rats but these effects are not associated with maternal weight loss. *Behavioural Brain Research*, 213(2), 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.008>
- Wong, D. F., Kuwabara, H., Horti, A. G., Raymont, V., Brasic, J., Guevara, M., Ye, W., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Nandi, A., Rahmim, A., Ming, J. E., Grachev, I., Roy, C., & Cascella, N. (2010). Quantification of cerebral cannabinoid receptors subtype 1 (CB1) in healthy subjects and schizophrenia by the novel PET radioligand [11C]OMAR. *NeuroImage*, 52(4), 1505–1513. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.04.034>
- Wynn, J. K., Dawson, M. E., Schell, A. M., McGee, M., Salveson, D., & Green, M. F. (2004). Prepulse facilitation and prepulse inhibition in schizophrenia patients and their unaffected siblings. *Biological Psychiatry*, 55(5), 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.018>
- Xiao, J., Buka, S. L., Cannon, T. D., Suzuki, Y., Viscidi, R. P., Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2009). Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes and Infection*, 11(13), 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.007>
- Xu, X., Wu, D., Hou, S., Zhu, J., Li, J., & Tang, J. (2017). Prenatal exposure to TAK242 affects the childhood autism in offspring in animal models of autism spectrum disorder. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(9), 1016–1020. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9270>
- Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current Protocols in Neuroscience*, Chapter 8(SUPPL. 56). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56>
- Yee, N., Ribic, A., de Roo, C. C., & Fuchs, E. (2011). Differential effects of maternal immune activation and juvenile stress on anxiety-like behaviour and physiology in adult rats: No evidence for the “double-hit hypothesis.” *Behavioural Brain Research*, 224(1), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.040>
- Yu, Q., He, Z., Zubkov, D., Huang, S., Kurochkin, I., Yang, X., Halene, T., Willmitzer, L., Giavalisco, P., Akbarian, S., & Khaitovich, P. (2020). Lipidome alterations in human prefrontal cortex during development, aging, and cognitive disorders. *Molecular Psychiatry*, 25(11), 2952–2969. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0200-8>
- Zager, A., Mennecier, G., & Palermo-Neto, J. (2012). Maternal immune activation in late gestation enhances locomotor response to acute but not chronic amphetamine treatment in male mice offspring: Role of the D1 receptor. *Behavioural Brain Research*, 232(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.036>
- Zamberletti, E., Beggiano, S., Steardo, L., Prini, P., Antonelli, T., Ferraro, L., Rubino, T., & Parolaro, D. (2014). Alterations of prefrontal cortex GABAergic transmission in the complex psychotic-like phenotype induced by adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol exposure in rats. *Neurobiology of Disease*, 63, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.028>
- Zamberletti, E., & Rubino, T. (2022). Dos(e)Age: Role of Dose and Age in the Long-Term Effect of Cannabinoids on Cognition. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27041411>
- Zammit, S., Allebeck, P., Andreasson, S., Lundberg, I., & Lewis, G. (2002). Self reported cannabis use

- as a risk factor for schizophrenia in Swedish conscripts of 1969: Historical cohort study. *British Medical Journal*, 325(7374), 1199–1201. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7374.1199>
- Zavitsanou, K., Garrick, T., & Huang, X. F. (2004). Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(2), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.11.005>
- Zawadzka, A., Cieřlik, M., & Adamczyk, A. (2021). The role of maternal immune activation in the pathogenesis of autism: A review of the evidence, proposed mechanisms and implications for treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111516>
- Zhang, L., Zhong, X., An, Z., Han, S., Luo, X., Shi, Y., & Yi, Q. (2014). Association analysis of the GRM8 gene with schizophrenia in the Uygur Chinese population. *Hereditas*, 151(6), 140–144. <https://doi.org/10.1111/hrd2.00045>

ANEXOS

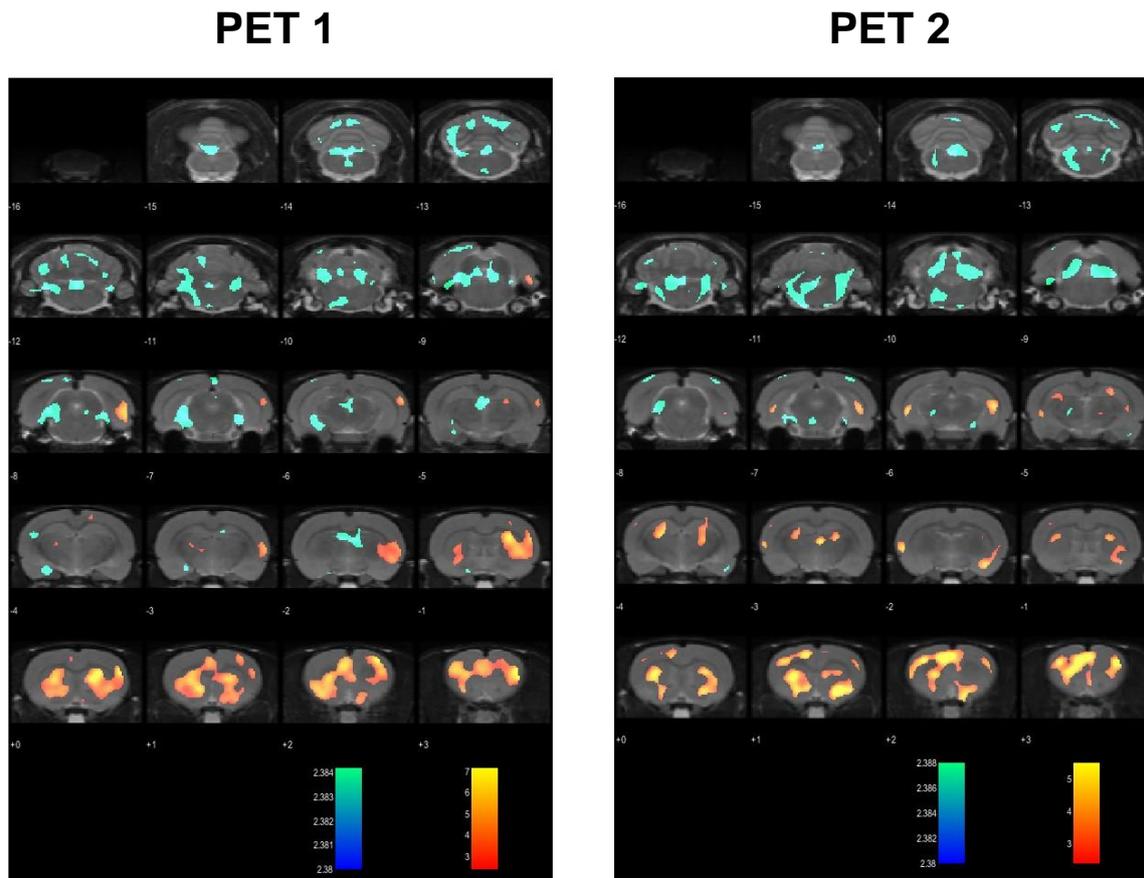


Figura A1. Diferencias por sexo en la actividad cerebral. Se muestran las diferencias de activación tras una comparación voxel a voxel de todo el cerebro. Los colores azulados o anaranjados representan una menor o mayor actividad respectivamente de los machos. Para evitar falsos positivos, se estudiaron agrupaciones de un mínimo de 50 vóxeles y se estableció el límite de significación estadística en $p < 0,01$.

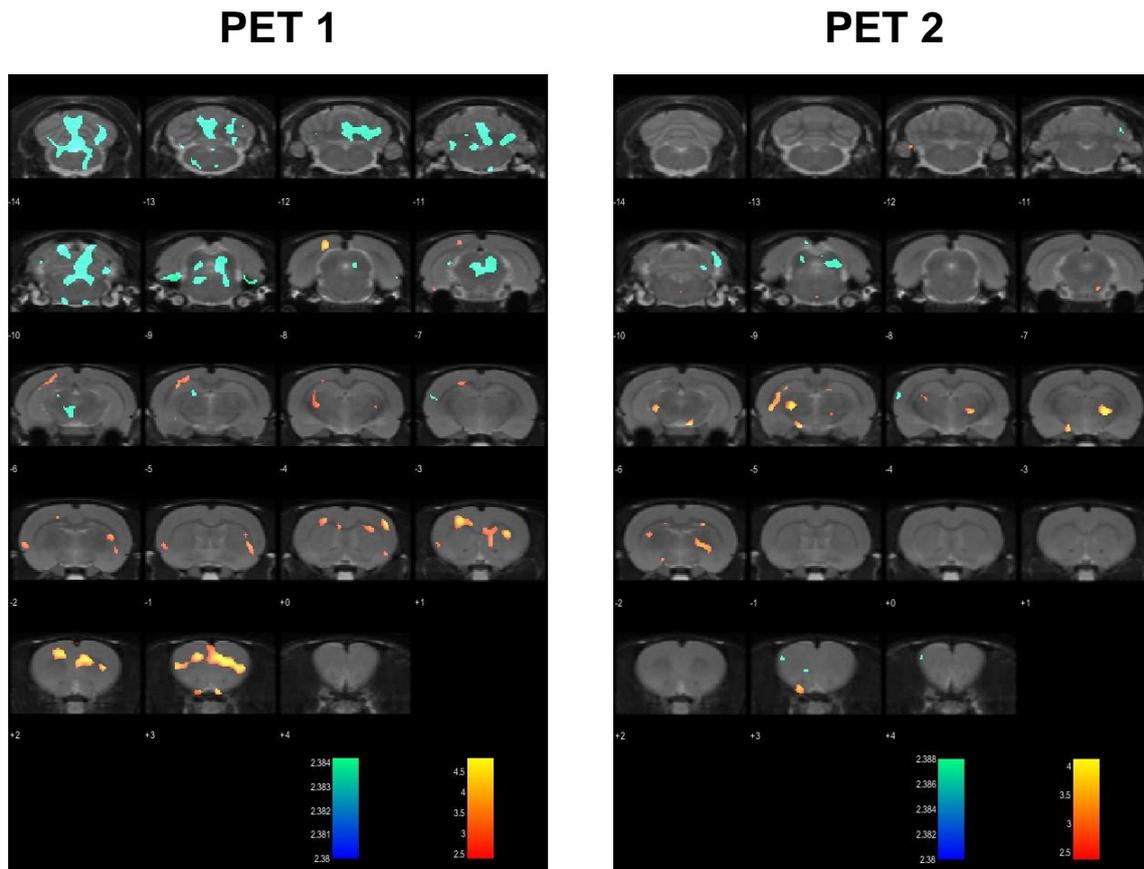


Figura A2. Efectos del LPS en la actividad cerebral. Se muestran las diferencias de activación tras una comparación voxel a voxel de todo el cerebro. Los colores azulados o anaranjados representan una menor o mayor actividad respectivamente causada por la exposición a LPS durante la gestación. Para evitar falsos positivos, se estudiaron agrupaciones de un mínimo de 50 vóxeles y se estableció el límite de significación estadística en $p < 0,01$.

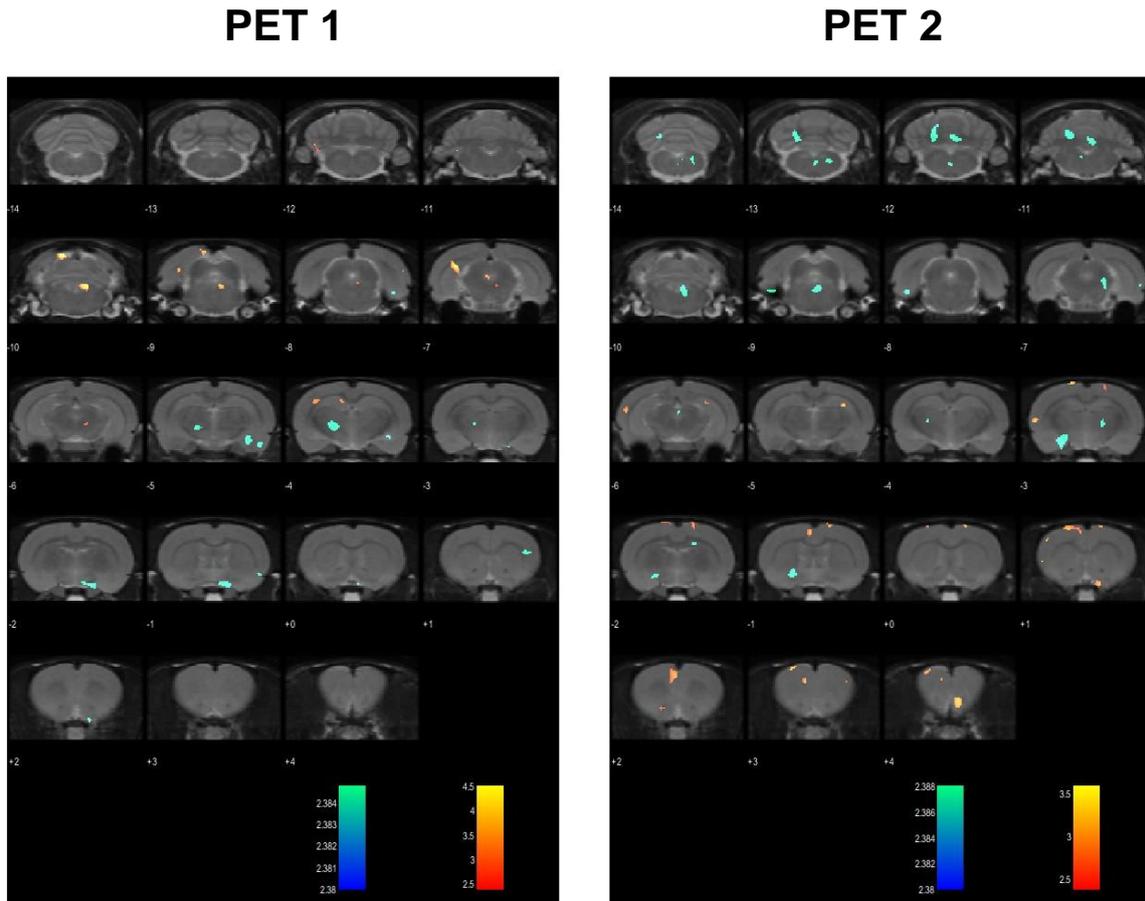


Figura A3. Efectos del THC en la actividad cerebral. Se muestran las diferencias de activación tras una comparación voxel a voxel de todo el cerebro. Los colores azulados o anaranjados representan una menor o mayor actividad, respectivamente, causada por la exposición a THC durante la adolescencia. La administración de THC se realizó durante 11 días en dosis crecientes de la siguiente manera: 2,5 mg/Kg (DP30-32), 5 mg/Kg (DP33-36) y 10 mg/Kg (DP37-40). Para evitar falsos positivos, se estudiaron agrupaciones de un mínimo de 50 vóxeles y se estableció el límite de significación estadística en $p < 0,01$.

