



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental

"Análisis molecular de TLR1, TLR2 y TLR6 en monocitos de sangre periférica de pacientes con esquizofrenia"

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

M. en Biol. Exp. Carlo Esteban Sotelo Ramírez

Matricula: 2183802013

ORCID: 0000-0001-9924-1434

Correo electrónico: csotelor9494@gmail.com

Cotutoras:

Dra. Beatriz Elena Camarena Medellín

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Asesora

Dra. Marcela Valdés Tovar

Jurado:

Presidente: Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Secretaria: Dra. Marcela Valdés Tovar

Vocal: Dr. José de Jesús Argueta Donohue

Vocal: Dr. Raúl Iván Escamilla Orozco

Iztapalapa, Ciudad de México, 31 de marzo de 2025

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Beca otorgada por CONACYT: 926391

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en
Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la
Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis
titulada:

" Análisis molecular de TLR1, TLR2 y TLR6 en monocitos de sangre periférica de pacientes con
esquizofrenia", que presentó

M.BE. Carlo Esteban Sotelo Ramírez

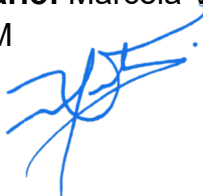
El día 31 de marzo el año 2025

Sinodales:

Presidente: Dr. Julio César Almanza Pérez, Departamento de Ciencias de la
Salud, UAM-I



Secretario: Marcela Valdés Tovar, Subdirección de Investigaciones Clínicas,
INPRFM



Vocal 1: José de Jesús Argueta Donohué, Departamento de Neurofarmacología.
INPRFM



Vocal 2: Raúl Iván Escamilla Orozco. Subdirector médico de consulta externa,
INPRFM



Miembros del Comité de tutores

Codirectora Interna: Dra. Roxana Uri Miranda Labra. Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)- Iztapalapa.

Codirectora Externa: Dra. Beatriz Elena Camarena Medellín. Departamento de Farmacogenética, Subdirección de Investigaciones Clínicas. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM).

Asesora: Dra. Marcela Valdés Tovar. Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz (INPRFM).

Dedicatorias y agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han sido parte fundamental en la realización de esta tesis.

En primer lugar, agradezco a mis codirectoras de tesis, la Dra. Beatriz Camarena Medellín y la Dra. Roxana Uri Miranda Labra, por su invaluable guía, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de este proceso. Su conocimiento y compromiso han sido clave para la realización de este trabajo. De igual manera, extendiendo mi gratitud a mi asesora, la Dra. Marcela Valdés Tovar, por su constante orientación, consejos y motivación, que fueron esenciales para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a todo el equipo del Departamento de Farmacogenética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, por su apoyo, enseñanzas y por brindarme un espacio para crecer tanto académica como profesionalmente. En especial, quiero agradecer a mis compañeros Marco y Julio, quienes hicieron de este camino una experiencia enriquecedora y llena de aprendizaje. Su compañerismo, conocimiento y amistad fueron un gran impulso durante este proceso.

A mi familia, que ha sido mi pilar y fuente inagotable de apoyo. A mis padres, Mario y Esperanza, por su amor incondicional, su confianza y por brindarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas. Gracias por creer en mí y acompañarme en cada paso de este camino. A mis hermanos, Mario y Ariadna, por su cariño, compañía y por ser un soporte inquebrantable en este recorrido.

A mis compañeros del Doctorado, con quienes compartí desafíos, aprendizajes y momentos inolvidables. Su apoyo y amistad hicieron que este proceso fuera mucho más enriquecedor. Un agradecimiento muy especial a mis amigos de la infancia, Víctor y Alfredo, quienes han estado a mi lado desde siempre, brindándome su amistad incondicional y su apoyo en cada etapa de mi vida. Su presencia ha sido una fuente de motivación y alegría a lo largo de este camino.

Agradezco y te dedico a ti, Paula, mi amor, mi apoyo incondicional y mi compañera de vida. Gracias por estar a mi lado en cada momento de este camino, por tu paciencia, comprensión y por creer en mí incluso en los días más difíciles. Tu amor y compañía han sido mi refugio y mi impulso para seguir adelante. Este logro también es tuyo, porque sin ti, el viaje habría sido mucho más difícil. Gracias por ser mi compañera de vida, mi mejor amiga y mi mayor motivación

Resumen

La esquizofrenia es un trastorno mental crónico y discapacitante con alta heredabilidad, en el que se han identificado, varios genes reguladores del sistema inmunológico implicándolo en su fisiopatología. El objetivo del estudio fue investigar los niveles de expresión génica y proteica de los receptores tipo Toll (TLR) 1, 2 y 6, al igual que la funcionalidad de estos receptores en monocitos de sangre periférica de pacientes con esquizofrenia y sujetos control de la población mexicana.

La expresión génica se evaluó mediante qPCR, y la expresión de proteínas se analizó usando citometría de flujo. Los perfiles de secreción de monocitos estimulados con MALP2 fueron evaluados a través de ensayos inmunoproteómicos. Nuestros resultados indican que los pacientes con esquizofrenia portadores del genotipo GG del rs4833093/*TLR1* presentaron una expresión significativamente menor en comparación con los portadores del genotipo TT. Notablemente, los sujetos control con el genotipo TT mostraron una expresión proteica mayor de *TLR1*, mientras que todos los pacientes con esquizofrenia exhibieron niveles de proteína significativamente reducidos, independientemente del genotipo. Los niveles de expresión de *TLR2* y *TLR6* se encontraban disminuidos en pacientes con esquizofrenia en comparación con controles; sin embargo, el análisis de expresión por alelo no mostro diferencias entre los grupos de comparación. Por otra parte, los niveles proteicos de TLR2 y TLR6 no mostraron diferencias entre controles y pacientes totales y por portación de alelos. Además, los monocitos de los pacientes con esquizofrenia mostraron perfiles de secreción alterados tras la estimulación de TLR, con incrementos significativos en IL-

18, uPAR, angiopoyetina-2 y serpin E1, y una reducción en las moléculas MCP-1, IL-17A, IL-24, MIF y mieloperoxidasa en comparación con los controles. Estos hallazgos sugieren una respuesta inmunitaria innata mediada por TLR disfuncional en los pacientes con esquizofrenia.

Abstract

Schizophrenia is a chronic and disabling mental disorder with high heritability, in which several immune system regulatory genes have been identified, implicating immune dysregulation in its pathophysiology. This study aimed to investigate the gene and protein expression levels of Toll-like receptors (TLR) 1, 2, and 6, as well as the functionality of these receptors in peripheral blood monocytes from patients with schizophrenia and control subjects in the Mexican population.

Gene expressions were assessed using qPCR, while protein expression was analyzed by flow cytometry. The secretion profiles of monocytes stimulated with MALP2 were evaluated through immunoproteomic assays. Our results indicate that schizophrenia patients carrying the GG genotype of rs4833093/*TLR1* exhibited significantly lower expression compared to TT genotype carriers. Notably, control subjects with the TT genotype displayed higher TLR1 protein expression, whereas all schizophrenia patients exhibited significantly reduced protein levels, regardless of genotype. *TLR2* and *TLR6* gene expression levels were lower in schizophrenia patients compared to controls; however, allele-specific expression analysis did not reveal

differences between comparison groups. Additionally, TLR2 and TLR6 protein levels did not differ between controls and patients, either in the total sample or when stratified by allele carriage.

Furthermore, monocytes from schizophrenia patients exhibited altered secretion profiles following TLR stimulation, with significant increases in IL-18, uPAR, angiopoietin-2, and serpin E1, along with decreased levels of MCP-1, IL-17A, IL-24, MIF, and myeloperoxidase compared to controls. These findings suggest a dysfunctional TLR-mediated innate immune response in schizophrenia patients.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Epidemiología de la esquizofrenia	4
2.2. Etiología de la esquizofrenia	6
2.3. Alteraciones neurobiológicas en la esquizofrenia: interacción entre neurotransmisión e inflamación	7
2.3.1 Disfunción serotoninérgica en la esquizofrenia.....	7
2.3.2 Disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia	10
2.3.3 Disfunción glutamatérgica en esquizofrenia.....	11
2.3.4. El vínculo entre la inflamación y los sistemas de neurotransmisión en la esquizofrenia	13
2.4. Epidemiología genética en la esquizofrenia.....	15
2.4.1 Estudios en familias	16
2.4.2 Estudios en gemelos.....	16
2.4.3 Estudios de adopción.....	18
2.5 Estudios de asociación del genoma completo (<i>Genome Wide- Association Studies, GWAS</i>)	19
2.6 Respuesta inmune en la esquizofrenia.....	21
2.7 Hipótesis sobre el origen de componentes inflamatorios en esquizofrenia	23
2.8 La respuesta inmune innata y adaptativa	25
2.9 Estructura de los receptores tipo toll (TLRs).....	26
2.10 Vía de señalización de los TLRs para activar la inmunidad innata.....	27
2.11 Los TLRs y su posible papel en la esquizofrenia.	28
2.12 Estudios de asociación genética entre TLRs y esquizofrenia	31
3. Justificación	34
4. Hipótesis.....	36
5. Objetivo General.....	36
6. Objetivos particulares	36
7. Material y Métodos	37
7.1 Selección de la muestra.....	37
7.1.1 Muestras de pacientes	37

7.1.2 Criterios de inclusión de pacientes	37
7.1.3 Criterios de exclusión de pacientes	37
7.1.4 Muestra de controles	37
7.1.5 Criterios de exclusión de controles	38
7.2 Obtención de muestra sanguínea	39
7.3. Aislamiento de células mononucleares (PBMCs) de sangre periférica	39
7.4 Selección positiva con perlas magnéticas (MACs)	40
7.5. Inmunofluorescencia de CD14, TLR1, TLR2 y TLR6	41
7.6. Genotipificación por PCR en Tiempo Real	42
7.7. Extracción de RNA y obtención de cDNA por qPCR.....	43
7.8 Análisis de expresión génica de <i>TLR1</i> , <i>TLR2</i> y <i>TLR6</i>	43
7.9 Evaluación por citometría de flujo de TLR1, TLR2 y TLR6.....	44
7.8. Cultivos celulares para estudios funcionales	45
7.11 Ensayo de perfil proteómico.....	45
7.12 Análisis estadístico	46
8. Resultados.....	48
8.1 Características Demográficas y Clínicas de la Muestra.....	48
8.2 Detección inmunofluorescente de CD14+, TLR1, TLR2 y TLR6	49
8.3 Análisis de expresión génica de <i>TLR1</i> , <i>TLR2</i> y <i>TLR6</i>	51
8.4 Análisis de expresión proteica de TLR1, TLR2 y TLR6.....	54
8.5 Evaluación funcional de TLR2/TLR6 en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles.....	58
9. Discusión.....	62
10. Conclusión.....	77
11. Referencias	79
Anexo 1: Carta de consentimiento informado para el reclutamiento de pacientes.....	93
Anexo 2: Carta de consentimiento informado para el reclutamiento de controles	101
Anexo 3: Artículo original publicado.....	109

1. Introducción

La salud mental es esencial para el bienestar humano y está profundamente vinculada con la salud física y social. Los trastornos mentales se caracterizan por cambios en el pensamiento, la percepción, las emociones, el comportamiento y las interacciones sociales. A nivel mundial, se estima que unos 450 millones de personas padecen algún trastorno mental, aunque solo una fracción recibe atención y tratamiento adecuado. En los últimos años, los avances en la investigación biomédica han mejorado la detección temprana y el tratamiento de estos trastornos mejorando la calidad de vida de los pacientes (McCutcheon, 2020).

Entre los trastornos mentales, como la esquizofrenia, los trastornos del estado de ánimo, trastornos de la conducta alimentaria y el déficit de atención, se han identificado diversos factores que incrementan el riesgo a desarrollarlos, como pueden ser factores sociales, psicológicos y biológicos, entre los que destacan los factores genéticos (Jauhar et al., 2022).

La epidemiología genética juega un rol clave en la identificación de factores genéticos que influyen en el riesgo de desarrollar un trastorno mental y en la respuesta al tratamiento farmacológico. Hablando específicamente sobre la esquizofrenia, diversos estudios de epidemiología genética como los realizados en gemelos, familias y adopción, indican que la esquizofrenia tiene una base genética muy representativa, mostrando una heredabilidad estimada de alrededor del 81%. (Fatemi y Clayton,

2008). Gracias a los estudios de asociación genética, se han identificado genes vinculados a diversas vías biológicas alteradas en pacientes con esquizofrenia.

Uno de los GWAS más grandes reportados hasta el momento (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium, 2014), sugiere una asociación de la esquizofrenia con regiones génicas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) el cual se ubica en el cromosoma 6p21.3- 6p22.1. La región del MHC está conformada por más de 200 genes, los cuales codifican para reguladores maestros del sistema inmune, así como genes que codifican al antígeno leucocitario humano (HLA), genes de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y genes complementarios de las diversas cascadas de señalización de la respuesta inmune (Pouget *et al.* 2019). En los últimos años, se ha propuesto que el sistema inmunológico, desempeña un papel crucial en la fisiopatología de la esquizofrenia (Park *et al.* 2015). Los receptores tipo toll (TLRs) son receptores clave en la respuesta inmune innata, ya que detectan patrones moleculares asociados a patógenos y patrones de daño celular. Evidencias recientes sugieren que alteraciones en la expresión y función de TLRs podrían estar relacionadas con la patogénesis de la esquizofrenia, probablemente mediante la regulación de la inflamación y otros mecanismos inmunológicos que afectan el cerebro y su desarrollo (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2003).

Dado que los TLRs regulan respuestas inflamatorias críticas, este estudio se enfoca en analizar el impacto de variantes genéticas en los genes *TLR1*, *TLR2* y *TLR6*, y cómo estas variantes podrían afectar los niveles de expresión génica, proteica y la

funcionalidad de los receptores en pacientes con esquizofrenia en comparación con individuos sanos.

2. Antecedentes

La esquizofrenia es considerada un desorden psiquiátrico debilitante, complejo y crónico, el cual se caracteriza por la presencia de síntomas positivos, negativos y cognitivos (McCutcheon, 2020). Los síntomas positivos se caracterizan por la presencia de pensamientos, discurso y conductas desorganizadas, ideas delirantes y alucinaciones, el cual conlleva al paciente a perder la noción de lo que es real y lo que no (Kahn et al. 2015). Los síntomas negativos se asocian con una disminución del estado de ánimo y de la actividad social, caracterizado por un aplanamiento afectivo, anhedonia (incapacidad de realizar actividades que producían placer) y una disminución de la energía (WHO, 2009). Los síntomas cognitivos se caracterizan por un déficit en el funcionamiento ejecutivo, el cual se define como la capacidad de una persona para comprender información y posteriormente tomar una decisión. Del mismo modo, el paciente puede presentar problemas con la memoria operativa, en donde el individuo tiene dificultades para utilizar información inmediatamente después de haberla aprendido (McCutcheon, 2020; Kahn et al. 2015). Todos estos síntomas pueden alterar las funciones sociales y mentales del individuo (Kozłowska et al. 2019), e interferir con la vida cotidiana de la persona al provocar problemas consigo mismo y con las personas que lo rodean (Jauhar et al. 2022).

2.1. Epidemiología de la esquizofrenia

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la esquizofrenia afecta a más de 21 millones de personas a nivel mundial, siendo más frecuente en hombres que en mujeres (McCutcheon, 2020). Se estima que la prevalencia general es de aproximadamente el 1% de la población mundial, lo que la clasifica como una de las enfermedades mentales crónicas más comunes. En términos de impacto social y económico, la esquizofrenia es responsable de una carga significativa para los sistemas de salud debido al alto costo asociado con su tratamiento y la pérdida de productividad. Según el informe Global Burden of Disease de 2009, la esquizofrenia es la 12.^a causa de discapacidad mundial en comparación con otras 310 enfermedades psiquiátricas y no psiquiátricas (WHO, 2009). La esquizofrenia suele manifestarse en la adolescencia o en la adultez temprana, con una edad de inicio promedio entre los 18 y 25 años. La prevalencia de la esquizofrenia es similar en hombres y mujeres, la mayoría de los estudios han demostrado que el inicio en mujeres ocurre, en promedio, de 3 a 5 años más tarde que en los hombres (Jones, 2013; Kirkbride et al., 2012; Nowrouzi et al., 2015). Actualmente, se ha reportado que el inicio de la enfermedad en hombres presenta un pico de edad que va entre los 21 y 25 años. En contraste, las mujeres muestran un primer pico de inicio entre los 25 y 30 años y un segundo pico después de los 45 años (Li et al., 2016; Zhan et al., 2023).

El rango de gravedad de la esquizofrenia es variable, abarcando desde una recuperación parcial de la sintomatología con manejo farmacológico y psicoterapéutico adecuado, hasta casos graves que requieren cuidado permanente y continuo (Jauhar

et al., 2022). En promedio, la esperanza de vida de las personas con esquizofrenia es hasta 20 años menor en comparación con la población general, debido a factores como un mayor riesgo de suicidio, complicaciones cardiovasculares, y enfermedades metabólicas (Kahn et al., 2015). Los pacientes diagnosticados con esquizofrenia tienen un riesgo 2.5 veces mayor de morir por estas causas (McCutcheon, 2020; Jauhar et al., 2022). Los efectos secundarios metabólicos y cardíacos, particularmente el aumento de peso, la diabetes tipo 2 y la dislipidemia, están ampliamente documentados como consecuencias adversas del uso prolongado de antipsicóticos de segunda generación (Kahn et al., 2015). Además, la esquizofrenia presenta una alta tasa de comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos, incluyendo depresión, trastorno bipolar, trastornos de ansiedad, abuso de sustancias y trastorno obsesivo-compulsivo. Estas comorbilidades pueden agravar el curso clínico de la enfermedad, dificultar el tratamiento y aumentar el riesgo de discapacidad en los pacientes (Tsai & Rosenheck, 2013).

En México, la esquizofrenia representa un problema importante de salud pública, con una prevalencia similar a la reportada a nivel mundial (Gobierno de México, 2023). Sin embargo, el acceso limitado a servicios especializados de salud mental, la estigmatización de los trastornos mentales, y las brechas en la atención oportuna y continua contribuyen a peores desenlaces clínicos en muchos pacientes (López-Soto & Martín-Rodríguez, 2020). La falta de diagnóstico temprano y adherencia al tratamiento agrava las dificultades de manejo de la enfermedad y aumenta la carga socioeconómica para las familias y la sociedad. Este panorama destaca la necesidad

urgente de mejorar las estrategias de intervención temprana, así como de desarrollar enfoques personalizados que consideren los factores genéticos, ambientales y culturales que influyen en la manifestación y progresión de la esquizofrenia en la población mexicana (Rosa & Valentini, 2020).

2.2. Etiología de la esquizofrenia

La esquizofrenia se considera un trastorno multifactorial, por lo cual es importante estudiar diversos factores que contribuyen al desarrollo de dicha psicopatología, como lo son los factores ambientales, sociales y los genéticos.

Estos factores pueden actuar en conjunto, e incrementar la vulnerabilidad a desarrollar esquizofrenia; sin embargo, el ser portador de algún factor de riesgo no necesariamente conduce a desarrollar dicho trastorno (WHO, 2009). Se ha reportado un incremento en el riesgo a desarrollar esquizofrenia si existen antecedentes de complicaciones durante el periodo gestacional (Dalman et al., 1999). Estas complicaciones pueden afectar el neurodesarrollo del individuo durante etapas perinatales desencadenando disfunciones en diversas vías neuronales, lo cual puede repercutir en que las personas puedan desarrollar esquizofrenia en etapas adultas (Kahn et al., 2015).

Las adversidades sociales y trauma en la infancia es otro factor de riesgo asociado con la esquizofrenia. Se ha reportado que el abuso físico, abuso sexual, negligencia física y emocional, maltrato y acoso escolar pueden incrementar el riesgo

a desarrollar esquizofrenia (Inyang et al., 2022). Zhang y colaboradores (2022) identificaron un incremento de 3.19 veces más el riesgo a desarrollar psicosis en personas con una mayor cantidad de eventos traumáticos en la infancia.

Los factores ambientales descritos anteriormente desempeñan un papel importante en la etiología de la esquizofrenia; sin embargo, no explican en su totalidad el desarrollo del trastorno.

2.3. Alteraciones neurobiológicas en la esquizofrenia: interacción entre neurotransmisión e inflamación

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico complejo caracterizado por una desregulación en los sistemas de neurotransmisión, entre los cuales destacan el sistema serotoninérgico, dopaminérgico, glutamatérgico. Estas alteraciones en las vías de señalización neuronal impactan en la actividad de diversos circuitos neuronales a nivel macro y microestructural, lo que contribuye a la disfunción cognitiva, conductual y social observada en los pacientes (Jauhar et al., 2022; Nayak et al., 2025).

2.3.1 Disfunción serotoninérgica en la esquizofrenia

La hipótesis serotoninérgica de la esquizofrenia postula que las alteraciones en la neurotransmisión de la serotonina (5-HT) desempeñan un papel clave en la fisiopatología de la enfermedad. Esta propuesta surge de la observación de que ciertos compuestos alucinógenos, como la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), pueden

inducir síntomas psicóticos similares a los observados en pacientes con esquizofrenia (Jiménez-Trejo et al., 2024). Dichos efectos se deben a la activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{2A}, lo que sugiere que una disfunción en este sistema podría estar involucrada en la aparición de síntomas tanto positivos como negativos de la esquizofrenia (Frankle et al., 2003). Diversos estudios han respaldado esta hipótesis, destacando el papel modulador de la serotonina sobre otros sistemas neurotransmisores implicados en la esquizofrenia, particularmente el dopaminérgico y el glutamatérgico. La hiperactividad de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal se ha asociado con la aparición de síntomas positivos, como alucinaciones y delirios, mientras que su alteración en otras regiones cerebrales podría contribuir a la manifestación de síntomas negativos, tales como la apatía y la anhedonia (Kossatz et al., 2024).

La evidencia experimental y farmacológica ha proporcionado apoyo adicional a la hipótesis serotoninérgica. En particular, el desarrollo de antipsicóticos atípicos, como la clozapina, la risperidona y la olanzapina, ha demostrado que la modulación de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}, junto con el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D₂, mejora la sintomatología de la esquizofrenia y reduce los efectos secundarios motores asociados con los antipsicóticos típicos (Yang & Tsai, 2017; Malik et al., 2023). Asimismo, estudios de neuroimagen y modelos animales han identificado alteraciones en la expresión de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{1A} en pacientes con esquizofrenia, lo que sugiere un desequilibrio en la neurotransmisión serotoninérgica (Uliana et al., 2023; Malik et al., 2023; Jiménez-Trejo et al., 2024). Adicionalmente, se

ha propuesto que la serotonina no solo interactúa con el sistema dopaminérgico, sino también con el sistema glutamatérgico. La activación de los receptores 5-HT_{2A} puede influir en la liberación de glutamato, lo que podría estar vinculado con la disfunción en la neurotransmisión glutamatérgica observada en la esquizofrenia (Nayak et al., 2025). Además, la inhibición de estos receptores en la corteza prefrontal ha sido asociada con un incremento en la liberación de dopamina, lo que sugiere que la modulación serotoninérgica podría mejorar los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad. Desde el punto de vista terapéutico, la hipótesis serotoninérgica ha sido fundamental en el desarrollo de estrategias farmacológicas más eficaces para el tratamiento de la esquizofrenia (Jiménez-Trejo et al., 2024). En este contexto, los antipsicóticos atípicos han demostrado una mayor eficacia en la reducción de los síntomas negativos y una menor incidencia de efectos extrapiramidales en comparación con los antipsicóticos convencionales. Asimismo, la investigación en torno a los receptores serotoninérgicos ha impulsado el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos, como el uso de moduladores de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇, con el objetivo de abordar deficiencias en la función cognitiva y los síntomas negativos de la esquizofrenia (Jiménez-Trejo et al., 2024).

Es importante mencionar que la hipótesis serotoninérgica no explica por sí sola la fisiopatología de la esquizofrenia, sin embargo, remarca un papel relevante para comprender los mecanismos neurobiológicos subyacentes a la enfermedad. La interacción de la serotonina con otros sistemas de neurotransmisión y su impacto en

la modulación de la actividad cerebral refuerzan su importancia en la fisiopatología de la esquizofrenia

2.3.2 Disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia

La dopamina es un neurotransmisor fundamental en el sistema nervioso central, involucrado en funciones como la motivación, el aprendizaje, la recompensa y el control del movimiento. Su papel en la esquizofrenia ha sido ampliamente estudiado, lo que llevó al desarrollo de la hipótesis dopaminérgica de la enfermedad. Esta teoría propone que un desequilibrio en la neurotransmisión dopaminérgica contribuye a la aparición de los síntomas característicos de la esquizofrenia (Rawani et al., 2024). El sistema dopaminérgico está compuesto por diversas vías neuronales que regulan funciones motoras, cognitivas y emocionales. Entre ellas, las vías nigroestriatal, mesocortical y mesolímbica desempeñan un papel clave en la fisiopatología de la esquizofrenia (Rawani et al., 2024; Nayak et al., 2025). La vía nigroestriatal, que conecta la sustancia negra con el núcleo caudado, es esencial para el control del movimiento. Su disfunción, caracterizada por una disminución en la actividad dopaminérgica, puede generar síntomas extrapiramidales similares a los observados en el Parkinson y en los efectos secundarios motores que pueden provocar los antipsicóticos. Por su parte, la vía mesocortical, que se origina en el área tegmental ventral y se proyecta hacia la corteza prefrontal, está implicada en procesos cognitivos y emocionales. La reducción de la actividad dopaminérgica en esta vía se ha vinculado con los síntomas negativos de la esquizofrenia, como la apatía y la anhedonia, además de déficits en la función ejecutiva. En contraste, la vía mesolímbica, que conecta el

área tegmental ventral con el sistema límbico, participa en la regulación de la motivación y el placer. Sin embargo, su hiperactividad ha sido relacionada con los síntomas positivos de la esquizofrenia, como alucinaciones y delirios (Brisch et al., 2014; Patel et al., 2014; Stahl, 2007; Nayak et al., 2025).

A pesar de su importancia, la hipótesis dopaminérgica no es suficiente para explicar la complejidad de la esquizofrenia. Por ello, se han explorado otros sistemas de neurotransmisión, como el glutamatérgico, en un intento por comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad.

2.3.3 Disfunción glutamatérgica en esquizofrenia

La teoría glutamatérgica de la esquizofrenia surgió a partir de la observación de que los antagonistas de los receptores NMDA pueden inducir síntomas psiquiátricos. Según esta hipótesis, una disfunción en la neurotransmisión glutamatérgica contribuye al desarrollo de los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la enfermedad (Moghaddam & Javitt, 2012). Se ha demostrado que ciertos fármacos que bloquean de manera no competitiva los receptores NMDA pueden reproducir estos síntomas en individuos sanos, lo que refuerza la conexión entre la disfunción del glutamato y la esquizofrenia (Paoletti et al., 2013). Esta teoría ha sido respaldada por estudios preclínicos en modelos animales, donde la administración de antagonistas NMDA generó alteraciones cognitivas y conductuales junto con un aumento en la liberación de glutamato en distintas áreas del cerebro (Lorrain et al., 2003). Estos hallazgos son consistentes con estudios en pacientes esquizofrénicos, en quienes se han identificado

niveles elevados de glutamato mediante espectroscopia de resonancia magnética (Merritt et al., 2021).

El glutamato es un neurotransmisor esencial para múltiples funciones cerebrales, como la maduración sináptica, el metabolismo energético y la regulación de procesos neurodesarrollativos (Ryan et al., 2021). Su liberación en la sinapsis depende de la glutamina suministrada por los astrocitos, células gliales que desempeñan un papel clave en la homeostasis del sistema nervioso central (Coyle, 2006). Existen tres tipos principales de astrocitos en el SNC: radiales, protoplásmicos y fibrosos (Liddel & Barres, 2015). Los astrocitos protoplásmicos, en particular, forman estructuras ramificadas que rodean las sinapsis en lo que se conoce como "cunas astrocíticas". Estas estructuras contienen una alta densidad de transportadores de glutamato responsables de su eliminación del espacio sináptico, previniendo la excitotoxicidad neuronal (Bushong et al., 2002; Sofroniew & Vinters, 2010). Además de su función en la regulación del glutamato, los astrocitos expresan receptores para mediadores inflamatorios, incluidas citocinas y quimiocinas (Pan et al., 2012). En estados patológicos, la presencia de citocinas proinflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ) puede inducir la transformación de los astrocitos en células presentadoras de antígeno (APC) y en células fagocíticas. Esta activación se asocia con el incremento de marcadores inflamatorios como los receptores tipo Toll (TLRs), el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y receptores inmunitarios intracelulares como Rig-1, los cuales participan en la activación de los inflamosomas (Zamanian et al., 2012). Estos complejos celulares detectan patrones moleculares de

daño (DAMPs) y activan la caspasa-1, lo que favorece la conversión de la pro-IL-1 en IL-1 β , una interleucina capaz de potenciar aún más la activación astrocítica y la liberación de mediadores inflamatorios. Este estado reactivo contribuye al estrés oxidativo y a la disminución en la captación de glutamato, lo que exacerba la excitotoxicidad neuronal (Nayak et al., 2025).

Investigaciones recientes han explorado la interacción entre los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico, señalando que una disfunción en la neurotransmisión del glutamato puede afectar la actividad dopaminérgica y viceversa (Rawani et al., 2024). Por ejemplo, una hipofunción de los receptores NMDA podría desencadenar un aumento excesivo en la liberación de dopamina en ciertas regiones cerebrales, lo que contribuiría a la manifestación de síntomas positivos en la esquizofrenia. Esta interdependencia entre ambos sistemas sugiere que estrategias terapéuticas dirigidas a múltiples vías de neurotransmisión podrían ser más eficaces en el tratamiento de la enfermedad (McCutcheon et al., 2020).

2.3.4. El vínculo entre la inflamación y los sistemas de neurotransmisión en la esquizofrenia

La hipótesis inflamatoria de la esquizofrenia ha emergido como un enfoque importante que complementa las teorías dopaminérgica y glutamatérgica, sugiriendo que la activación inmunitaria crónica y los procesos inflamatorios desempeñan un papel clave en la fisiopatología de la enfermedad (Orbe & Benros, 2023). Los mediadores inflamatorios, como las citocinas proinflamatorias, afectan la regulación de

los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, que están implicados en los síntomas psicóticos y afectivos. Por ejemplo, se ha observado que niveles elevados de citocinas como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) pueden alterar la liberación y la señalización de dopamina en la vía mesolímbica, exacerbando los síntomas positivos de la esquizofrenia, como las alucinaciones y los delirios (Müller et al., 2020).

Recientes estudios han evidenciado que la inflamación sistémica y la activación del sistema inmune innato pueden modular la actividad dopaminérgica, lo que contribuye al desarrollo de síntomas psicóticos. Se ha identificado que células inmunitarias como monocitos, linfocitos T y microglía expresan receptores dopaminérgicos, lo que sugiere una estrecha interacción entre la dopamina y el sistema inmunológico. Se ha observado que niveles elevados de dopamina pueden activar a los receptores D1, D2 y D4, lo que induce efectos antiinflamatorios, mientras que niveles reducidos de dopamina activan a los receptores D3 y D5, favoreciendo respuestas inflamatorias (Vidal & Pacheco, 2020).

Además, la presencia del marcador inflamatorio, interferón gamma (IFN- γ), puede alterar la disponibilidad y la unión de la dopamina a sus receptores. En estudios con primates, la administración de estos marcadores durante cuatro semanas redujo la liberación de dopamina en el estriado y disminuyó su unión a los receptores D2 (Felger et al., 2013). En humanos, pacientes con infección por el virus de la hepatitis C (VHC) tratados con interferón y ribavirina mostraron una disminución en la actividad del estriado ventral, acompañada de una reducción en el recambio dopaminérgico en

el caudado y el putamen (Capuron et al., 2012). Estos hallazgos son relevantes en la esquizofrenia, ya que los procesos inflamatorios pueden alterar la síntesis y disponibilidad de dopamina en el cerebro. Mientras que una menor producción de dopamina se ha relacionado con déficits cognitivos y síntomas negativos, la alteración en la unión de la dopamina a los receptores D2 podría contribuir a la disfunción dopaminérgica característica de la enfermedad (Nayak et al., 2025).

Asimismo, la inflamación crónica puede influir en el metabolismo del triptófano, desviándolo hacia la vía de la quinurenina, lo que reduce la síntesis de serotonina y afecta negativamente el estado de ánimo y la cognición. Esta relación ayuda a explicar los síntomas negativos y los déficits cognitivos observados en los pacientes, alineándose con la hipótesis serotoninérgica de la esquizofrenia. Estudios recientes han demostrado que la inflamación puede disminuir la disponibilidad de serotonina central y potenciar la disfunción glutamatérgica y dopaminérgica, lo que sugiere una interacción compleja entre estos sistemas de neurotransmisores bajo la influencia de mediadores inmunológicos (Orbe & Benros, 2023).

2.4. Epidemiología genética en la esquizofrenia

Los estudios de epidemiología genética realizados en familias, gemelos y adopción sugieren que la predisposición a padecer esquizofrenia es una de las más altas entre todos los desórdenes psiquiátricos, donde la heredabilidad es

aproximadamente del 81%, lo cual sugiere la existencia de factores genéticos asociados a la etiología de la esquizofrenia (Fatemi y Clayton, 2008).

2.4.1 Estudios en familias

Los estudios de familias sugieren un papel fundamental de factores genéticos asociados con la etiología de los trastornos psiquiátricos. Estos estudios nos permiten determinar la agregación de un fenotipo de interés en una familia en comparación con la población en general (Merikangas, 2018). Diversos estudios han demostrado que la esquizofrenia tiene un patrón de transmisión complejo en familias con múltiples miembros afectados, así como una notable variabilidad en la forma en que se manifiestan los síntomas (Meltzer y Fatemi, 2000; Sullivan *et al.*, 2005; Carter, 2006), esto se debe a que la esquizofrenia tiene una etiología heterogénea y distintos tipos de genes pueden estar involucrados en su desarrollo (Fatemi y Clayton, 2008).

2.4.2 Estudios en gemelos

Los estudios en gemelos permiten determinar el papel que desempeñan los factores genéticos y ambientales en el origen del fenotipo de interés. Esto se logra al comparar la concordancia fenotípica entre gemelos monocigóticos y dicigóticos. Los monocigóticos se caracterizan por compartir el 100% de su material genético, mientras que los dicigóticos comparten el 50%. Si se encuentra una mayor frecuencia de concordancia fenotípica de los gemelos monocigóticos en comparación con los dicigóticos, se infiere la existencia de factores genéticos involucrados en el origen de la conducta (Merikangas, 2018). Un meta-análisis realizado por Sullivan (2005) con 12

estudios en gemelos diagnosticados con esquizofrenia sugirió una concordancia fenotípica del 45% en los gemelos monocigóticos y de 14% en gemelos dicigóticos, lo cual sugiere la existencia de factores genéticos involucrados en el desarrollo de la esquizofrenia. Es importante señalar que la alta concordancia observada en gemelos monocigóticos en comparación con gemelos dicigóticos sugiere una fuerte contribución genética, el hecho de que la concordancia en gemelos MZ no sea del 100% indica que factores ambientales también juegan un papel clave en la patogénesis de la esquizofrenia (Tsuang, 2000). Los estudios de gemelos permiten diferenciar entre factores ambientales compartidos y no compartidos. Los factores compartidos incluyen aquellas influencias ambientales que afectan de manera similar a ambos gemelos, como las condiciones prenatales, la nutrición materna, las infecciones durante el embarazo o la exposición a toxinas intrauterinas. Sin embargo, la baja contribución de estos factores en la esquizofrenia ha sido señalada por diversos estudios, ya que los gemelos monocigóticos criados en el mismo entorno no siempre desarrollan la enfermedad de manera conjunta (Sullivan et al., 2003; Tsuang, 2000; Uher & Zwicker, 2017).

Por otro lado, los factores ambientales no compartidos han cobrado mayor relevancia en la investigación, ya que explican las diferencias fenotípicas entre gemelos MZ que comparten el mismo material genético. Estos factores incluyen eventos individuales como complicaciones perinatales, traumatismos en la infancia, abuso de sustancias, estrés psicosocial y experiencias adversas durante el desarrollo. Se ha propuesto que estos elementos pueden modular la expresión de genes

relacionados con la esquizofrenia a través de mecanismos epigenéticos, tales como la metilación del ADN o la modificación de histonas, lo que resulta en diferencias en la susceptibilidad a la enfermedad entre gemelos genéticamente idénticos (Sullivan et al., 2003; Uher & Zwickler, 2017).

2.4.3 Estudios de adopción

Los estudios de adopción analizan la similitud fenotípica de un individuo adoptado y sus padres biológicos comparado con sus padres adoptivos. Cuando el fenotipo es compartido por el sujeto adoptado y sus padres biológicos, indica la presencia de factores genéticos asociados. En el caso de que el sujeto adoptado comparta el fenotipo con sus padres adoptivos, entonces se dice que existe un componente ambiental asociado con el desarrollo de la enfermedad (Merikangas, 2018). Una aportación hecha por Heston (1966), en donde se analizó a 49 padres biológicos de individuos adoptados con esquizofrenia y 49 padres adoptivos de individuos con esquizofrenia, encontró una concordancia fenotípica sobre los trastornos del espectro esquizofrénico del 18.8% en los pacientes con sus padres biológicos, mientras que con los padres adoptivos fue del 10.7%.

Los estudios de familia, gemelos y adopción nos proporcionan evidencia sobre la participación de factores genéticos asociados con la etiología de la esquizofrenia.

2.5 Estudios de asociación del genoma completo (*Genome Wide-Association Studies, GWAS*)

La evidencia obtenida de los estudios genéticos ha permitido ampliar nuestra comprensión sobre las vías biológicas que están asociadas con la esquizofrenia.

Mediante estudios de asociación del genoma completo (GWAS), se han identificado múltiples genes asociados a vías neurobiológicas que incrementan el riesgo de desarrollar esquizofrenia (Corvin y Morris, 2013). Un GWAS analizo la información genética de 36,989 casos y 113,075 controles, identificando 128 asociaciones independientes en 108 loci genómicos, de los cuales 83 no habían sido reportados previamente (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Liu y colaboradores (2019) realizaron un meta-análisis de polimorfismos con al menos cuatro estudios independientes e integraron datos de GWAS. En este estudio se identificaron 21 SNPs en 14 loci independientes destacando tres genes (*MTHFR*, *DAOA* y *ARVCF*) que no habían sido previamente implicados en estudios GWAS de esquizofrenia.

El GWAS más reciente en esquizofrenia analizó datos de 76,755 individuos con el trastorno y 243,649 controles, identificando 287 loci genómicos independientes con asociaciones significativas. Los resultados de este estudio revelaron que estas asociaciones se concentraban en genes expresados en neuronas excitatorias e inhibitorias del sistema nervioso central, pero no en otros tipos celulares o tejidos, lo que refuerza la hipótesis de que las alteraciones en la neurotransmisión y la función sináptica desempeñan un papel clave en la etiología de la enfermedad. Mediante

mapeo fino y datos de genómica funcional, se identificaron 120 genes candidatos, de los cuales 106 codifican para proteínas, que podrían estar directamente implicados en la esquizofrenia (Trubetskoy et al., 2022).

Es importante destacar, que existe un incremento en el riesgo de desarrollar distintas enfermedades inmunológicas en pacientes con esquizofrenia (Benros et al., 2011; Benros et al., 2014). Para evaluar si esta relación podría explicarse por factores de riesgo genéticos, un estudio reciente utilizó datos de GWAS para comparar la arquitectura genética de la esquizofrenia con 19 enfermedades inmunológicas (Pouget et al., 2019). En este estudio, se analizaron 581 variantes previamente asociadas con enfermedades inmunológicas para evaluar su relación con la esquizofrenia. Se identificaron cinco variantes con posibles efectos pleiotrópicos. Posteriormente, se analizó la correlación genética entre la esquizofrenia y diversas enfermedades inmunológicas, donde destaco la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, psoriasis y lupus eritematoso sistémico (Pouget et al., 2019). Otro estudio. Aunado a lo anterior, otro GWAS ha señalado una asociación significativa entre regiones génicas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) con la esquizofrenia (Purcell et al., 2009). Esta región contiene más de 200 genes, entre ellos, reguladores maestros del sistema inmune, genes que codifican para el factor de necrosis tumoral (TNF) y otros involucrados en cascadas de señalización inmunológica (Purcell et al., 2009; Pouget et al., 2019).

Un estudio realizado por Lin y colaboradores (2016) indaga los mecanismos biológicos subyacentes a la esquizofrenia mediante un enfoque integrado posterior a GWAS. En

este estudio, se analizaron datos de GWAS, expresión génica, interacciones proteicas y análisis funcionales para lograr identificar rutas biológicas clave implicadas en el desarrollo de esquizofrenia. Mediante este enfoque, se identificaron 132 genes de riesgo potenciales para la esquizofrenia dentro de 76 regiones de riesgo, abarcando 120 variantes comunes asociadas con la enfermedad. De estos genes, 78 no habían sido previamente reconocidos como genes relacionados con la esquizofrenia en estudios GWAS anteriores. Los genes de riesgo identificados muestran una expresión significativa tanto en el cerebro como en el sistema inmunológico, lo que respalda hipótesis previas sobre el papel de procesos neuroinflamatorios en la esquizofrenia. Además, estos genes están altamente enriquecidos en vías celulares clave, lo que sugiere que desempeñan funciones distintas en la enfermedad.

Estos hallazgos proporcionan nueva evidencia de la interconexión entre el sistema inmune y la esquizofrenia, apoyando la hipótesis de que mecanismos inmunológicos pueden estar implicados en la fisiopatología del trastorno.

2.6 Respuesta inmune en la esquizofrenia

A pesar de los avances en el tratamiento, las opciones terapéuticas actuales, como los antipsicóticos, no logran abarcar la totalidad del espectro de síntomas, y los pacientes a menudo experimentan falta de respuesta, recaídas y efectos secundarios adversos. Esto ha generado un interés creciente en identificar nuevas vías biológicas

asociadas con la esquizofrenia que puedan facilitar el desarrollo de tratamientos más eficaces y específicos. Además, el descubrimiento de biomarcadores confiables permitiría la detección temprana de la enfermedad y un enfoque preventivo que podría mitigar la progresión y gravedad de los síntomas (Insel, 2010; Lewis y Gonzalez-Burgos, 2006).

Uno de los aspectos emergentes en la investigación de la esquizofrenia es el rol de la respuesta inmune en la fisiopatología del trastorno. Numerosos estudios han identificado un componente inmunológico en varios trastornos psiquiátricos, incluidos el trastorno depresivo mayor, el trastorno bipolar y la esquizofrenia (Caso et al., 2016). Esta evidencia sugiere que la inflamación y la disfunción del sistema inmunológico podrían contribuir a los mecanismos subyacentes de estos trastornos, promoviendo un estado proinflamatorio que podría estar relacionado con los cambios estructurales y funcionales observados en el cerebro de los pacientes (Douglas-Escobar et al., 2013; Severance et al., 2015).

En el caso de la esquizofrenia, se ha reportado que algunos pacientes presentan activación de la microglía, aumento de citocinas proinflamatorias (Goldsmith et al., 2016) y disrupción de la barrera hematoencefálica (Gurnik et al., 2016). Estos cambios pueden afectar el desarrollo y la plasticidad neuronal, así como la integridad de las conexiones sinápticas, aspectos cruciales en el funcionamiento cognitivo y emocional (Deshmane et al., 2009; Widera et al., 2004). Además, se ha propuesto que los receptores tipo Toll (TLRs), que son sensores inmunológicos innatos, desempeñan un papel en la detección de alteraciones en el ambiente celular y en la regulación de

las respuestas inflamatorias (Chen et al., 2019). Alteraciones en la activación de los TLRs podrían llevar a respuestas desadaptativas en el cerebro, afectando la neurogénesis y contribuyendo al deterioro cognitivo y emocional en la esquizofrenia (Caso et al 2016).

Además, la evidencia sugiere que factores externos, como infecciones prenatales, estrés temprano, y la exposición a toxinas, podrían influir en la inflamación y el riesgo de esquizofrenia, especialmente en individuos con predisposición genética (Muller et al., 2015). La identificación de estos mecanismos inmunológicos abre la puerta al desarrollo de terapias dirigidas a modular la inflamación y otros componentes de la respuesta inmune, lo cual podría complementar las terapias actuales y ofrecer alternativas para aquellos pacientes que no responden a los tratamientos convencionales.

2.7 Hipótesis sobre el origen de componentes inflamatorios en esquizofrenia

Una de las primeras teorías sobre posibles factores inmunológicos en la esquizofrenia se relaciona con la exposición a estrés. Estudios preclínicos han reportado que una exposición a estrés severo en roedores puede desencadenar la activación de distintas vías inflamatorias en diversas regiones cerebrales, lo cual puede llevar a incrementar la actividad del factor nuclear *kappa* B (NF-Kb), el factor de necrosis tumoral *alpha* (TNF- α), y altera los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en la corteza prefrontal, la cual es una región muy

relacionada con la esquizofrenia (Douglas-Escobar et al., 2013; Severance et al., 2015).

Por otra parte, se ha reportado una asociación estrecha con infecciones maternas prenatales y un incremento en el riesgo a desarrollar esquizofrenia, al igual que un aumento en la reactividad inmune en edades más adultas (Muller et al., 2015). Un estudio realizado por Brown y colaboradores (2004) mostro que, en mujeres diagnosticadas con influenza durante el primer trimestre de embarazo, el riesgo de que su descendencia desarrolle esquizofrenia aumenta 2 veces más.

Estudios clínicos han demostrado la existencia de alteraciones inmunes en pacientes con esquizofrenia (Muller & Schwarz, 2008). Se han reportado niveles aumentados de interleucina 6 (IL-6), IL-8 β y TNF- α en pacientes con esquizofrenia (Muller & Schwarz, 2008; Muller et al., 2006). Aunado a lo anterior, un meta-análisis realizado por Goldsmith y colaboradores (2016) mostró un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias en sangre periférica de pacientes con esquizofrenia en distintas fases de la enfermedad. En este estudio se observó un aumento de interferón gamma (IFN- γ), interleucinas (IL) IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL- 10, IL-12, al igual que del receptor soluble de IL-2 (sIL-2R), del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y una disminución en los niveles de IL-4 en pacientes con esquizofrenia durante su primer episodio psicótico. Del mismo modo, se ha observado un aumento en los niveles de PGE₂ y de COX-2 en plasma de pacientes en su primer episodio de psicosis (Garcia-Bueno et al., 2014; Garcia-Bueno et al., 2015; Bioque et al., 2024). Estudios realizados en cerebros *post-mortem* y estudios de

tomografía por emisión de positrones sugieren una activación microglial en cerebros de pacientes con esquizofrenia (Steiner et al., 2008; Laskaris et al., 2016; Reyes-Lizaola et al., 2024). Por otra parte, se ha reportado una relación estrecha entre enfermedades autoinmunes y la esquizofrenia (Benros, 2014) al igual que alteraciones en moléculas pro y anti-inflamatorias a nivel periférico en pacientes con esquizofrenia, lo cual se asocia con deficiencias cognitivas (Bulzacka et al., 2016; Cabrera et al., 2016). La síntesis de las moléculas pro y antiinflamatorias antes mencionadas son resultado de la activación de la respuesta inmune, por lo tanto, se ha sugerido que esta vía podría estar asociada con el desarrollo de esquizofrenia (García-Bueno *et al.* 2016).

2.8 La respuesta inmune innata y adaptativa

La defensa contra microorganismos se lleva a cabo mediante una respuesta coordinada que comprende tanto la inmunidad innata como la adaptativa. La inmunidad innata juega un papel crucial en las primeras horas después de una infección y se caracteriza por su rápida acción. En contraste, la respuesta inmune adaptativa se activa con la exposición a agentes infecciosos y se fortalece en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a un microorganismo específico. Cabe destacar que ambas respuestas son complementarias: la inmunidad innata envía señales tempranas de alerta que activan la respuesta adaptativa, y esta última potencia los mecanismos protectores de la inmunidad innata, mejorando la identificación y eliminación de los microorganismos (Abbas et al., 2018). La inmunidad

innata es considerada la primera línea de defensa frente a diversas moléculas tanto exógenas como endógenas. En este tipo de respuesta, las células emplean una amplia gama de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), fundamentales para identificar moléculas asociadas a microorganismos patógenos (PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos), como bacterias, virus y parásitos (Abbas et al., 2018), así como moléculas endógenas que indican estrés o daño tisular, conocidas como DAMPs (patrones moleculares asociados a daño). Para fortalecer la primera línea de defensa del organismo contra los patógenos, la respuesta inmune innata se basa en una serie de mecanismos rápidos y no específicos que actúan como barrera inicial. Dentro de estos mecanismos, los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, *TLRs*, por sus siglas en inglés) desempeñan un papel central. (Brubaker et al., 2015).

2.9 Estructura de los receptores tipo toll (TLRs)

Los TLRs son una familia de receptores celulares caracterizados por ser proteínas transmembranales de tipo I que contienen repeticiones ricas en leucina (RRLs) en su región N-terminal y un dominio TIR (receptor de interleucina 1/Toll) en la región C-terminal. La estructura en herradura formada en la región N-terminal facilita el reconocimiento de patrones moleculares de origen exógeno y endógeno (Bell et al., 2003). En la región C-terminal, el dominio TIR permite la interacción con moléculas adaptadoras, que son responsables de activar la transducción de señales (Chen et al., 2019).

Hasta el momento, se han identificado diez TLRs en humanos y trece en ratones. Según su localización, estos receptores se clasifican en dos grupos: los TLRs

de la membrana plasmática, que incluyen TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6; y los TLRs de endolisosomas, que incluye TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 (Roach et al., 2005; Wang et al., 2016; Chen et al., 2019). Es importante señalar que los receptores dentro de la misma categoría suelen formar heterodímeros para reconocer ligandos específicos; por ejemplo, TLR2 se une con TLR1 o TLR6 para detectar una mayor variedad de PAMPs (Sotoyama et al., 2023). En el sistema nervioso central (SNC), estos receptores están presentes en microglía, astrocitos, oligodendrocitos y, en menor grado, en neuronas (Hanke y Kiellian, 2011; Okun et al., 2011; Vidya et al., 2017). La activación de los TLRs mediante PAMPs y DAMPs puede iniciar procesos como la neurogénesis (Rolls et al., 2007), así como la diferenciación y maduración neuronal (Liu HY et al., 2014; Barak et al., 2014). Estudios en modelos animales sugieren que los TLRs podrían desempeñar un papel en la regulación de la proliferación de células progenitoras neurales y en la morfología neuronal, incluso sin la presencia de agentes infecciosos o daño tisular (Chen et al., 2019).

2.10 Vía de señalización de los TLRs para activar la inmunidad innata

La activación de la vía de señalización de los TLRs se lleva a cabo a través de cuatro adaptadores con dominios TIR: MyD88 (proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88), TRIF (interferón β inductor de adaptador con dominio TIR), TIRAP (proteína adaptadora con dominio TIR) y TRAM (molécula adaptadora asociada a TRIF) (Venkatasubramanian y Debnath, 2013). La cascada de señalización puede

variar entre los TLRs. En el caso de TLR1, TLR2 y TLR6, tras la unión del ligando, se forman homodímeros o heterodímeros que inician la transducción de señales (Chen et al., 2019). Una vez activado el receptor, MyD88 se recluta de forma indirecta mediante TIRAP. Luego, MyD88 recluta y activa a IRAK4 (cinasa 4 asociada al receptor de interleucina), la cual fosforila y activa a IRAK1. El complejo IRAK1/4 a su vez activa a TRAF6, una ubiquitina ligasa que poliubiquitina el complejo de inhibidores del factor nuclear kappa (IKK), permitiendo la liberación del factor NF- κ B. Libre en el citosol, NF- κ B se transloca al núcleo para inducir la expresión de citocinas inflamatorias e interferones tipo 1, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e IL-12 (Chen et al., 2019). Además, TRAF6 activa TAK1 (cinasa activada por TGF- β), que activa la vía de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos). Esta vía a su vez estimula a AP-1 (proteína activadora tipo 1), aumentando la transcripción de citocinas, la producción de moléculas de adhesión y la liberación de moléculas con funciones pro y antiinflamatorias (Sotoyama et al., 2023)

2.11 Los TLRs y su posible papel en la esquizofrenia.

Se ha sugerido que la microbiota intestinal desempeña un papel importante en el funcionamiento de la respuesta inmune innata y adaptativa, al igual que en el desarrollo y funcionamiento del cerebro (Olszak et al., 2012; Douglas-Escobar et al., 2013). Distintos procesos que relacionan al intestino como lo es la inflamación intestinal y disfunciones de la barrera intestinal pueden impactar en el sistema nervioso

central (Severance et al., 2015). De igual manera, se ha sugerido que condiciones autoinmunes como las alergias a los alimentos se asocian con la esquizofrenia, mediante la activación crónica del sistema inmunológico y los procesos inflamatorios que estas desencadenan. Las alergias alimentarias provocan respuestas inmunes desreguladas que incluyen un aumento en la liberación de citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas moléculas inflamatorias pueden atravesar la barrera hematoencefálica o comprometer su integridad, lo que permite una mayor exposición del cerebro a factores inmunitarios que afectan la homeostasis neuronal. Esta inflamación sistémica y neuroinflamación han sido implicadas en alteraciones de la neurogénesis, la plasticidad sináptica y la función neurotransmisora, que son fundamentales en la fisiopatología de la esquizofrenia (Pedersen et al., 2012; Lachance & McKenzie, 2014; Chen et al., 2019). Con base a todo lo anterior, se ha generado una hipótesis en la cual todas estas vías mencionadas anteriormente, como la neuroinflamación, infecciones en el neurodesarrollo, la transmisión glutamatérgica y la sensibilidad a antígenos de distintos alimentos pueden tener en común el tracto gastrointestinal (Nemani et al., 2015).

En el tracto intestinal humano, la microbiota compuesta por millones de bacterias beneficiosas interactúan con los TLRs presentes en las células epiteliales intestinales, lo que permite mantener la homeostasis del sistema inmunológico y del equilibrio microbiano (Yiu et al., 2017). Esta interacción es esencial, ya que permite al sistema inmune diferenciar entre microbios comensales y patógenos, evitando así respuestas inflamatorias innecesarias. Sin embargo, se ha observado que alteraciones

en la relación entre la microbiota y los TLRs pueden causar inflamación crónica y daños en los tejidos, contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo trastornos autoinmunes e inflamatorios (Rakoff-Nahoum et al., 2003). Una de las teorías bastante relacionada con la esquizofrenia y alteraciones en la respuesta inmune es la hipótesis glutamatérgica. Esta hipótesis sugiere una hipofunción de receptores NMDA, la cual incrementa la liberación de glutamato en áreas corticales e hipocampales, llevando a una excitotoxicidad potencial a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Stone et al., 2007; Schobel et al., 2013). En dicho proceso, existe una respuesta enzimática que relaciona la hipótesis glutamatérgica con la inflamación y la activación inmunológica inducida por traslocación de bacterias del intestino a través de receptores específicos como los TLRs. La enzima 2, 3-dioxigenasa (IDO) al activarse por citocinas proinflamatorias, puede generar metabolitos de kinurenina neurotóxicos, como lo son los ácidos kinurenico y quinoleico, los cuales contribuyen a la patogénesis de la esquizofrenia debido a su interacción en los receptores NMDA de glutamato (Hilmas et al. 2011). Un estudio realizado por (Plitman et al., 2017; Erhard et al., 2003) reportó niveles elevados de ácido kinurenico en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia.

Por otro lado, el estrés crónico afecta la barrera intestinal, facilitando la traslocación de bacterias desde el lumen intestinal hacia la circulación sistémica, lo cual puede exacerbar la respuesta inflamatoria y comprometer la salud general (Caso et al., 2016). Esta traslocación y la inflamación subsecuente están asociadas con una serie de efectos negativos en el organismo, incluyendo la alteración de la función

inmune y el deterioro de órganos y tejidos. Dada la implicación de los TLRs en la detección de microorganismos y la regulación de la inflamación, varios estudios han explorado la relación entre los TLRs y factores prenatales como infecciones, inflamación materna, estrés oxidativo y sus efectos a largo plazo en el cerebro.

En este contexto, estudios de asociación genética han identificado genes que codifican a los TLRs y a otras moléculas relacionadas con la vía de señalización, que pueden influir en la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias y neuropsiquiátricas. Se ha sugerido que estas variantes pueden modular la respuesta inmune innata, afectando la activación de vías proinflamatorias en respuesta a señales microbianas y estrés ambiental. En particular, polimorfismos en *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* han sido relacionados con un mayor riesgo de desarrollar esquizofrenia. (García-Bueno et al., 2016; Venkatasubramanian y Debnath, 2013; Sotelo et al., 2023).

2.12 Estudios de asociación genética entre TLRs y esquizofrenia

Los estudios de asociación genética son investigaciones que analizan genes o variaciones genéticas específicas, como los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), que pueden estar relacionadas con una mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades o condiciones. Estos estudios se llevan a cabo comparando la frecuencia de variantes genéticas entre individuos afectados por una enfermedad y aquellos que no la presentan. Este enfoque ha permitido avances significativos en la identificación de factores de riesgo genético para diversas enfermedades complejas incluyendo los trastornos mentales (Shastry, 2009).

Un estudio realizado por Ayari y colaboradores (2024) mostro una asociación de los genes *TLR2* y *TLR9* y la etiología de la esquizofrenia. De manera similar, otro estudio reporto una asociación de la variante rs3804099 del gen *TLR2* con un incremento en el riesgo a desarrollar esquizofrenia (Sharma et al., 2022). Por otra parte, un estudio realizado por Kang y colaboradores (2013) sugiere una asociación entre los polimorfismos rs3804099 y rs3804100 del gen *TLR2* con la etiología de la esquizofrenia en población coreana. Específicamente, los resultados indicaron que los alelos C de rs3804099 y rs3804100 podrían estar relacionados con síntomas cognitivos en pacientes con esquizofrenia, particularmente con dificultades en la concentración.

Es importante destacar que los estudios previamente mencionados se realizaron en población europea y asiática. Hasta nuestro conocimiento, solo existe un estudio de asociación genética realizado en población mexicana, en el cual se reporta una asociación entre la variante rs4833093 del gen *TLR1*, rs5743709 del gen *TLR2* y rs3775073 del gen *TLR6* y un incremento en el riesgo a desarrollar esquizofrenia (Sotelo et al., 2023). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que los procesos inflamatorios mediados por TLRs podrían influir en la psicopatología de la esquizofrenia, lo que resalta la importancia de continuar explorando el papel de los receptores tipo Toll en la fisiopatología de este trastorno

Los SNPs son variaciones en un solo nucleótido dentro de una secuencia de ADN que pueden ejercer efectos significativos sobre la expresión génica (Shastri, 2009). Estas variaciones son la forma más común de variabilidad genética en el

genoma humano y, dependiendo de su ubicación y naturaleza, pueden influir en múltiples etapas del proceso de expresión de los genes, tales como la transcripción (Nishizaki et al., 2020; Degtyareva et al., 2021), el procesamiento del ARN y la traducción (Shatoff y Bundschuh, 2020; Johnson et al., 2008), afectando en última instancia la función celular y la susceptibilidad a diversas enfermedades.

Se han reportado alteraciones en la expresión de genes que codifican a los TLRs en pacientes con esquizofrenia en comparación con los controles; sin embargo, las causas de estas alteraciones siguen siendo desconocidas (Kozłowska et al., 2018).

Los SNPs ubicados en las regiones promotoras o en otros elementos reguladores del ADN pueden modificar la afinidad de los factores de transcripción por sus sitios de unión. La alteración en la unión de estos factores puede llevar a un aumento o disminución en la tasa de transcripción de los genes afectados, lo que modifica los niveles de RNA mensajero (RNAm) disponibles para la traducción y, en consecuencia, la cantidad de proteína expresada (Degtyareva et al., 2021). Por otra parte, los SNPs situados en sitios de corte y empalme (splicing) pueden interferir con el procesamiento adecuado del ARNm, generando isoformas alternativas o incluso RNAm defectuosos. Este tipo de variación podría producir proteínas truncadas o mal formadas, o, en su defecto, resultar en un ARNm que sea rápidamente degradado por la célula (Shatoff y Bundschuh, 2020). Existen estudios que reportan como SNPs localizados en la región 3' no traducida (UTR) de un gen, pueden afectar la estabilidad del RNAm, regulando su velocidad de degradación. Un SNP en esta región podría hacer que el RNAm se degrade más rápidamente o, en algunos casos, estabilizarlo,

afectando la cantidad de proteína sintetizada (Presnyak et al., 2015; Forrest et al., 2020). Los SNPs presentes en la región 5' UTR o cerca del sitio de inicio de la traducción pueden influir en la eficiencia con la que los ribosomas inician la síntesis proteica. Esta variación en la eficiencia de traducción puede afectar la velocidad de producción de proteínas, así como la cantidad de proteína activa disponible en la célula (Mockenhaupt y Makeyev, 2015).

La identificación de SNPs específicos que afectan la expresión génica y proteica de los TLR podría ofrecer una nueva perspectiva en la comprensión de los mecanismos inmunológicos de la esquizofrenia y abrir nuevas vías para el desarrollo de terapias inmunomoduladoras.

3. Justificación

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico complejo, crónico y debilitante que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. Se caracteriza por la presencia de síntomas positivos, negativos y cognitivos que impactan significativamente la funcionalidad social y laboral de los individuos afectados. En México, la esquizofrenia representa un problema de salud pública relevante, con costos económicos y sociales considerables, dado que su diagnóstico y tratamiento requieren una atención integral y prolongada.

A pesar de los avances en la investigación sobre los factores genéticos asociados con la esquizofrenia, los mecanismos moleculares subyacentes que contribuyen a su desarrollo aún no se comprenden completamente. Recientes estudios han señalado una posible implicación del sistema inmune innato en su etiología, lo que ha llevado a al estudio de los TLRs y su posible implicación con la esquizofrenia. Los TLRs son proteínas transmembranales que desempeñan un papel esencial en la detección de patrones moleculares asociados a patógenos y en la activación de respuestas inflamatorias. Entre ellos, TLR1, TLR2 y TLR6 son componentes clave que forman complejos heterodiméricos responsables de reconocer componentes bacterianos y desencadenar la señalización inflamatoria.

La relevancia de este estudio radica en la necesidad de entender cómo las variantes genéticas rs4833093 del gen *TLR1*, rs5743709 del gen *TLR2* y rs3775073 del gen *TLR6* influyen en la expresión génica y proteica de estos receptores en pacientes con esquizofrenia. Este conocimiento podría contribuir a dilucidar los mecanismos inmunológicos involucrados en la enfermedad, proporcionar posibles biomarcadores de susceptibilidad y abrir nuevas vías para el desarrollo de terapias dirigidas a un tratamiento individualizado. Por tanto, la presente investigación busca aportar evidencia científica que fortalezca el entendimiento de la relación entre la inmunidad innata y la esquizofrenia, un campo aún poco explorado, pero con gran potencial clínico y terapéutico.

4. Hipótesis

Las variantes genéticas rs4833093/*TLR1*, rs5743709/*TLR2* y rs3775073/*TLR6* tienen un efecto en la expresión génica y proteica, y en la función de los receptores tipo toll alterando la vía de señalización de la respuesta inmune innata en pacientes con esquizofrenia.

5. Objetivo General

Determinar el efecto diferencial por portación de alelos del *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en los niveles de expresión génica, cantidad proteica y en la funcionalidad de los receptores.

6. Objetivos particulares

1. Determinar si las variantes genéticas rs4833093/*TLR1*, rs5743709/*TLR2* y rs3775073/*TLR6* se asocian a cambios en los niveles de expresión de los genes *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles sanos.
2. Cuantificar los niveles proteicos de los receptores *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en monocitos de pacientes y controles.
3. Determinar los cambios en la producción de moléculas pro- y antiinflamatorias tras un estímulo activador de la vía de los TLRs en células portadoras de las variantes genéticas.

7. Material y Métodos

7.1 Selección de la muestra

7.1.1 Muestras de pacientes

Se incluyeron a 24 pacientes provenientes de la clínica de esquizofrenia del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz (INPRFM).

7.1.2 Criterios de inclusión de pacientes

Pacientes hombres y mujeres, mayores de 18 años, de nacionalidad y ascendencia mexicana, con un diagnóstico psiquiátrico principal para esquizofrenia de acuerdo con los criterios del Manual Diagnostico y estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5).

Todos aceptaron participar voluntariamente en el estudio mediante la firma de la carta de consentimiento informado (Anexo 1).

7.1.3 Criterios de exclusión de pacientes

Sujetos con una infección activa al momento de la toma sanguínea; algún diagnóstico de enfermedad autoinmune o inflamatoria crónica. Pacientes en tratamiento con medicamentos esteroideos o no esteroideos con al menos 1 semana previa a la toma de muestra sanguínea.

7.1.4 Muestra de controles

Se incluyeron 24 sujetos sanos psiquiátricamente, tanto hombres como mujeres mayores de 18 años, de nacionalidad y ascendencia mexicana, que mediante una entrevista psiquiátrica no presentaran algún trastorno psiquiátrico, no haber presentado antecedentes heredofamiliares de ningún trastorno psiquiátrico y haber aceptado participar en el estudio mediante la firma de la carta de consentimiento informado (Anexo 2).

7.1.5 Criterios de exclusión de controles

Personas con una infección activa al momento de la toma sanguínea; algún diagnóstico de enfermedad autoinmune o inflamatoria crónica. Sujetos en tratamiento con medicamentos esteroideos o no esteroideos con al menos 1 semana previa a la toma de muestra sanguínea.

Tanto pacientes como controles tuvieron que ser homocigotos para las variantes de los polimorfismos de los genes de estudio. Las características de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los SNPs de interés

Gen	SNP	Chr. Posición	Gene position	Alelo mayor/ alelo menor
<i>TLR1</i>	rs4833093	4:38788119	Intrón	G/T
<i>TLR2</i>	rs5743709	4:153705250	Exón	A/G
<i>TLR6</i>	rs3775073	4:38828211	Exón	T/C

Chr: Cromosoma; SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

Por otra parte, se utilizó el Alcohol, Smoking, and Substance Involvement Screening Test (ASSIST por sus siglas en ingles), una herramienta desarrollada por el Grupo de Trabajo ASSIST de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para evaluar el consumo de sustancias en pacientes y controles. Este cuestionario permitió analizar tanto el consumo a lo largo de la vida como el consumo reciente (en los últimos tres meses) de diez sustancias distintas, además de identificar posibles síntomas de abuso y dependencia asociados a su uso (WHO ASSIST Working Group, 2002). Si bien el ASSIST contempla el análisis de diversas sustancias, en este estudio se observó que, dentro del periodo reciente evaluado (últimos tres meses), solo el alcohol y el tabaco fueron reportados como consumidos por los pacientes y el grupo control. Es decir, aunque se evaluaron otras sustancias, no se encontró evidencia de su consumo en este grupo durante dicho periodo.

7.2 Obtención de muestra sanguínea

Se obtuvieron 15 ml de sangre periférica por punción venosa en tubos Vacutainer™ con EDTA. Todos los tubos fueron identificados con un código numérico para proteger la identidad de los participantes.

7.3. Aislamiento de células mononucleares (PBMCs) de sangre periférica

El aislamiento de PBMCs se realizó mediante el método de gradiente de densidades por centrifugación descrito por Fuss y colaboradores (2009). Las muestras sanguíneas se centrifugaron por 15 min a 2000x g a temperatura ambiente para

obtener un paquete celular enriquecido en leucocitos (*buffy coat*). Se separó el *buffy coat* y se resuspendió en 10 mL de solución salina balanceada de Hank's (HBSS). La suspensión celular se agregó lentamente otro tubo falcon que contenía 3 mL de solución Ficoll- Hypaque® (3 ml de Ficoll-Hypaque® por 10 mL de suspensión celular) y se centrifugó por 20 min a 900 x g. Se recuperó y transfirió la interfase enriquecida de PBMCs en un tubo nuevo. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con HBSS y centrifugaciones por 10 min a 600 x g a temperatura ambiente.

7.4 Selección positiva con perlas magnéticas (MACs)

Con la finalidad de obtener una población enriquecida en monocitos CD14+, se realizó la separación de PBMC mediante el sistema MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), que consta de una separación inmunomagnética con anticuerpos para CD14 acoplados a perlas magnéticas. Posterior a esta separación, se realizó un conteo celular para conocer la cantidad de monocitos obtenidos de cada participante. De un promedio de 15.5×10^6 células obtenidas, se destinaron 5×10^6 células para los estudios de expresión, 4.5×10^6 células para los análisis proteínicos, y 5.5×10^6 células para los análisis funcionales. En cuanto al análisis de genotipificación, se utilizó la suspensión celular enriquecida en linfocitos para aprovechar la muestra en su totalidad.

7.5. Inmunofluorescencia de CD14, TLR1, TLR2 y TLR6

Una vez hecha la separación inmunomagnética, la suspensión celular enriquecida en monocitos CD14⁺ se lavó dos veces con HBSS y se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, solución 1X GlutaMax, y solución 1X penicilina estreptomicina. Posteriormente, se cultivaron 25,000 células en platos de cultivo de 4 pozos de 12mm. Las células se incubaron toda la noche a 37°C, con 5% de CO₂, con una atmósfera húmeda. Al día siguiente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 min y se lavó dos veces con TBS para retirar el exceso del fijador. El bloqueo se realizó colocando suero de burro al 10%, 0.3M de glicina al 0.05% y Tween20 en TBS por 30 min. Para la detección de CD14, se realizó una inmunofluorescencia usando R-PE conjugado con anti-CD14 para humano (Life technologies MHCD1404) en una dilución 1:150. La detección de los TLRs fue mediante fluorescencia indirecta, utilizando los anticuerpos primarios que se describen a continuación: anti-TLR1 hecho en conejo (Novus Biologicals NB100-56563), anti-TLR2 hecho en ratón (Novus Biologicals NB100-56722) y anti-TLR6 hecho en conejo (Novus Biologicals NBP1-76664), para estos tres casos se realizó una dilución 1:200 en suero de burro 1%, con 0.05% de Tween20 en TBS. Las muestras se dejaron incubando toda la noche a 4°C en una cámara húmeda protegida de la luz. Después de haber realizado cuatro lavados con TBS (0.1%), las células fueron incubadas con sus respectivos anticuerpos secundarios: anti-conejo IgG conjugado con Alexa Fluor® 647 (Abcam ab150075; dilución 1:1000) y un anti- mouse IgG conjugado con Alexa Fluor® 488 (Jackson ImmunoResearch 715-545-150; dilución 1:800) incubado en

TTBS por 1 hora a temperatura ambiente cubierto de la luz. Finalmente, se realizaron lavados para eliminar el excedente de anticuerpo secundario y se colocó 1 μ M de DAPI para la tinción nuclear por 10 min, se lavaron las muestras con agua desionizada y se colocaron en un portaobjeto con CitiFluor® para la visualización de imágenes. Las imágenes fueron observadas con un microscopio confocal LSM900 con Airyscan (ZEISS) y se analizaron con el programa FIJI Image J 2.9.0 (NIH Image J, Bethesda, USA).

7.6. Genotipificación por PCR en Tiempo Real

La genotipificación de los polimorfismos rs4833093 (C_44103593_10) del gen *TLR1*; rs5743709 (C_25607728_10) del gen *TLR2*; y rs3775073 (C_25809256_30) del gen *TLR6*, se llevó a cabo mediante discriminación alélica por PCR en tiempo real (Applied Biosystems StepOne™), con sondas TaqMan®. El volumen final de reacción fue de 7 μ L: 50 μ g de DNAg, 1X Master Mix II, agua para PCR (Lonza) y 1X de sonda TaqMan®. El protocolo de la reacción consistió en una fase de mantenimiento a una temperatura de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos y un minuto de alineación y extensión a 60°C. La amplificación se llevó a cabo con el equipo 7500 Real Time PCR System con el software SDS v2.1 (Applied Biosystems StepOne™).

7.7. Extracción de RNA y obtención de cDNA por qPCR

Partiendo de 5×10^6 células, se obtuvo RNA total utilizando el método de TRIzol™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit SuperScript IV VILO Máster Mix (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron tres replicas por cada muestra utilizando PCR StepOne Real-Time (Applied Biosystems StepOne).

Como primer paso, se realizó la digestión del gDNA, utilizando 1ul de solución ezDNase 10X, 1ul de enzima ezDNase, 2.0 µg de RNA total y 6 µl de agua libre de RNAsas. Posteriormente, se mezcló la reacción y se incubó a 37°C por 2 min. Por último, se preparó la reacción de retrotranscripción, que consistió en 4 µl de SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific) y 6 µl de agua libre de RNAsas. Para llevar a cabo el alineamiento de primers, las muestras se incubaron a 25°C por 10 min y una incubación a 50°C por 10 min para la transcripción reversa. Finalmente, las muestras se incubaron a 85°C para inactivar la enzima. Para llevar a cabo la qRT-PCR, se utilizaron 10 ul de volumen de reacción, conformados por 500ng de cDNA, TaqMan Universal Master Mix II 1X y Sonda TaqMan de expresión.

7.8 Análisis de expresión génica de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6*

El estudio de expresión se analizó mediante sondas TaqMan para *TLR1* (Hs00413978_m1), *TLR2* (Hs02621280_s1), *TLR6* (Hs00271977_s1) y *ACBT*

(Hs99999903_m1) como gen constitutivo, utilizando 7500 Real Time PCR System con el programa SDS v2.1 (Applied Biosystems Inc.; Foster City, CA).

7.9 Evaluación por citometría de flujo de TLR1, TLR2 y TLR6

Posterior a la elución por las columnas magnéticas, se tomaron aproximadamente 4.5×10^6 para realizar el análisis por citometría de flujo. Para esto, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 min. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS para eliminar el fijador y realizar las tinciones correspondientes para TLR1, TLR2 y TLR6. Para la detección de CD14, se realizó una inmunofluorescencia usando R-PE conjugado con anti-CD14 para humano (Life technologies, MHCD1404). La detección de los TLRs de interés fue mediante fluorescencia indirecta, utilizando los anticuerpos primarios que se describen a continuación: anti-TLR1 hecho en conejo (Novus Biologicals; NB100-56563), anti-TLR2 hecho en ratón (Novus Biologicals NB100-56722) y anti-TLR6 hecho en conejo (Novus Biologicals NBP1-76664). Las muestras se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios: anti-conejo IgG conjugado con Alexa Fluor® 647 (Abcam) y un anti- mouse IgG conjugado con Alexa Fluor® 488 (Jackson ImmunoResearch 715-545-150) incubado en PBS por 30 min a temperatura ambiente

7.8. Cultivos celulares para estudios funcionales

Para llevar a cabo el análisis funcional, se cultivaron dos cajas por individuo con 2.25×10^6 monocitos en cada una. Se colocó RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, GlutaMax 1X, y penicilina estreptomicina 1X. Las células se incubaron toda la noche a 37°C, con 5% de CO₂, con una atmósfera húmeda. Posteriormente, una de las cajas fue estimulada con 25 ng/mL de lipopeptido 2 activador de macrófagos (MALP-2) (Novus, NBP2-26219), el cual es un ligando específico para TLR6 y TLR2 y la segunda caja de cultivo no se le colocó ningún estímulo como control.

7.11 Ensayo de perfil proteómico

Después de una incubación de 24 h, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta su análisis posterior. La proteína total en los sobrenadantes se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce), según las recomendaciones del fabricante. Los sobrenadantes de cultivo (500 µg de proteína por muestra) se analizaron para detectar los factores secretados por monocitos utilizando el kit Proteome Profiler™ Human XL Cytokine Array (R&D Systems), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El volumen densitométrico de los puntos inmunorreactivos se determinó con el software FIJI/ImageJ versión 8 (NIH, USA). Los datos se normalizaron restando el volumen

densitométrico de los puntos de control negativo y se expresaron como un porcentaje del volumen densitométrico de los puntos de control positivo del inmunoensayo.

7.12 Análisis estadístico

Las características demográficas y clínicas de los pacientes y los controles fueron analizadas utilizando diferentes pruebas estadísticas según el tipo de variable. Para las variables continuas, como la edad, el índice de masa corporal y la presión arterial, se empleó la prueba t de Student. En el caso de las variables categóricas, como el sexo, estado civil, nivel educativo, situación laboral y consumo de sustancias, se utilizó la prueba de chi-cuadrado.

El análisis de expresión génica se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0.0 (GraphPad Prism, 2022). Todos los resultados fueron normalizados con los valores de expresión relativa de *ACTB*. Los valores de ciclo umbral se promediaron, y los niveles de expresión génica relativa de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* se determinaron mediante el método comparativo de ciclo umbral descrito por Rao y colaboradores (2013). Las diferencias entre la expresión de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en pacientes y controles se calcularon mediante una prueba t. Los cambios en la expresión génica en relación con la portación de genotipo específico se analizaron utilizando ANOVA y la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Dunn's. Para el análisis proteico, se calculó la cantidad de fluorescencia relativa de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* mediante citometría de flujo entre pacientes y controles utilizando una prueba t. Por otra parte,

se analizaron ANOVA y la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Tukey para evaluar diferencias en la fluorescencia relativa en relación con la presencia alélica en pacientes y controles.

Para el análisis funcional, se realizaron un mapa de calor y un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para el análisis exploratorio de los perfiles de secreción. El primer enfoque de los valores experimentales fue un mapa de calor escalado por filas (escala z para cada variable) y dendogramas de clasificación no dirigida para agrupar las moléculas y los sujetos de acuerdo con sus similitudes. Cada columna representó a un sujeto diferente, con o sin tratamiento. La otra forma de visualización fue un biplot derivado del método PCA, el cual permite reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, manteniendo la mayor cantidad posible de la variabilidad presente en los datos originales (Jolliffe y Cadima, 2016; Camargo, 2022). El fundamento básico del PCA radica en encontrar un conjunto de vectores ortogonales, denominados componentes principales, que describen la dirección de máxima variación en los datos. Los componentes principales se ordenan en función de la cantidad de varianza que explican en los datos de partida. Al realizar la transformación de los datos originales a través de los componentes principales, podemos reducir la dimensionalidad del conjunto de datos, lo que facilita la visualización y la interpretación de los resultados (Camargo, 2022). El mapa de calor se evaluó utilizando la biblioteca *heatmaply* versión 1.4.0 y el enfoque PCA con la biblioteca *PCA tools* versión 2.16.0, todo dentro del paquete de software R versión 4.4.1.

8. Resultados

8.1 Características Demográficas y Clínicas de la Muestra

Las características clínicas y demográficas de la muestra se presentan en la Tabla 2. El análisis no mostro diferencias significativas en la edad ni en el sexo entre los pacientes y los controles. En cuanto al consumo de sustancias, ninguno de los participantes reportó el uso de drogas ilegales. Por esta razón, en la Tabla 2 solo se presentan los datos relacionados con el consumo de tabaco y alcohol. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de comparación.

Por otra parte, se observó que el porcentaje de personas solteras fue mayor en el grupo de pacientes en comparación con los controles. Asimismo, los pacientes presentaron una mayor proporción de individuos con educación básica, mientras que en el grupo control se encontró una mayor frecuencia de personas con niveles educativos avanzados. De manera similar, la proporción de personas desempleadas fue superior en los pacientes en comparación con los controles.

Table 1. Características demograficas y clinicas de la muestra

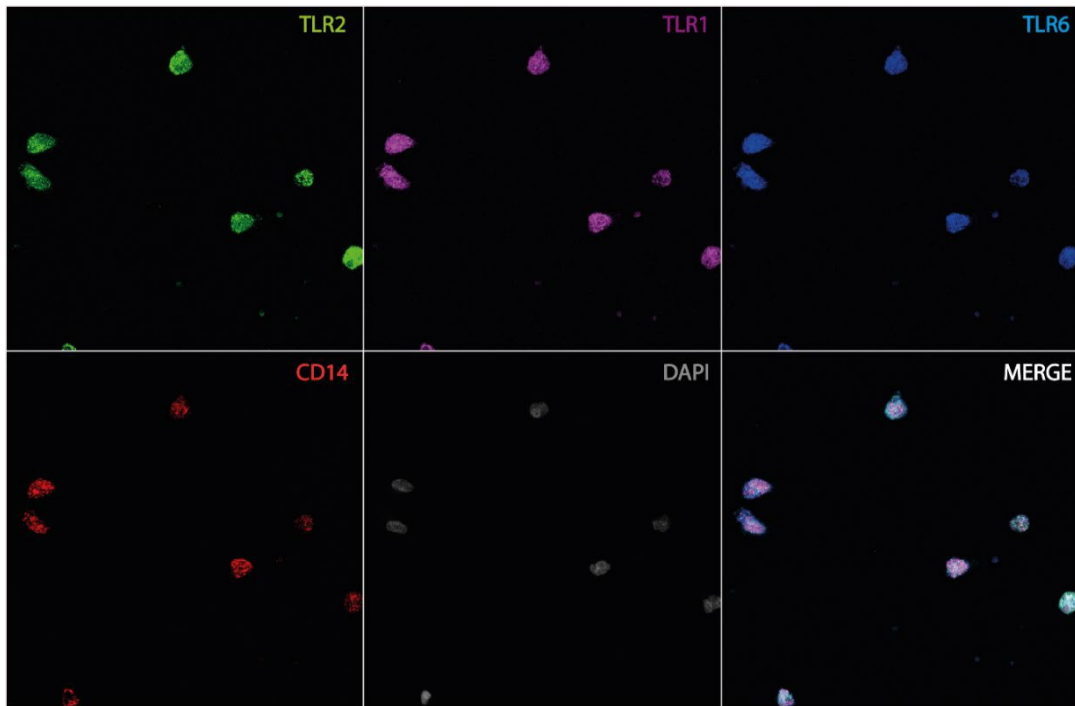
Característica	Controles (n= 24)	Pacientes (n=24)	Estadística
Edad, años, media (DE),	36.38(5.3)	41.71 (3.2)	$t=1.63, p= 0.108$
Sexo, n (%)			
Hombres	13(59.09)	15 (62.50)	$X^2=0.05, p= 0.812$
Mujeres	9 (40.91)	9 (37.50)	
Estado civil, n (%)			
Casado	10(41.67)	1 (4)	$X^2=9.97, p=0.0016$
Soltero	14 (58.33)	24 (96)	
Escolaridad, n (%), años			

Básica	2 (8)	11 (46)	$\chi^2 = 16.1, p = 0.0003$
Media	6 (25)	10 (41)	
Superior	16 (57)	3 (13)	
Trabaja, n (%)			
Yes	24 (100)	13 (54.1)	$\chi^2 = 14.2, p = 0.0002$
No	0 (0)	11 (45.9)	
Consumo de tabaco, n (%)	15 (62.5)	14 (58.33)	$\chi^2 = 0.08, p = 0.767$
Consumo de alcohol, n (%)	14 (66.67)	19 (79.17)	$\chi^2 = 0.89, p = 0.344$
Presión arterial sistólica, media (DE)	120 (11.1)	117 (14.2)	$t = 0.69, p = 0.492$
Presión arterial diastólica, media (DE)	73.8 (10.3)	73.5 (10.2)	$t = 0.098, p = 0.921$
Índice de masa corporal, media (DE)	27.5 (7.13)	29.3 (6.38)	$t = 0.918, p = 0.363$
Edad de inicio, media (DE), años	-	23.2 (8.42)	
Edad de diagnóstico, media (DE), edad	-	26.1 (8.54)	
Uso de antipsicóticos de segunda generación, n (%)	-	15 (62)	
Uso de antipsicóticos de primera generación, n (%)	-	11 (46)	
Uso de antidepresivos, n (%)	-	13 (54)	

8.2 Detección inmunofluorescente de CD14+, TLR1, TLR2 y TLR6

La detección inmunofluorescente de CD14+ se realizó para probar la eficiencia de la selección inmunomagnética de monocitos de sangre periférica con la metodología de MACS. Respecto al recuento total de núcleos en cinco campos aleatorios fue del $87.5 \pm 2.6\%$. A partir de estas células CD14+, una evaluación preliminar de la inmunoreactividad de los TLR mostró que $> 90\%$ de las células expresaban TLR1, TLR2 y TLR6 (Figura 1).

A



B

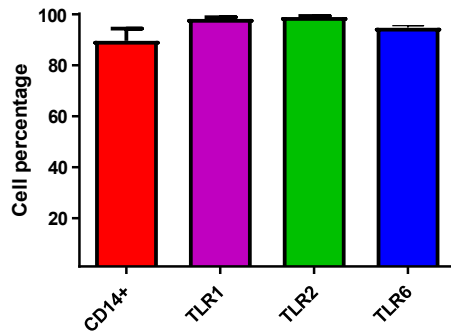


Figura 1. Caracterización inmunofluorescente de células monocíticas humanas para los receptores TLR1, TLR2 y TLR6. **A)** Las células fueron teñidas para la detección de núcleos con DAPI (gris), el marcador específico de monocitos CD14⁺ (rojo) y los receptores Toll-like TLR1 (magenta), TLR2 (verde) y TLR6 (azul). La imagen compuesta (MERGE) muestra la colocalización de estos marcadores, confirmando la expresión conjunta de los receptores TLR en células monocíticas. **B)** El gráfico de barras representa el porcentaje de células inmunorreactivas para CD14⁺ (89.60 ± 4.7), TLR1 (98.2 ± 0.65), TLR2 (98.9 ± 0.39) y TLR6 (94.6 ± 0.85). Estos resultados reflejan la alta eficiencia del método de separación de monocitos mediante perlas inmunomagnéticas, asegurando una población celular homogénea y adecuada para el análisis de expresión de receptores tipo Toll.

8.3 Análisis de expresión génica de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6*

Para observar los niveles de expresión de los genes *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en pacientes con esquizofrenia y controles sanos en nuestra muestra, se realizó un análisis inicial sin tomar en cuenta la portación de los alelos de interés.

Se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión génica de *TLR1* ($t=17.3$, $p<0,0001$), *TLR2* ($t=8,61$, $p<0,0001$) y *TLR6* ($t=13,8$, $p=0,0001$) entre la muestra total de pacientes y los controles (Figura 2). Los niveles de expresión génica de los tres TLRs mostraron una disminución notable en pacientes con esquizofrenia en comparación con controles.

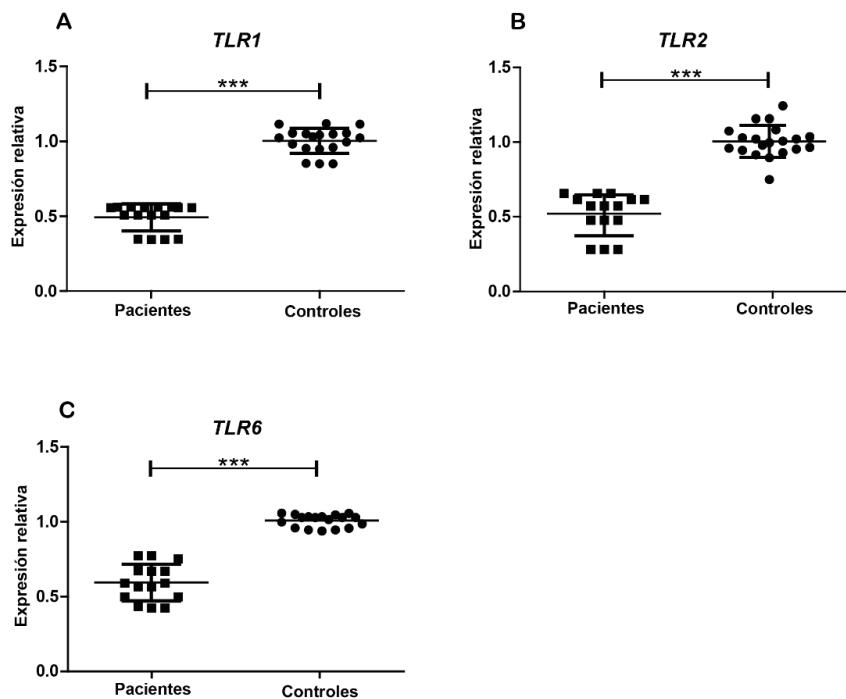


Figura 2. Expresión relativa de los genes *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en pacientes con esquizofrenia y controles. La expresión relativa de los TLRs fue medida en monocitos de sangre periférica mediante qPCR y normalizada con el gen de referencia *ACBT*. A) Expresión de RNAm de *TLR1* en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles. B) Expresión de RNAm de *TLR2* en monocitos de pacientes y controles. C) Expresión de RNAm de *TLR6* en monocitos de pacientes y controles. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM, y se indican las diferencias significativas entre grupos (*** $p < 0.001$).

El análisis de los niveles de expresión génica en pacientes con esquizofrenia reveló diferencias significativas entre los portadores del genotipo TT y GG del polimorfismo rs4833092/*TLR1* ($p \leq 0.0001$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la expresión génica entre los controles al comparar los genotipos TT y CC. Además, los pacientes con el genotipo GG mostraron una disminución en la expresión génica en comparación con los controles portadores tanto del genotipo TT ($p \leq 0.0001$), como del genotipo GG ($p \leq 0.0001$) (Figura 3A).

Se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *TLR2* entre pacientes con esquizofrenia y controles portadores del genotipo AA ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión génica entre pacientes y controles portadores del genotipo GG (Figura 3B), al igual que no se observaron diferencias de los casos portadores del genotipo AA y controles GG, lo cual podría sugerir que la portación del genotipo no está asociada con alteraciones en la expresión génica de *TLR2*.

Por otra parte, se observó una disminución en los niveles de expresión del gen *TLR6* en los pacientes portadores del genotipo CC del polimorfismo rs3775073/*TLR6* en comparación con los controles portadores de los genotipos CC y TT ($p < 0.05$). Además, se encontraron diferencias significativas entre los pacientes portadores del

genotipo CC y los controles portadores del genotipo TT ($p<0.05$). Finalmente, la comparación entre pacientes con esquizofrenia y controles portadores del genotipo TT mostró diferencias significativas en los niveles de expresión génica ($p<0.05$) (Figura 3C).

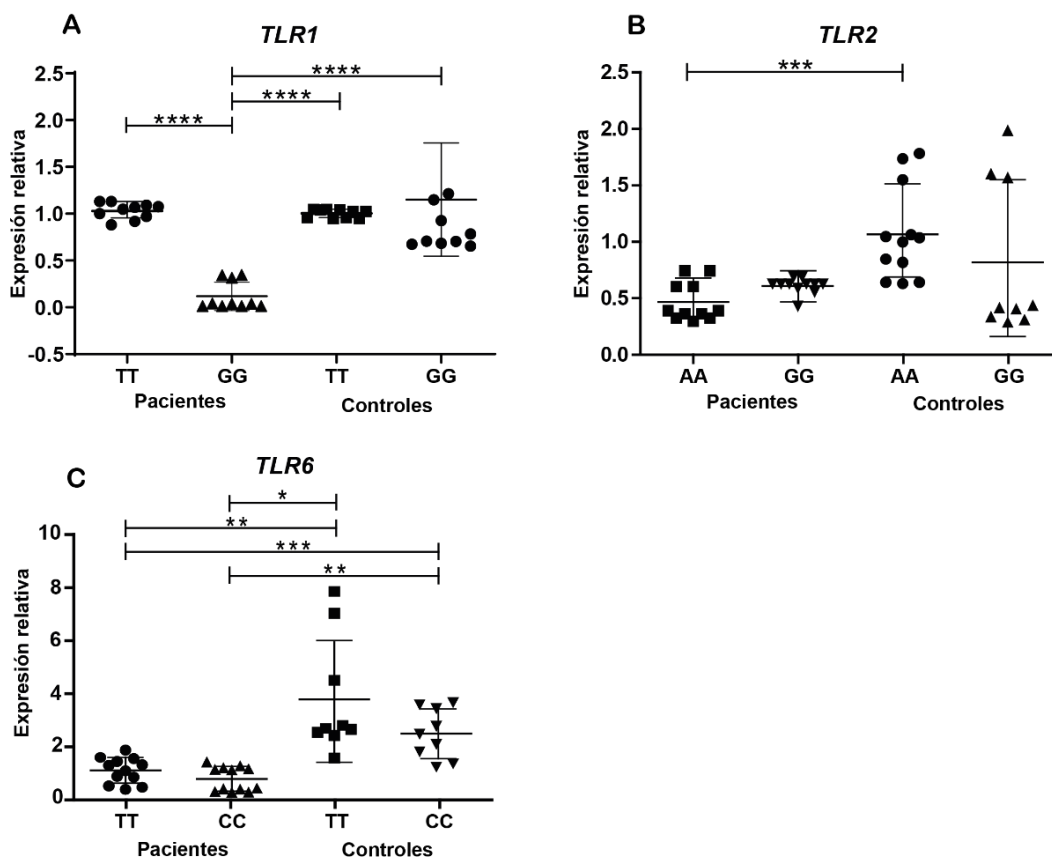


Figura 3. Niveles de expresión de ARNm de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles portadores de los genotipos de interés. La expresión relativa de TLR se midió en monocitos de sangre periférica mediante qPCR y normalizada con el gen de referencia *ACBT*. **A)** Expresión de RNAm de *TLR1* en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles portadores de diferentes genotipos para la variante rs4833093 (*** $p=0.0001$). **B)** Expresión de RNAm de *TLR2* en monocitos de pacientes y controles portadores de diferentes genotipos para la variante rs5743709 (*** $p=0.0006$). **C)** Expresión de RNAm de *TLR6* en monocitos de pacientes y controles portadores de los diferentes genotipos homocigotos para el polimorfismo rs3775073 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

8.4 Análisis de expresión proteica de TLR1, TLR2 y TLR6

Para evaluar los niveles de los receptores TLR1, TLR2 y TLR6 en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles, se realizó un análisis inicial sin considerar la portación del genotipo (Figura 4). El análisis de la expresión proteica mostró una disminución significativa en los niveles de TLR1 en los monocitos de los pacientes con esquizofrenia en comparación con los controles ($p < 0.05$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión proteica de TLR2 y TLR6 entre los grupos de comparación (Figura 4).

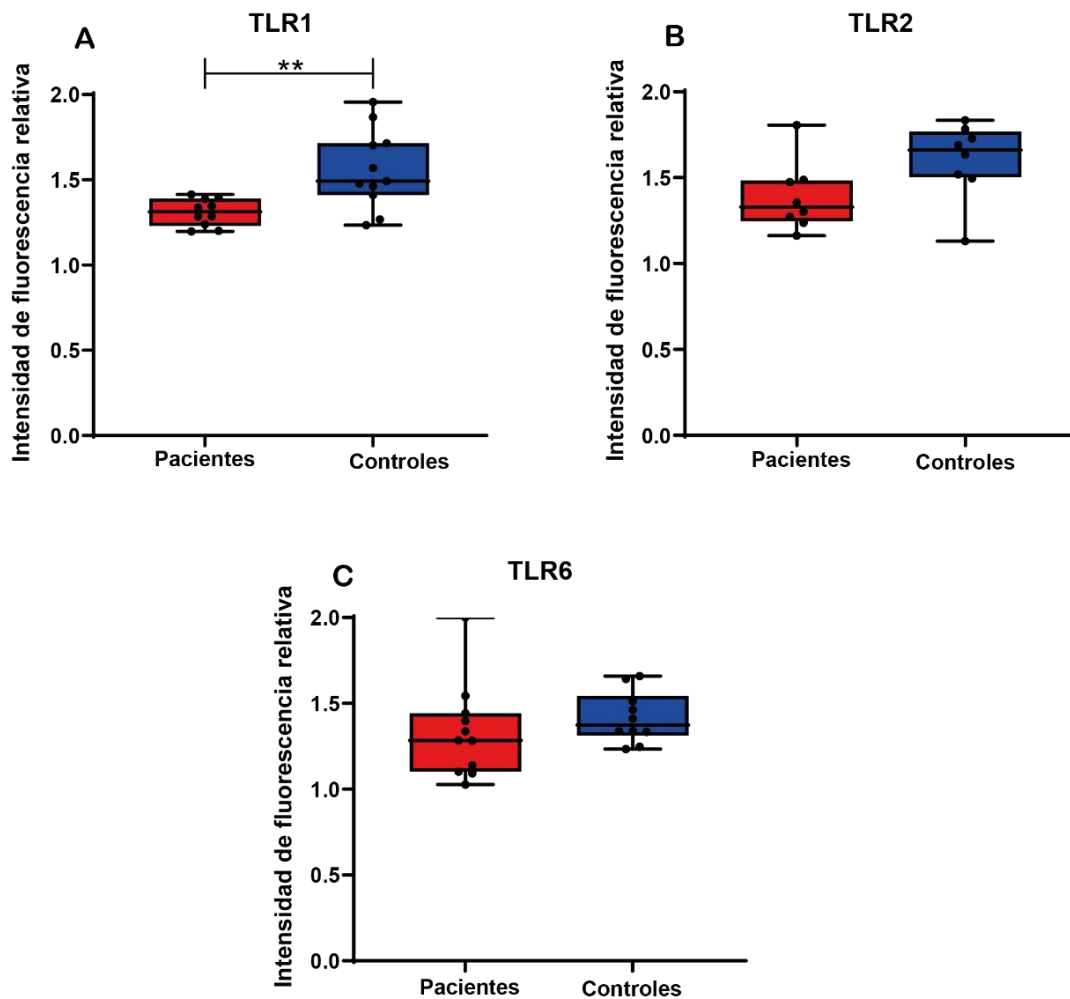


Figura 4. Análisis de la expresión proteica en la que se muestra la intensidad de fluorescencia relativa de TLR1, TLR2 y TLR6 en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles. La expresión relativa de proteína TLR fue medida en monocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo. **A)** Comparación de la expresión de proteína de TLR1 entre pacientes con esquizofrenia y controles. **B)** Comparación de la expresión de proteína de TLR2 entre pacientes con esquizofrenia y controles. **C)** Comparación de la expresión de proteína de TLR6 entre pacientes con esquizofrenia y controles. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM, y se indican las diferencias significativas entre los grupos (** $p < 0.05$).

La Figura 5 ilustra los niveles proteicos de TLR1, TLR2 y TLR6 en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles. Se observó una expresión de proteína significativamente mayor de TLR1 en los controles con el genotipo TT en comparación con los controles con el genotipo GG ($p=0.0021$). En contraste, los pacientes con esquizofrenia portadores del genotipo TT presentaron una disminución en la expresión proteica de TLR1 comparado con los controles con el genotipo TT ($p < 0.0001$) y también, con los controles con el genotipo GG ($p = 0.0007$).

Por otra parte, los niveles de proteína TLR2 fueron significativamente menores en los pacientes con el genotipo GG en comparación con los controles portadores del mismo genotipo ($p<0.014$) (Figura 5B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de proteína TLR2 entre los otros grupos de genotipos. Por último, el análisis de expresión de la proteína TLR6 entre casos y controles para los diferentes genotipos, no reveló diferencias significativas (Figura 5C).

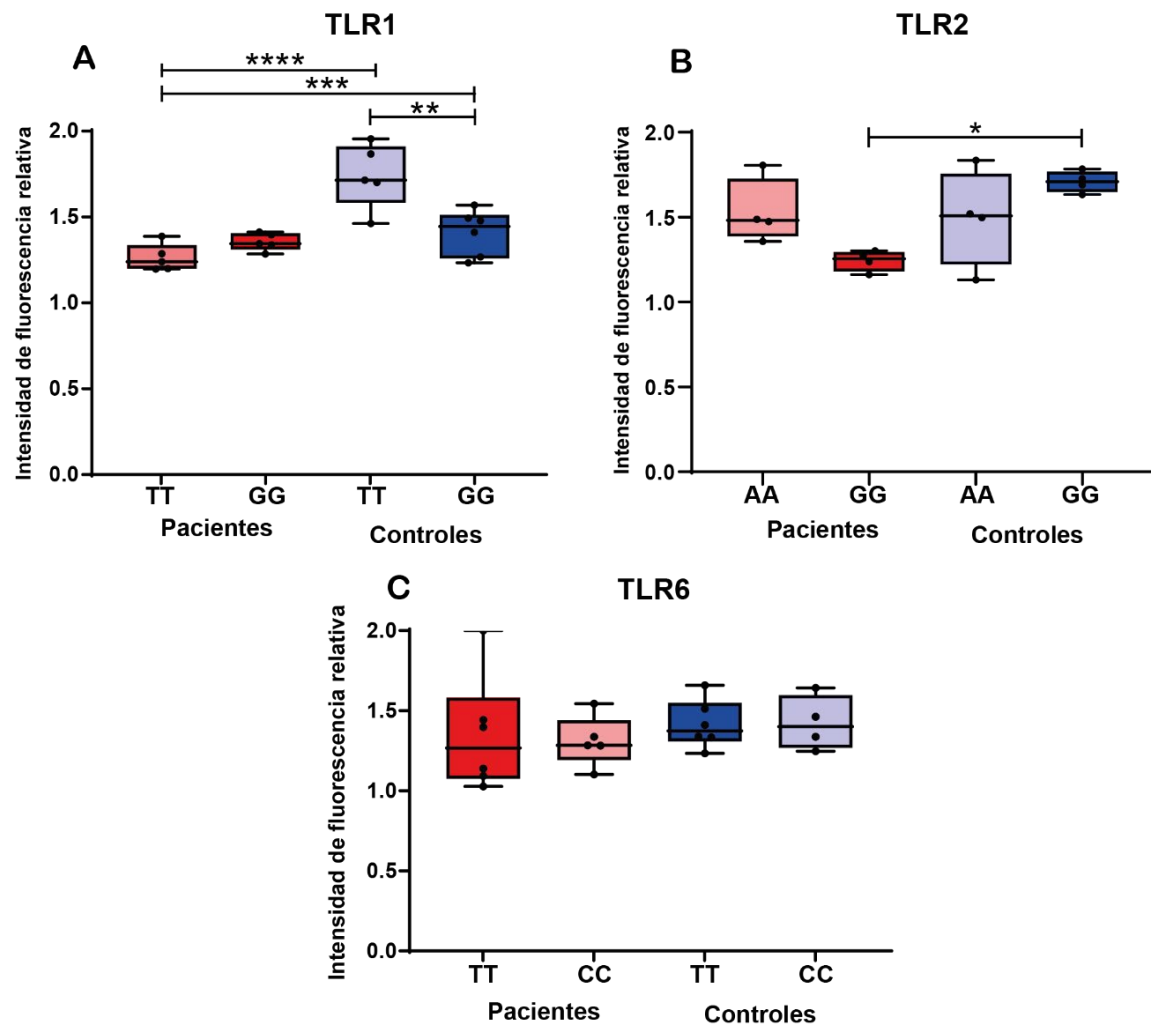


Figura 5. Expresión de proteína de TLR1, TLR2 y TLR6 en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles por portación de los genotipos. La expresión relativa de proteína fue medida en monocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo. **A)** Expresión de proteína TLR1 en monocitos de pacientes y controles portadores de los diferentes genotipos homocigotos para la variante rs4833093 (** $p=0.0021$, *** $p=0.0007$, **** $p<0.0001$). **B)** Expresión de proteína TLR2 en monocitos de pacientes y controles portadores de los genotipos homocigotos para la variante rs5743709 (* $p<0.014$). **C)** Expresión de proteína TLR6 en monocitos de pacientes y controles portadores de los genotipos homocigotos para la variante rs3775073.

8.5 Evaluación funcional de TLR2/TLR6 en monocitos de pacientes con esquizofrenia y controles.

Se utilizó una matriz de proteoma que permite la inmunodetección de 105 analitos para identificar el perfil secretor inducido por ligandos de TLR2/TLR6 en una submuestra que consistió en tres pacientes con esquizofrenia (SZ1, SZ2 y SZ3) y tres controles sanos (HCS1, HCS2 y HCS3) seleccionados de manera aleatoria del total de la muestra de estudio (Figura 6A). De los 105 analitos, solo 40 fueron detectables en los sobrenadantes del cultivo celular de monocitos estimulados con MALP2 (MALP2+) y no estimulados (MALP2-). El análisis de clúster del subgrupo mostró que los monocitos MALP2- de dos controles (HCS1, HCS3) y dos pacientes con SZ (SZ2, SZ3) formaron un clúster caracterizado por una señal inmunorreactiva baja en comparación con sus correspondientes muestras estimuladas con MALP2+ (HCS1.s, HCS3.s, SZ2.s, SZ3.s; muestras marcadas en la figura con un asterisco *), las cuales mostraron un aumento en la señal (Figura 6B). De manera interesante, otro clúster con señales inmunorreactivas bajas fue el grupo conformado por -HCS2, -HCS2.s, -SZ1 y -SZ1.s (Figura 6B).

Adicionalmente, el análisis de clúster de proteínas reveló dos grupos principales (Figura 6B). De manera interesante, se observó que las proteínas cuyos niveles fueron significativamente más altos en pacientes con esquizofrenia (Angiopoyetina 2, Serpina E1, uPAR e IL-18; marcadas con +) se agruparon en el clúster superior, mientras que las proteínas con niveles significativamente más bajos en pacientes en comparación

con controles (Mieloperoxidasa, MIF, IL-17A, IL-24 y MCP-1; marcadas con ~) se agruparon en el clúster inferior (Figura 6B).

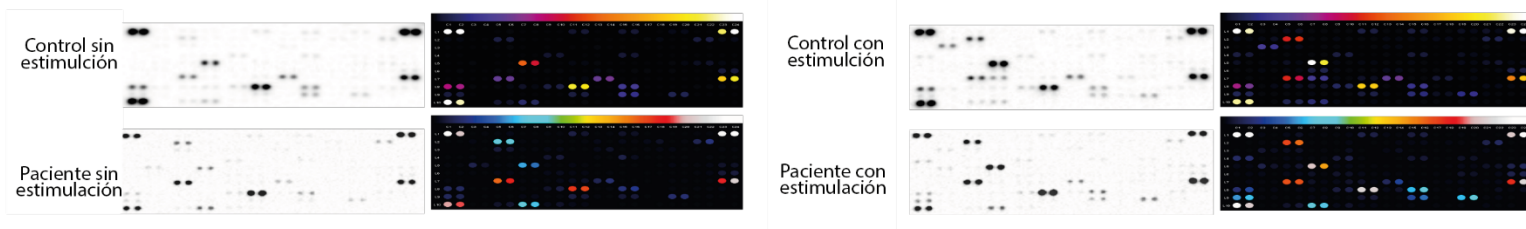
El análisis de PCA (Figura 6C) mostró una agrupación similar a la observada en el análisis de clúster. En el análisis se muestran dos componentes principales que están representados en una gráfica de dos dimensiones, explicando el 69.5% de la variancia total (PC1 45.38% y PC2 24.12%).

En la figura 6D, se muestran las gráficas de barras en donde se ilustra el volumen densitométrico de las nueve proteínas que mostraron diferencias significativas entre los pacientes con esquizofrenia y sujetos control. La señal inmunorreactiva para la Angiopoyetina 2 fue mayor en los sobrenadantes de los monocitos MALP2- de pacientes con esquizofrenia en comparación con controles. Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas en los niveles de angiopoyetina 2 en los sobrenadantes de monocitos de pacientes MALP- y MALP+. Con respecto a Serpin E1 como uPAR, mostraron volúmenes densitométricos significativamente mayores en células MALP2+ de pacientes en comparación con controles.

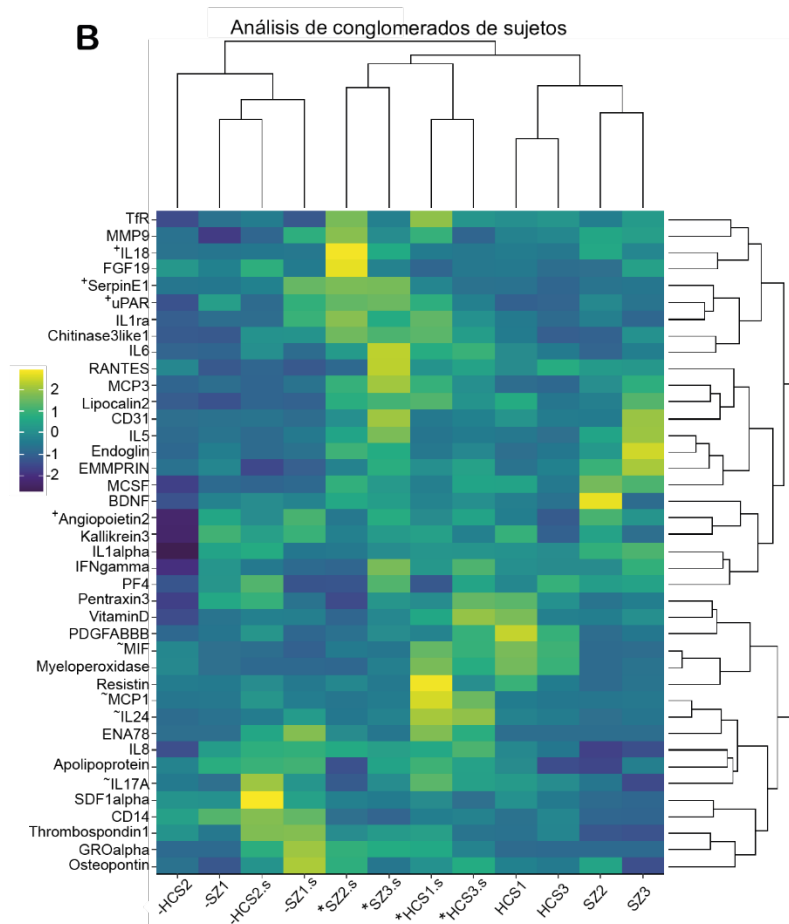
De manera similar, los niveles de IL-18 fueron mayores en monocitos MALP2+ de pacientes con esquizofrenia en relación con controles bajo las mismas condiciones. Por otro lado, la mieloperoxidasa y MIF mostraron una reducción significativa en los sobrenadantes de monocitos derivados de pacientes, independientemente de la estimulación con MALP2. Adicionalmente, los niveles de IL-17A, IL-24 y MCP-1 mostraron un aumento significativo en los sobrenadantes de monocitos de controles

estimulados con MALP2+, pero estas señales se redujeron en los monocitos de pacientes con esquizofrenia bajo las mismas condiciones.

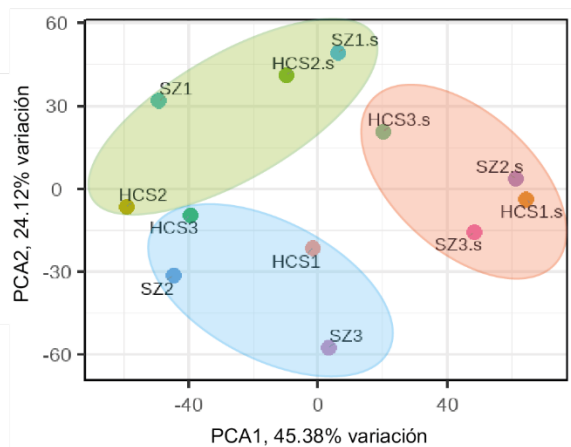
A



B



C



D

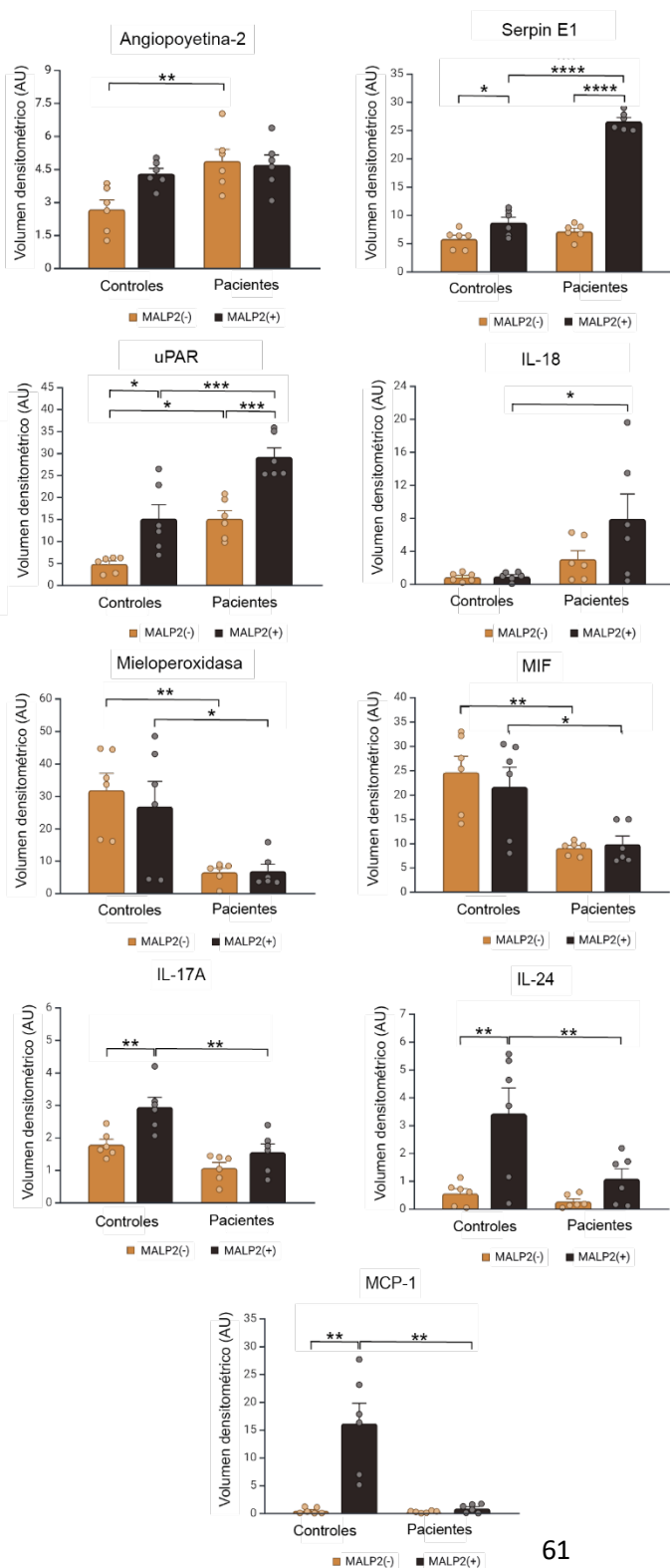


Figura 6. Análisis de los perfiles de secreción inducidos por la estimulación del ligando TLR2/TLR6 en monocitos CD14(+) de pacientes con esquizofrenia y controles sanos. Los monocitos fueron incubados con 25 ng/mL de MALP2 (MALP2+) o sin este ligando (MALP2-) en un medio sin suero durante 24 h, y se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para inmunoensayos proteómicos posteriores. **A)** Imágenes representativas de los puntos inmunorreactivos detectados en los ensayos proteómicos y su representación correspondiente como mapas de calor densitométricos. **B)** Mapa de calor que ilustra los niveles de expresión de cada una de las proteínas en cada sujeto analizado, con los dendogramas que corresponden al análisis de conglomerados de los sujetos y de proteínas. **C)** Análisis de componentes principales (PCA) que indica la distribución de las muestras de sujetos en los dos componentes principales, los cuales explican el 69.5% de la variabilidad total. **D)** Representación gráfica del volumen densitométrico de los puntos inmunorreactivos, mostrando diferencias significativas entre las muestras de pacientes y controles. Los datos representan la media + SEM; las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de dos vías y la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. HCS (control sano), SZ (paciente con esquizofrenia), s (sujeto estimulado), Lipopeptido activador de macrófagos 2 (MALP2).

9. Discusión

Los estudios de asociación genética han proporcionado evidencia de genes relacionados con la inflamación en la esquizofrenia; sin embargo, estudiar el efecto que pueden tener las variantes de riesgo identificadas en la expresión génica, podría aportar información adicional sobre su papel en el desarrollo de la esquizofrenia. La importancia biológica de estos cambios en la fisiopatología de la esquizofrenia no está clara; por lo tanto, el objetivo fue investigar el efecto de tres variantes genéticas previamente asociadas con la esquizofrenia (Sotelo et al., 2023) en los niveles de expresión génica de pacientes mexicanos con esquizofrenia en comparación con un grupo control.

El análisis de las características clínicas y demográficas mostró que el 96% de los pacientes incluidos en el estudio eran solteros. Se ha reportado previamente que las personas con este trastorno, particularmente los hombres, presentan una menor

tasa de matrimonio en comparación con la población general (Thara & Srinivasan, 1997). Además, diversos estudios han señalado que mantener un estado civil estable contribuye significativamente a mejorar la calidad de vida en pacientes con esquizofrenia (Nyer et al., 2010). Por otra parte, se observó que los pacientes con esquizofrenia presentan un nivel educativo básico y una mayor tasa de desempleo, hallazgos que coinciden con lo reportado en estudios previos (Tesli et al., 2022; Cano-Ramirez et al., 2023). Se ha descrito que los individuos con esquizofrenia tienden a alcanzar niveles educativos más bajos debido a la presencia de síntomas asociados al trastorno, entre ellos el deterioro cognitivo, déficit de memoria, problemas de atención y alteraciones en la función ejecutiva, los cuales también pueden influir en su capacidad para acceder y mantener un empleo (McCutcheon et al., 2023). Adicionalmente, se ha documentado que el empleo a largo plazo representa un desafío para muchas personas con esquizofrenia, no solo debido a sus síntomas, sino también a factores externos como la discriminación laboral y la falta de sistemas de apoyo adecuados en el entorno de trabajo (Chong et al., 2009; Marwaha & Johnson, 2004).

Con respecto al análisis genético, nuestros hallazgos mostraron una disminución en la expresión de los genes *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en los pacientes en comparación con los controles. Kozłowska y colaboradores (2018) reportaron alteraciones en los niveles de expresión de los genes *TLR1 al TLR9* en pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, dicho estudio se realizó en población europea y solo evaluaron los cambios en la expresión génica de los TLRs entre pacientes y controles sanos.

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que se enfoca en identificar el efecto de alelos específicos en la expresión génica comparando pacientes con esquizofrenia y controles sanos. De tal manera, nos centramos en evaluar a individuos homocigotos para cada una de las variantes polimórficas. Con respecto al análisis de *TLR1*, se observó una disminución en la expresión del gen en los pacientes con el genotipo GG en comparación con pacientes con el genotipo TT, al igual que los grupos control con los genotipos TT y GG. Estos hallazgos sugieren que portar el genotipo GG puede estar asociado con una disminución de la expresión del gen *TLR1* en pacientes con esquizofrenia.

Se observó una mayor expresión en los niveles de expresión génica de *TLR2* en pacientes con esquizofrenia en comparación con controles que portan el genotipo AA, lo que sugiere una posible asociación entre la expresión elevada de *TLR2* y la patogénesis de la esquizofrenia en individuos con este genotipo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de *TLR2* entre pacientes y controles que portan el genotipo GG. Además, tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los pacientes con genotipo AA y los controles con genotipo GG. Este hallazgo sugiere que la expresión génica de *TLR2* no está influenciada únicamente por la portación del genotipo en la población estudiada. La ausencia de una asociación consistente podría atribuirse a factores adicionales como la influencia del entorno, diferencias epigenéticas, o la regulación postranscripcional que modula la expresión génica independientemente del genotipo.

Con respecto a los resultados de *TLR6*, se observó una disminución significativa en los niveles de expresión génica en pacientes con esquizofrenia que portan el genotipo CC en comparación con los controles portadores de los genotipos CC y TT. Además, se observaron diferencias significativas entre los pacientes portadores del genotipo CC y los controles portadores del genotipo TT, así como entre pacientes y controles portadores del genotipo TT. Estos hallazgos sugieren una asociación entre la portación del genotipo CC y una expresión reducida de *TLR6* en pacientes con esquizofrenia. La observación de diferencias significativas entre pacientes y controles portadores del genotipo TT sugiere que las alteraciones en la expresión de *TLR6* no son exclusivas del genotipo CC, lo que refuerza la hipótesis de que múltiples factores genéticos y posiblemente epigenéticos regulan la expresión de este gen en el contexto de la esquizofrenia.

En conjunto, nuestros hallazgos destacan la importancia de *TLR1* en la respuesta inmunitaria y su potencial implicación en los mecanismos inflamatorios de la esquizofrenia, subrayando la necesidad de investigaciones adicionales para evaluar su papel como posible biomarcador y objetivo terapéutico en esta enfermedad.

Para investigar el posible impacto del polimorfismo rs4833093 en *TLR1*, utilizamos la base de datos JASPAR para analizar los motivos de unión a ADN (Kent et al., 2002). Nuestro análisis reveló que la variante rs4833093/*TLR1* está ubicada dentro de un sitio de unión para distintos factores de transcripción, como lo es la caja homeótica one cut 1 (ONECUT1), que está asociada con el desarrollo del sistema nervioso (van der Raadt et al., 2019) y también con procesos inmunológicos en

enfermedades metabólicas como la diabetes *mellitus* (Prudente et al., 2022). Otro factor de transcripción que se une al mismo sitio de unión es el factor regulador del interferón 1 (IRF1), el cual desempeña un papel importante en la respuesta inmune innata (Song et al., 2021). Un estudio realizado por Chase y colaboradores (2019) reportó niveles de expresión alterados de marcadores inmunológicos como IRF1 y TLR4 en pacientes con esquizofrenia y trauma en la infancia. El último factor de transcripción es la proteína de dedos de zinc 354A (ZNF354A), que facilita la actividad del factor de transcripción que se une al ADN. Estos hallazgos sugieren que el polimorfismo rs4833093/*TLR1* podría modificar la afinidad de unión de estos factores de transcripción, lo que potencialmente podría alterar los niveles de expresión del gen *TLR1*.

Se ha sugerido que la estabilidad del ARNm es afectada por el número de codones óptimos y no óptimos (Presnyak et al., 2015; Forrest et al., 2020). Las variantes de los genes *TLR2* y *TLR6* podrían estar relacionadas con alteraciones en la estabilidad del ARNm, lo que confiere un incremento en el riesgo a desarrollar esquizofrenia.

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que busca dilucidar el papel que desempeñan las variantes polimórficas en la expresión de proteínas en pacientes con esquizofrenia (SZ). Con respecto al análisis de expresión proteica de *TLR1* de la muestra total, se observó una menor cantidad de receptor en pacientes con esquizofrenia, en comparación con controles sanos (Figura 4A). Por otra parte, la expresión proteica de *TLR2* y *TLR6* no mostró diferencias significativas en pacientes

ni en controles. Un estudio realizado por Juncal-Ruiz y colaboradores (2020) analizó la expresión proteica de los receptores TLR1 al TLR9 en monocitos y en células B y T de pacientes con esquizofrenia, en el cual se observó una disminución en la cantidad de receptores TLR1, TLR2, TLR5 y TLR8 en pacientes con esquizofrenia durante su primer episodio psicótico.

En relación con el análisis de portación de genotipos de TLR1, se observó una disminución en la cantidad proteica en pacientes portadores del genotipo TT en comparación con los controles TT y GG, lo cual sugiere que la portación del genotipo TT podría tener un efecto protector contra la esquizofrenia. Por otra parte, el análisis de expresión proteica de TLR2 y TLR6 no mostraron diferencias significativas entre la portación del genotipo. Es importante destacar que no se observó una relación entre los niveles de expresión génica de *TLR1* y la expresión de la proteína, lo que podría indicar la posible participación de modificaciones postranscripcionales y/o postraduccionales que influyen en la regulación de la expresión génica y proteica.

La relación entre la expresión génica y la expresión de proteínas es inherentemente compleja y está sujeta a regulación en múltiples etapas del proceso de expresión génica. La falta de correlación entre los niveles de ARNm y proteínas observada en este estudio puede atribuirse a varios factores regulatorios, incluidos los procesos postranscripcionales, de traducción y modificaciones postraduccionales.

La regulación postranscripcional es un factor clave en la determinación de los niveles de proteína (McManus et al., 2015). Después de la transcripción, diversos mecanismos regulatorios, como los microARNs (miARN) y las proteínas de unión al

ARN, pueden unirse al ARNm y modular su estabilidad o eficiencia de traducción (Jiang y Coller, 2012). Esto puede resultar en una disminución de la producción de proteína, incluso en presencia de altos niveles de ARNm. Además, el empalme alternativo del pre-ARNm puede generar múltiples isoformas con diferentes niveles de estabilidad o funcionalidad, lo que complica aún más la relación entre los niveles de ARNm y proteína (Mockenhaupt y Makeyev, 2015).

La estabilidad y degradación del ARNm también son factores importantes que contribuyen a esta discrepancia. Los ARNm varían en su vida media, algunos se degradan rápidamente mientras que otros persisten más tiempo en la célula, lo que afecta la cantidad total de proteína sintetizada. Además, la eficiencia de la traducción puede verse influenciada por las estructuras secundarias del ARNm, la disponibilidad de ribosomas y otros factores que impactan en el proceso traduccional (Eisen et al., 2020).

Las modificaciones postraduccionales (PTMs) también desempeñan un papel crucial en la regulación de los niveles de proteína. Las proteínas pueden someterse a una variedad de modificaciones después de la traducción, como fosforilación, glucosilación o ubiquitinación, que pueden alterar su estabilidad, actividad o localización dentro de la célula. En el caso de los receptores tipo Toll (TLRs), su tráfico intracelular es un proceso clave que influye en su función. Los TLRs se sintetizan en el retículo endoplásmico y, tras una serie de modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, son transportados a la membrana plasmática o a compartimentos endosomales específicos, donde median la detección de patógenos y la activación de

respuestas inmunes. Estas modificaciones pueden llevar a la degradación de la proteína o a cambios funcionales, reduciendo los niveles detectables de proteína, incluso si los niveles de ARNm permanecen constantes. Las vías de degradación de proteínas, en particular el sistema ubiquitina-proteasoma, también contribuyen a las discrepancias observadas entre los niveles de ARNm y proteína. Las proteínas marcadas para degradación pueden ser eliminadas rápidamente de la célula, lo que reduce los niveles de proteína a pesar de la presencia continua de sus transcritos de ARNm correspondientes (Liu et al., 2023). En conclusión, la falta de correlación entre los niveles de ARNm y proteína observada en este estudio probablemente refleja la influencia de múltiples procesos regulatorios, en particular modificaciones postranscripcionales y postraduccionales. Estos mecanismos resaltan la complejidad de la expresión génica y subrayan que los niveles de proteína no siempre pueden inferirse directamente a partir de los niveles de ARNm.

Con respecto al análisis funcional de los TLRs, se observaron diferencias significativas en los perfiles de secreción de proteínas de las células de los sujetos control en comparación con los pacientes con esquizofrenia, lo cual podría ofrecer nuevas perspectivas sobre los mecanismos subyacentes de la enfermedad y su respuesta a la activación de receptores relacionados con la inmunidad innata. El análisis de agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión proteica permitió observar una clara diferencia entre los perfiles de secreción de los monocitos de pacientes y controles con y sin estimulación con el ligando de TLR2/TLR6 MALP2. En particular, el tratamiento con MALP2 parece provocar un cambio notable en los

patrones de secreción de proteínas en los monocitos de los pacientes con esquizofrenia. Esto sugiere que los pacientes con esquizofrenia responden de manera única a la activación de los receptores TLR, lo cual podría indicar una susceptibilidad inmunológica subyacente.

Por otra parte, el análisis de PCA mostró una separación clara entre los grupos de pacientes y controles, evidenciando una variabilidad en los perfiles de secreción proteica entre los grupos. La mayoría de los individuos que compone al grupo de pacientes se agrupan en distintas áreas del gráfico en comparación con los individuos del grupo de controles, lo que indica que los pacientes con esquizofrenia presentan un perfil de secreción distinto inclusive en condiciones basales (sin estimulación con el ligando MALP2). Además, el tratamiento con MALP2 aumenta aún más la divergencia entre los grupos, lo que sugiere que este tratamiento exacerba las diferencias en la secreción proteica, particularmente en los pacientes con esquizofrenia. La superposición parcial entre pacientes y controles sin tratamiento indica que, aunque existen diferencias de base entre los grupos, el MALP2 intensifica estas diferencias. El análisis individual de proteínas específicas proporciona más detalles sobre las diferencias entre los grupos. En general, el tratamiento con MALP2 aumenta los niveles de varias proteínas pro-inflamatorias, como la angiopoyetina-2, Serpin E1, uPAR e IL-18 en los monocitos de pacientes con esquizofrenia tratados con MALP2, lo cual sugiere una respuesta inmunológica e inflamatoria alterada.

La asociación de estas moléculas con procesos inflamatorios y de remodelación tisular indica que podrían contribuir a una desregulación inmunológica en la esquizofrenia, lo

cual podría influir en la progresión y sintomatología de la enfermedad. La angiopoyetina-2 es un regulador crucial de la angiogénesis y la remodelación vascular (Li et al., 2020). Esta molécula actúa en condiciones normales para estabilizar los vasos sanguíneos, pero su sobreexpresión puede provocar un aumento en la permeabilidad vascular y la inflamación (Li et al., 2020). En el contexto de la esquizofrenia, un incremento de angiopoyetina-2 podría contribuir a una disfunción de la barrera hematoencefálica, lo cual permitiría la entrada de células y mediadores inflamatorios al cerebro (Gurnik et al., 2016). Esta alteración en la barrera hematoencefálica podría exacerbar el estrés oxidativo y la neuroinflamación, procesos que han sido implicados en la patogénesis de la esquizofrenia (Bošković et al., 2011; Bitanhirwe & Woo, 2011; Vallée, 2022; Chaves et al., 2024)

Serpin E1 es un inhibidor de la plasmina activador de tipo 1 y desempeña un papel importante en la regulación de la fibrinólisis y la remodelación de la matriz extracelular. Su elevación en la esquizofrenia podría indicar un aumento en la actividad de remodelación tisular y una respuesta fibrinolítica alterada (Hoirisch-Clapauch et al., 2016). Además, la sobreexpresión de Serpin E1 se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas y se ha sugerido que puede promover un estado inflamatorio crónico (Kutz et al., 2012; Jeffries et al., 2018). En relación con la esquizofrenia, niveles elevados de Serpin E1 podrían contribuir a una inflamación sostenida y al daño de las estructuras neuronales, lo cual puede exacerbar el déficit cognitivo y el deterioro funcional en estos pacientes.

Con respecto a uPAR, es un receptor que regula la degradación de la matriz extracelular y participa en la señalización celular, facilitando procesos de migración celular y respuesta inflamatoria. Un aumento de uPAR en pacientes con esquizofrenia podría estar relacionado con una mayor activación de células inmunitarias, lo que a su vez puede llevar a una inflamación crónica (Hoirisch-Clapauch et al., 2016). Este receptor también está implicado en distintos procesos, como la adhesión celular y la plasticidad sináptica, factores críticos en el desarrollo y mantenimiento de las conexiones neuronales (Bigseth et al., 2021). La desregulación de uPAR podría, por lo tanto, contribuir a las anomalías estructurales observadas en el cerebro de pacientes con esquizofrenia, impactando negativamente en la función sináptica y en la conectividad neuronal (Karlsgodt et al., 2014; Staal et al., 2000).

IL-18 es una citocina pro-inflamatoria que participa en la respuesta inmune innata y adaptativa. Se sabe que está involucrada en la activación de células NK y T-cooperadoras, así como en la producción de otras citocinas proinflamatorias (Ihim et al., 2022). Niveles elevados de IL-18 en pacientes con esquizofrenia sugieren una activación constante de la respuesta inmune, lo que podría favorecer un ambiente proinflamatorio en el sistema nervioso central (Szabo et al., 2022). Esta citocina ha sido asociada con el estrés oxidativo y el daño celular, los cuales son factores que pueden contribuir al deterioro neuronal y a la disfunción sináptica. Además, la IL-18 está vinculada con trastornos del estado de ánimo y la disfunción cognitiva, los cuales son síntomas comunes en la esquizofrenia (Guan et al., 2023).

En conjunto, los niveles elevados de angiopoyetina-2, Serpin E1, uPAR e IL-18 secretados por los monocitos de los pacientes con esquizofrenia podrían favorecer la inflamación crónica, la disfunción de la barrera hematoencefálica y el daño neuronal, contribuyendo a la neuroinflamación y al deterioro cognitivo característico de este padecimiento.

Por otra parte, se observó una disminución en la secreción de mieloperoxidasa (MPO), MIF, IL-17A, IL-24 y MCP-1 en los monocitos de los pacientes con esquizofrenia en comparación con los monocitos de los sujetos control. La mieloperoxidasa es una enzima producida por neutrófilos y macrófagos que contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual es fundamental en la defensa contra patógenos, pero también puede dañar los tejidos si se producen en exceso (Frangie y Daher, 2022). Una reducción en los niveles de MPO en pacientes con esquizofrenia podría indicar una disminución en la capacidad de respuesta inflamatoria, lo que podría tener efectos contraproducentes en términos de la respuesta inmune innata. Además, dado que el estrés oxidativo es un factor importante en la patología de la esquizofrenia, una menor actividad de MPO podría estar relacionada con una alteración en el equilibrio redox cerebral, afectando el metabolismo neuronal y la función sináptica (Mosyagin et al., 2004).

La proteína MIF es una citocina con propiedades tanto proinflamatorias como reguladoras de la respuesta inmunitaria. Actúa estimulando la liberación de otras citocinas proinflamatorias y promoviendo la supervivencia de los macrófagos (Bloom et al., 2016). En el contexto de la esquizofrenia, una disminución en los niveles de MIF

podría reflejar una disfunción en la activación de macrófagos y una menor capacidad para iniciar respuestas inflamatorias óptimas. MIF podría desempeñar un papel clave en las funciones homeostáticas de la microglía. Se ha propuesto que la microglía utiliza mecanismos mediados por citoquinas para regular procesos como la poda neurítica y la eliminación de debris celulares o de mielina no funcional. Dado que MIF puede influir en la activación microglial, una disminución en sus niveles podría alterar estas funciones esenciales. Un ambiente con niveles reducidos de MIF podría comprometer la capacidad de la microglía para eliminar sinapsis innecesarias durante el desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica, lo que podría afectar la conectividad neuronal y contribuir a la disfunción sináptica observada en la esquizofrenia. Además, la alteración de la fagocitosis microglial podría llevar a una acumulación anómala de debris celulares y mielina deteriorada, afectando la homeostasis del microambiente cerebral. Estos efectos podrían integrarse dentro de las hipótesis neuroinflamatorias de la esquizofrenia, donde una disfunción en la microglía podría desempeñar un papel en la etiología y progresión de la enfermedad (Okazaki et al., 2018).

IL-17A es una citocina producida por células T-cooperadoras-17 (Th17) y es fundamental en la defensa contra infecciones bacterianas y fúngicas, además de ser un mediador clave en la inflamación autoinmune (McGeachy et al., 2019). La reducción de IL-17A en pacientes con esquizofrenia podría indicar una menor activación de las células Th17, sugiriendo una posible inmunosupresión o una desregulación en las respuestas inflamatorias específicas (Chenniappan et al., 2020). La disminución de IL-17A también podría impactar la barrera hematoencefálica, ya que esta citocina

contribuye a la migración de células inmunes al cerebro (Huppert et al., 2010). Esto podría limitar la capacidad del sistema inmunológico de responder a los desafíos patógenos en el cerebro, afectando la homeostasis cerebral y facilitando disfunciones neuroinflamatorias.

IL-24 es una citocina que participa en la regulación de la apoptosis y la respuesta inflamatoria. Está implicada en procesos de reparación y remodelación tisular, y se sabe que tiene propiedades inmunomoduladoras (Wang & Liang, 2005). Una menor expresión de IL-24 en pacientes con esquizofrenia podría indicar una reducción en la capacidad del cerebro para reparar daños y responder adecuadamente a la inflamación. Esta disminución podría estar relacionada con la neurodegeneración observada en la esquizofrenia, ya que la IL-24 contribuye a la protección neuronal y la regeneración (Stone et al., 2022). La deficiencia de IL-24 podría, entonces, exacerbar los efectos de otras vías proinflamatorias, facilitando el daño neuronal y alterando las funciones sinápticas.

MCP-1 es una quimiocina crucial para el reclutamiento de monocitos y otras células inmunes al sitio de inflamación. Su disminución en pacientes con esquizofrenia sugiere un menor reclutamiento de células inmunes al cerebro, lo cual podría afectar la capacidad del sistema nervioso central para responder a procesos patológicos (Deshmane et al., 2009). Una menor actividad de MCP-1 podría indicar una respuesta inmune deficiente, lo cual puede reducir la capacidad del cerebro para eliminar células dañadas y responder a inflamaciones crónicas (Saound et al., 2019). Además, MCP-1 se ha asociado con la regulación de la neurogénesis y la plasticidad sináptica; su

reducción podría impactar negativamente en la formación de nuevas conexiones neuronales y en el mantenimiento de la red neuronal (Widera et al., 2004; Deshmane et al., 2009).

En la esquizofrenia, los problemas de plasticidad sináptica incluyen alteraciones en la poda sináptica, la formación y estabilización de sinapsis, y la regulación del equilibrio excitatorio-inhibitorio en el cerebro (Deshmane et al., 2009; Stone et al., 2022). Se ha observado que los pacientes con esquizofrenia presentan una poda sináptica exacerbada, especialmente en la adolescencia, lo que puede contribuir a la reducción del volumen cortical y a déficits en la conectividad neuronal funcional (Boksa, 2012). Además, la disminución de factores inflamatorios como MIF, IL-17A, IL-24 y MCP-1 podría afectar la modulación de la actividad microglial, reduciendo su capacidad para eliminar sinapsis defectuosas o fortalecer conexiones funcionales (Okazaki et al., 2018). También se ha sugerido que la disfunción en la plasticidad sináptica podría estar relacionada con una menor eficiencia en la transmisión glutamatérgica y una alteración en la actividad del GABA, lo que afectaría procesos cognitivos y la regulación del estado de ánimo en los pacientes con esquizofrenia (Hilmas et al. 2011).

En conjunto, los resultados sugieren que el MALP2 influye en la secreción proteica de manera mucho más marcada en pacientes con esquizofrenia que en controles sanos. Esto podría indicar que la activación de los receptores TLR contribuye a la fisiopatología de la esquizofrenia, posiblemente exacerbando un estado inflamatorio alterado. La modulación de estos receptores podría representar una vía terapéutica

potencial en el tratamiento de la esquizofrenia, y estos hallazgos resaltan la importancia de estudiar más a fondo el papel de los TLR en esta enfermedad.

Finalmente, las proteínas que mostraron diferencias en este estudio no han sido identificadas en los GWAS reportados hasta la fecha. De tal manera, resulta importante profundizar en su posible papel en la fisiopatología de la esquizofrenia. Estos hallazgos podrían contribuir al entendimiento de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores potenciales en el contexto de los trastornos psicóticos.

10. Conclusión

Este estudio ofrece nuevos conocimientos sobre el papel que desempeñan las variantes genéticas estudiadas de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en la regulación de la expresión génica y de proteínas en pacientes mexicanos con esquizofrenia. Nuestros hallazgos demuestran una reducción significativa en la expresión génica de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* en pacientes con esquizofrenia en comparación con los controles sanos, lo que sugiere que los TLR desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la esquizofrenia. Específicamente, el polimorfismo rs4833093 en *TLR1* podría alterar la unión de factores de transcripción, afectando potencialmente la expresión génica y contribuyendo a la desregulación inmunológica observada en pacientes con esquizofrenia. A nivel proteico, la expresión de TLR1 se redujo en pacientes con esquizofrenia, especialmente entre aquellos que portaban el genotipo TT; sin embargo, esta reducción en los niveles de proteína no se correlacionó directamente con la

expresión de ARNm, lo que resalta los complejos mecanismos regulatorios involucrados, incluyendo modificaciones postranscripcionales y postraduccionales.

Por otro lado, la expresión proteica de TLR2 y TLR6 no mostró diferencias significativas entre pacientes y controles, subrayando la necesidad de investigaciones adicionales sobre la influencia de estos genes en la patogénesis de la esquizofrenia. Además, el análisis de los perfiles de proteínas inflamatorias reveló respuestas inmunológicas alteradas en los pacientes con esquizofrenia, lo que apoya la hipótesis de la disfunción inmunitaria en este trastorno. El tratamiento con MALP2 exacerbó estas diferencias, sugiriendo que la activación de los TLR podría contribuir a alteraciones inmunológico en la esquizofrenia.

En conclusión, nuestros hallazgos evidencian que las variantes genéticas analizadas influyen en la regulación de la expresión génica y proteica de TLR1, TLR2 y TLR6. En este estudio, analizamos una sola variante por cada uno de estos genes, lo cual limita la comprensión completa de su papel en la desregulación inmunitaria asociada con la esquizofrenia. Es crucial que futuros estudios amplíen este enfoque, evaluando múltiples variantes dentro de cada gen, ya que esto permitirá una visión más precisa de su efecto en la fisiopatología de la esquizofrenia. Estos resultados sugieren que las variantes de *TLR1*, *TLR2* y *TLR6* podrían tener un papel clave en la respuesta inflamatoria en la esquizofrenia, lo que abre la posibilidad de futuras intervenciones terapéuticas dirigidas a modular esta desregulación. Sin embargo, son necesarios más estudios para explorar los mecanismos precisos a través de los cuales estos TLR contribuyen a la etiología de la esquizofrenia.

11. Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2022). *Inmunología celular y molecular* (10.^a ed.). Elsevier.
- Ayari, F., Chaaben, A. B., Abaza, H., Mihoub, O., Ouni, N., Boukouaci, W., Kharrat, M., Leboyer, M., Guemira, F., Tamouza, R., & Mankai, A. (2024). Association between genetic variants of TLR2, TLR4, TLR9 and schizophrenia. *L'Encephale*, 50(2), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2023.05.004>
- Barak, B., Feldman, N., & Okun, E. (2014). Toll-like receptors as developmental tools that regulate neurogenesis during development: an update. *Frontiers in neuroscience*, 8, 272. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00272>
- Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in immunology*, 24(10), 528–533. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00242-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00242-4)
- Benros, M. E., Eaton, W. W., & Mortensen, P. B. (2014). The epidemiologic evidence linking autoimmune diseases and psychosis. *Biological psychiatry*, 75(4), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.023>
- Benros, M. E., Nielsen, P. R., Nordentoft, M., Eaton, W. W., Dalton, S. O., & Mortensen, P. B. (2011). Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for schizophrenia: a 30 year population-based register study. *The American journal of psychiatry*, 168(12), 1303–1310. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2011.11030516>
- Benros, M. E., Pedersen, M. G., Rasmussen, H., Eaton, W. W., Nordentoft, M., & Mortensen, P. B. (2014). A nationwide study on the risk of autoimmune diseases in individuals with a personal or a family history of schizophrenia and related psychosis. *The American journal of psychiatry*, 171(2), 218–226. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.13010086>
- Bigseth, T. T., Engh, J. A., Egeland, J., Andersen, E., Andreassen, O. A., Bang-Kittilsen, G., Falk, R. S., Holmen, T. L., Lindberg, M., Mordal, J., Nielsen, J., Steen, N. E., Ueland, T., Vang, T., & Fredriksen, M. (2021). Exploring low grade inflammation by soluble urokinase plasminogen activator receptor levels in schizophrenia: a sex-dependent association with depressive symptoms. *BMC psychiatry*, 21(1), 527. <https://doi.org/10.1186/s12888-021-03522-6>
- Bioque, M., Llorca-Bofi, V., Salmerón, S., García-Bueno, B., MacDowell, K. S., Moreno, C., Sáiz, P. A., González-Pinto, A., Hidalgo-Figueroa, M., Barcones, M. F., Rodríguez-Jimenez, R., Bernardo, M., Leza, J. C., & FLAMMPEPS STUDY - Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (2024). Association between neutrophil to lymphocyte ratio and inflammatory biomarkers in patients with a first episode of psychosis. *Journal of psychiatric research*, 172, 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2024.02.044>
- Bitanhirwe, B. K., & Woo, T. U. (2011). Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(3), 878–893. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.008>
- Bošković, M., Vovk, T., Kores Plesničar, B., & Grabnar, I. (2011). Oxidative stress in schizophrenia. *Current neuropharmacology*, 9(2), 301–312. <https://doi.org/10.2174/157015911795596595>

- Brisch, R., Saniotis, A., Wolf, R., Bielau, H., Bernstein, H. G., Steiner, J., Bogerts, B., Braun, K., Jankowski, Z., Kumaratilake, J., Henneberg, M., & Gos, T. (2014). The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Frontiers in psychiatry*, 5, 47. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2014.00047>
- 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>
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology*, 33, 257–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Bulzacka, E., Boyer, L., Schürhoff, F., Godin, O., Berna, F., Brunel, L., Andrianarisoa, M., Aouizerate, B., Capdevielle, D., Chéreau-Boudet, I., Chesnoy-Servanin, G., Danion, J. M., Dubertret, C., Dubreucq, J., Faget, C., Gabayet, F., Le Gloahec, T., Llorca, P. M., Mallet, J., Misdrahi, D., ... FACE-SZ (FondaMental Academic Centers of Expertise for Schizophrenia) Group (2016). Chronic Peripheral Inflammation is Associated With Cognitive Impairment in Schizophrenia: Results From the Multicentric FACE-SZ Dataset. *Schizophrenia bulletin*, 42(5), 1290–1302. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw029>
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 183–192. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002>
- Cabrera, B., Bioque, M., Penadés, R., González-Pinto, A., Parellada, M., Bobes, J., Lobo, A., García Bueno, B., Leza, J. C., & Bernardo, M. (2016). Cognition and psychopathology in first-episode psychosis: are they related to inflammation?. *Psychological medicine*, 46(10), 2133–2144. <https://doi.org/10.1017/S0033291716000659>
- Camargo A. (2022). PCAtest: testing the statistical significance of Principal Component Analysis in R. *PeerJ*, 10, e12967. <https://doi.org/10.7717/peerj.12967>
- Cano-Ramirez, H., Diaz-Castro, L., & Hoffman, K. L. (2023). Analysis of Educational Attainment in a Mexican Psychiatric Patient Population with Bipolar or Psychotic Disorders. *Brain sciences*, 13(6), 881. <https://doi.org/10.3390/brainsci13060881>
- Capuron, L., Pagnoni, G., Drake, D. F., Woolwine, B. J., Spivey, J. R., Crowe, R. J., Votaw, J. R., Goodman, M. M., & Miller, A. H. (2012). Dopaminergic mechanisms of reduced basal ganglia responses to hedonic reward during interferon alfa administration. *Archives of general psychiatry*, 69(10), 1044–1053. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.2094>
- Carter C. S. (2006). Re-conceptualizing schizophrenia as a disorder of cognitive and emotional processing: a shot in the arm for translational research. *Biological psychiatry*, 60(11), 1169–1170. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.10.024>
- Caso, J. R., Balanzá-Martínez, V., Palomo, T., & García-Bueno, B. (2016). The Microbiota and Gut-Brain Axis: Contributions to the Immunopathogenesis of Schizophrenia. *Current pharmaceutical design*, 22(40), 6122–6133. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160906160911>
- Chase, K. A., Melbourne, J. K., Rosen, C., McCarthy-Jones, S., Jones, N., Feiner, B. M., & Sharma, R. P. (2019). Traumagenics: At the intersect of childhood trauma, immunity and psychosis. *Psychiatry research*, 273, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.12.097>

- Chaves, C., Dursun, S. M., Tusconi, M., & Hallak, J. E. C. (2024). Neuroinflammation and schizophrenia - is there a link?. *Frontiers in psychiatry*, 15, 1356975. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2024.1356975>
- Chen, C. Y., Shih, Y. C., Hung, Y. F., & Hsueh, Y. P. (2019). Beyond defense: regulation of neuronal morphogenesis and brain functions via Toll-like receptors. *Journal of biomedical science*, 26(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0584-z>
- Chen, S. J., Chao, Y. L., Chen, C. Y., Chang, C. M., Wu, E. C., Wu, C. S., Yeh, H. H., Chen, C. H., & Tsai, H. J. (2012). Prevalence of autoimmune diseases in in-patients with schizophrenia: nationwide population-based study. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 200(5), 374–380. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.111.092098>
- Chenniappan, R., Nandeesh, H., Kattimani, S., & Nanjaiah, N. D. (2020). Interleukin-17 and Interleukin-10 Association with Disease Progression in Schizophrenia. *Annals of neurosciences*, 27(1), 24–28. <https://doi.org/10.1177/0972753120929565>
- Chong, S. A., Subramaniam, M., Lee, I. M., Pek, E., Cheok, C., Verma, S., & Wong, J. (2009). Academic attainment: a predictor of psychiatric disorders?. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*, 44(11), 999–1004. <https://doi.org/10.1007/s00127-009-0027-3>
- Corvin, A., & Morris, D. W. (2014). Genome-wide association studies: findings at the major histocompatibility complex locus in psychosis. *Biological psychiatry*, 75(4), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.018>
- 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>
- Dalman, C., Allebeck, P., Cullberg, J., Grunewald, C., & Köster, M. (1999). Obstetric complications and the risk of schizophrenia: a longitudinal study of a national birth cohort. *Archives of general psychiatry*, 56(3), 234–240. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.56.3.234>
- Degtyareva, A. O., Antontseva, E. V., & Merkulova, T. I. (2021). Regulatory SNPs: Altered Transcription Factor Binding Sites Implicated in Complex Traits and Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6454. <https://doi.org/10.3390/ijms22126454>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Douglas-Escobar, M., Elliott, E., & Neu, J. (2013). Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain. *JAMA pediatrics*, 167(4), 374–379. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.497>
- Eisen, T. J., Eichhorn, S. W., Subtelny, A. O., Lin, K. S., McGeary, S. E., Gupta, S., & Bartel, D. P. (2020). The Dynamics of Cytoplasmic mRNA Metabolism. *Molecular cell*, 77(4), 786–799.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.005>

- Fatemi, S. H., Clayton, P. J., & Sartorius, N. (2008). *The medical basis of psychiatry: Third edition*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-252-6>
- Felger, J. C., Mun, J., Kimmel, H. L., Nye, J. A., Drake, D. F., Hernandez, C. R., Freeman, A. A., Rye, D. B., Goodman, M. M., Howell, L. L., & Miller, A. H. (2013). Chronic interferon- α decreases dopamine 2 receptor binding and striatal dopamine release in association with anhedonia-like behavior in nonhuman primates. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(11), 2179–2187. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.115>
- Forrest, M. E., Pinkard, O., Martin, S., Sweet, T. J., Hanson, G., & Collier, J. (2020). Codon and amino acid content are associated with mRNA stability in mammalian cells. *PloS one*, 15(2), e0228730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228730>
- Frangie, C., & Daher, J. (2022). Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). *Biomedical reports*, 16(6), 53. <https://doi.org/10.3892/br.2022.1536>
- Frankle, W. G., Lerma, J., & Laruelle, M. (2003). The synaptic hypothesis of schizophrenia. *Neuron*, 39(2), 205–216. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00423-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00423-9)
- Fuss, I. J., Kanof, M. E., Smith, P. D., & Zola, H. (2009). Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Current protocols in immunology*, Chapter 7, 7.1.1–7.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85>
- García Bueno, B., Caso, J. R., Madrigal, J. L., & Leza, J. C. (2016). Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 64, 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.02.013>
- García-Bueno, B., Bioque, M., Mac-Dowell, K. S., Barcones, M. F., Martínez-Cengotitabengoa, M., Pina Camacho, L., Rodríguez-Jiménez, R., Sáiz, P. A., Castro, C., Lafuente, A., Santabárbara, J., González-Pinto, A., Parellada, M., Rubio, G., García-Portilla, M. P., Micó, J. A., Bernardo, M., & Leza, J. C. (2014). Pro-/anti-inflammatory dysregulation in patients with first episode of psychosis: toward an integrative inflammatory hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 40(2), 376–387. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbt001>
- García-Bueno, B., Bioque, M., MacDowell, K. S., Santabárbara, J., Martínez-Cengotitabengoa, M., Moreno, C., Sáiz, P. A., Berrocoso, E., Gassó, P., Fe Barcones, M., González-Pinto, A., Parellada, M., Bobes, J., Micó, J. A., Bernardo, M., Leza, J. C., & FLAMM-PEPs study, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain (2014). Pro /antiinflammatory dysregulation in early psychosis: results from a 1-year follow-up study. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 18(2), pyu037. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu037>
- Gobierno de México. (2023). En México, más de un millón de personas padece esquizofrenia. Secretaría de Salud. <https://www.gob.mx/salud/articulos/en-mexico-mas-de-un-millon-de-personas-padece-esquizofrenia>
- Goldsmith, D. R., Rapaport, M. H., & Miller, B. J. (2016). A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular psychiatry*, 21(12), 1696–1709. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.3>
- GraphPad Prism (Version 5). La Jolla, CA: GraphPad Software, Inc. Available from: <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>. Accessed August 15, 2022.

- Guan, X., Leng, W., Hu, Q., Xiu, M., & Zhang, X. (2023). Association between cognitive function and IL-18 levels in schizophrenia: Dependent on IL18 - 607 A/C polymorphism. *Psychoneuroendocrinology*, 158, 106386. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2023.106386>
- Gurnik, S., Devraj, K., Macas, J., Yamaji, M., Starke, J., Scholz, A., Sommer, K., Di Tacchio, M., Vutukuri, R., Beck, H., Mittelbronn, M., Foerch, C., Pfeilschifter, W., Liebner, S., Peters, K. G., Plate, K. H., & Reiss, Y. (2016). Angiopoietin-2-induced blood-brain barrier compromise and increased stroke size are rescued by VE-PTP-dependent restoration of Tie2 signaling. *Acta neuropathologica*, 131(5), 753–773. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1551-3>
- Hanke, M. L., & Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical science (London, England : 1979)*, 121(9), 367–387. <https://doi.org/10.1042/CS20110164>
- Hilmas, C., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7463–7473. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07463.2001>
- HO. Mental health systems in selected low- and middle-income countries: a WHO-AIMS cross-national analysis. WHO: Geneva, 2009
- Hoirisch-Clapauch, S., Nardi, A. E., Gris, J. C., & Brenner, B. (2014). Coagulation and mental disorders. *Rambam Maimonides medical journal*, 5(4), e0036. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10170>
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R., Kulig P., Pietrowski E., Bechmann I., Becher B., Luhmann H., Waisman A., Kuhlmann C. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal*. 24(4):1023-1034. doi:10.1096/fj.09-141978
- Ihim, S. A., Abubakar, S. D., Zian, Z., Sasaki, T., Saffarioun, M., Maleknia, S., & Azizi, G. (2022). Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. *Frontiers in immunology*, 13, 919973. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.919973>
- Inyang, B., Gondal, F. J., Abah, G. A., Minnal Dhandapani, M., Manne, M., Khanna, M., Challa, S., Kabeil, A. S., & Mohammed, L. (2022). The Role of Childhood Trauma in Psychosis and Schizophrenia: A Systematic Review. *Cureus*, 14(1), e21466. <https://doi.org/10.7759/cureus.21466>
- Jauhar, S., Johnstone, M., & McKenna, P. J. (2022). Schizophrenia. *Lancet (London, England)*, 399(10323), 473–486. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01730-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01730-X)
- Jeffries, C.D., Perkins, D.O., Fournier, M. *et al*. Networks of blood proteins in the neuroimmunology of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 8, 112 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0158-y>
- Jiang, P., & Collier, H. (2012). Functional interactions between microRNAs and RNA binding proteins. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 1(1), 70–79. <https://doi.org/10.2174/2211536611201010070>
- Jiménez-Trejo, F., Jiménez-García, K. L., & Canul-Medina, G. (2024). Serotonin and schizophrenia: what influences what?. *Frontiers in psychiatry*, 15, 1451248. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2024.1451248>
- Johnson, A. D., Zhang, Y., Papp, A. C., Pinsonneault, J. K., Lim, J. E., Saffen, D., Dai, Z., Wang, D., & Sadée, W. (2008). Polymorphisms affecting gene transcription and mRNA processing in

- pharmacogenetic candidate genes: detection through allelic expression imbalance in human target tissues. *Pharmacogenetics and genomics*, 18(9), 781–791.
<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283050107>
- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 374(2065), 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Jones P. B. (2013). Adult mental health disorders and their age at onset. *The British journal of psychiatry. Supplement*, 54, s5–s10. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.112.119164>
- Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., O'Donovan, M., Correll, C. U., Kane, J. M., van Os, J., & Insel, T. R. (2015). Schizophrenia. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15067. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.67>
- Kang, W. S., Park, J. K., Lee, S. M., Kim, S. K., Park, H. J., & Kim, J. W. (2013). Association between genetic polymorphisms of Toll-like receptor 2 (TLR2) and schizophrenia in the Korean population. *Gene*, 526(2), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.058>
- Karlsgodt, K. H., Sun, D., & Cannon, T. D. (2010). Structural and Functional Brain Abnormalities in Schizophrenia. *Current directions in psychological science*, 19(4), 226–231.
<https://doi.org/10.1177/0963721410377601>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome research*, 12(6), 996–1006.
<https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- Kirkbride, J. B., Errazuriz, A., Croudace, T. J., Morgan, C., Jackson, D., Boydell, J., Murray, R. M., & Jones, P. B. (2012). Incidence of schizophrenia and other psychoses in England, 1950–2009: a systematic review and meta-analyses. *PloS one*, 7(3), e31660.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031660>
- Koblansky, A. A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M. S., Akira, S., Sher, A., & Ghosh, S. (2013). Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, 38(1), 119–130.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.016>
- Kossatz, E., Diez-Alarcia, R., Gaitonde, S. A., Ramon-Duaso, C., Stepniewski, T. M., Aranda-Garcia, D., Muneta-Arrate, I., Tepaz, E., Saen-Oon, S., Soliva, R., Shahraki, A., Moreira, D., Brea, J., Loza, M. I., de la Torre, R., Kolb, P., Bouvier, M., Meana, J. J., Robledo, P., & Selent, J. (2024). G protein-specific mechanisms in the serotonin 5-HT_{2A} receptor regulate psychosis related effects and memory deficits. *Nature communications*, 15(1), 4307.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-48196-2>
- Kozłowska, E., Agier, J., Wysokiński, A., Łucka, A., Sobierajska, K., & Brzezińska-Błaszczyk, E. (2019). The expression of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells is altered in schizophrenia. *Psychiatry research*, 272, 540–550.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.12.138>

- Kutz, S. M., Higgins, C. E., & Higgins, P. J. (2012). Novel Combinatorial Therapeutic Targeting of PAI-1 (SERPINE1) Gene Expression in Alzheimer's Disease. *Molecular Medicine & Therapeutics*, 1(2), 106. <https://doi.org/10.4172/2324-8769.1000106>
- Lachance, L. R., & McKenzie, K. (2014). Biomarkers of gluten sensitivity in patients with non-active psychosis: a meta-analysis. *Schizophrenia research*, 152(2-3), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.12.001>
- Laskaris, L. E., Di Biase, M. A., Everall, I., Chana, G., Christopoulos, A., Skafidas, E., Cropley, V. L., & Pantelis, C. (2016). Microglial activation and progressive brain changes in schizophrenia. *British journal of pharmacology*, 173(4), 666–680. <https://doi.org/10.1111/bph.13364>
- Lewis, D. A., & Gonzalez-Burgos, G. (2006). Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nature medicine*, 12(9), 1016–1022. <https://doi.org/10.1038/nm1478>
- Li, R., Ma, X., Wang, G., Yang, J., & Wang, C. (2016). Why sex differences in schizophrenia?. *Journal of translational neuroscience*, 1(1), 37–42.
- Li, Z., Korhonen, E. A., Merlini, A., Strauss, J., Wihuri, E., Nurmi, H., Antila, S., Paech, J., Deutsch, U., Engelhardt, B., Chintharlapalli, S., Koh, G. Y., Flügel, A., & Alitalo, K. (2020). Angiopoietin-2 blockade ameliorates autoimmune neuroinflammation by inhibiting leukocyte recruitment into the CNS. *The Journal of clinical investigation*, 130(4), 1977–1990. <https://doi.org/10.1172/JCI130308>
- Liddel, S., & Barres, B. (2015). SnapShot: Astrocytes in Health and Disease. *Cell*, 162(5), 1170–1170.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.029>
- Lin, J. R., Cai, Y., Zhang, Q., Zhang, W., Nogales-Cadenas, R., & Zhang, Z. D. (2016). Integrated Post-GWAS Analysis Sheds New Light on the Disease Mechanisms of Schizophrenia. *Genetics*, 204(4), 1587–1600. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187195>
- Liu, C., Kanazawa, T., Tian, Y., Mohamed Saini, S., Mancuso, S., Mostaid, M. S., Takahashi, A., Zhang, D., Zhang, F., Yu, H., Doo Shin, H., Sub Cheong, H., Ikeda, M., Kubo, M., Iwata, N., Woo, S. I., Yue, W., Kamatani, Y., Shi, Y., Li, Z., ... Bousman, C. (2019). The schizophrenia genetics knowledgebase: a comprehensive update of findings from candidate gene studies. *Translational psychiatry*, 9(1), 205. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0532-4>
- Liu, H. Y., Chen, C. Y., & Hsueh, Y. P. (2014). Innate immune responses regulate morphogenesis and degeneration: roles of Toll-like receptors and Sarm1 in neurons. *Neuroscience bulletin*, 30(4), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1445-5>
- Liu, Y., Elmas, A., & Huang, K. L. (2023). Mutation Impact on mRNA Versus Protein Expression across Human Cancers. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2023.11.13.566942. <https://doi.org/10.1101/2023.11.13.566942>
- López-Soto, P. J., & Martín-Rodríguez, L. A. (2020). Evaluación de las políticas de salud mental en México: Reducción de camas psiquiátricas y brechas en la atención. *Salud Pública de México*, 62(1), 25-32. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0036-36342020000100072&script=sci_arttext
- Lorrain, D. S., Baccei, C. S., Bristow, L. J., Anderson, J. J., & Varney, M. A. (2003). Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience*, 117(3), 697–706. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00652-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00652-8)

- Malik, J. A., Yaseen, Z., Thotapalli, L., Ahmed, S., Shaikh, M. F., & Anwar, S. (2023). Understanding translational research in schizophrenia: A novel insight into animal models. *Molecular biology reports*, 50(4), 3767–3785. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08241-7>
- Marwaha, S., & Johnson, S. (2004). Schizophrenia and employment - a review. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*, 39(5), 337–349. <https://doi.org/10.1007/s00127-004-0762-4>
- McCutcheon, R. A., Keefe, R. S. E., & McGuire, P. K. (2023). Cognitive impairment in schizophrenia: aetiology, pathophysiology, and treatment. *Molecular psychiatry*, 28(5), 1902–1918. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-01949-9>
- McCutcheon, R. A., Krystal, J. H., & Howes, O. D. (2020). Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 19(1), 15–33. <https://doi.org/10.1002/wps.20693>
- 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>
- McGeachy, M. J., Cua, D. J., & Gaffen, S. L. (2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*, 50(4), 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
- McManus, J., Cheng, Z., & Vogel, C. (2015). Next-generation analysis of gene expression regulation comparing the roles of synthesis and degradation. *Molecular bioSystems*, 11(10), 2680–2689. <https://doi.org/10.1039/c5mb00310e>
- Meltzer H.Y., & Bobo W.V., & Heckers S.H., & Fatemi H.S. (2008). Chapter 16. schizophrenia. Ebert M.H., & Loosen P.T., & Nurcombe B., & Leckman J.F.(Eds.), *CURRENT Diagnosis & Treatment: Psychiatry*, 2e. The McGraw-Hill Companies. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=336§ionid=39717888>.
- Merikangas, K. R. (2018). Concepts of Genetic Epidemiology. *Translational Bioinformatics*, 17–26. Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature* 2010; 468: 187-93. <http://doi:10.1007/978-98113>
- Merritt, K., McGuire, P. K., Egerton, A., 1H-MRS in Schizophrenia Investigators, Aleman, A., Block, W., Bloemen, O. J. N., Borgan, F., Bustillo, J. R., Capizzano, A. A., Coughlin, J. M., De la Fuente Sandoval, C., Demjaha, A., Dempster, K., Do, K. Q., Du, F., Falkai, P., Galinska-Skok, B., Gallinat, J., Gasparovic, C., ... Yamasue, H. (2021). Association of Age, Antipsychotic Medication, and Symptom Severity in Schizophrenia With Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Brain Glutamate Level: A Mega-analysis of Individual Participant-Level Data. *JAMA psychiatry*, 78(6), 667–681. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2021.0380>Ryan RM, Ingram SL, Scimemi A (2021) Regulation of glutamate, GABA and dopamine transporter uptake, surface mobility and expression. *Front Cell Neurosci* 15:670346. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.670346>
- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, 16(1), 22–34.
- Mockenhaupt, S., & Makeyev, E. V. (2015). Non-coding functions of alternative pre-mRNA splicing in development. *Seminars in cell & developmental biology*, 47–48, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.018>
- Mockenhaupt, S., & Makeyev, E. V. (2015). Non-coding functions of alternative pre-mRNA splicing in development. *Seminars in cell & developmental biology*, 47–48, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.018>

- Moghaddam, B., & Javitt, D. (2012). From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(1), 4–15. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.181>
- Mosyagin I, Dettling M, Roots I, Mueller-Oerlinghausen B, Cascorbi I. (2004) Impact of myeloperoxidase and NADPH-oxidase polymorphisms in drug-induced agranulocytosis. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. Dec;24(6):613-617. DOI: 10.1097/01.jcp.0000144891.52858.a6. PMID: 15538122.
- Müller, N., & Schwarz, M. J. (2008). A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelin's dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 258 Suppl 2, 97–106. <https://doi.org/10.1007/s00406-008-2012-3>
- Müller, N., & Schwarz, M. J. (2020). Inflammatory biomarkers and immunotherapy in schizophrenia and depression. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 97.
- Müller, N., Weidinger, E., Leitner, B., & Schwarz, M. J. (2015). The role of inflammation in schizophrenia. *Frontiers in neuroscience*, 9, 372. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00372>
- Nayak, U., Manikkath, J., Arora, D., & Mudgal, J. (2025). Impact of neuroinflammation on brain glutamate and dopamine signalling in schizophrenia: an update. *Metabolic brain disease*, 40(2), 119. <https://doi.org/10.1007/s11011-025-01548-3>
- Nemani, K., Hosseini Ghomi, R., McCormick, B., & Fan, X. (2015). Schizophrenia and the gut-brain axis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 56, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.08.018>
- Nishizaki, S. S., Ng, N., Dong, S., Porter, R. S., Morterud, C., Williams, C., Asman, C., Switzenberg, J. A., & Boyle, A. P. (2020). Predicting the effects of SNPs on transcription factor binding affinity. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(2), 364–372. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz612>
- Nowrouzi, B., Kamhi, R., Hu, J., Kennedy, J. L., Matmari, M., & De Luca, V. (2015). Age at onset mixture analysis and systematic comparison in schizophrenia spectrum disorders: Is the onset heterogeneity dependent on heterogeneous diagnosis?. *Schizophrenia research*, 164(1-3), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.03.004>
- Nyer, M., Kasckow, J., Fellows, I., Lawrence, E. C., Golshan, S., Solorzano, E., & Zisook, S. (2010). The relationship of marital status and clinical characteristics in middle-aged and older patients with schizophrenia and depressive symptoms. *Annals of clinical psychiatry : official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*, 22(3), 172–179.
- Okazaki, S., Hishimoto, A., Otsuka, I., Watanabe, Y., Numata, S., Boku, S., Shimmyo, N., Kinoshita, M., Inoue, E., Ohmori, T., Someya, T., & Sora, I. (2018). Increased serum levels and promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor in schizophrenia. *Progress in neuro psychopharmacology & biological psychiatry*, 83, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.01.001>
- Okun, E., Griffioen, K. J., & Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends in neurosciences*, 34(5), 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005>

- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6080), 489–493. <https://doi.org/10.1126/science.1219328>
- Orbe, E. B., & Benros, M. E. (2023). Immunological Biomarkers as Predictors of Treatment Response in Psychotic Disorders. *Journal of personalized medicine*, 13(9), 1382. <https://doi.org/10.3390/jpm13091382>
- Pan, W., Hsueh, H., Jayaram, B., Khan, R. S., Huang, E. Y., Wu, X., Chen, C., & Kastin, A. J. (2012). Leptin action on nonneuronal cells in the CNS: potential clinical applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1264(1), 64–71. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06472.x>
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(6), 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Park, S. J., Lee, J. Y., Kim, S. J., Choi, S. Y., Yune, T. Y., & Ryu, J. H. (2015). Toll-like receptor-2 deficiency induces schizophrenia-like behaviors in mice. *Scientific reports*, 5, 8502. <https://doi.org/10.1038/srep08502>
- Patel KR, Cherian J, Gohil K, Atkinson D (2014) Schizophrenia: overview and treatment options. *P T* 39:638–645
- Pedersen, M. S., Benros, M. E., Agerbo, E., Børglum, A. D., & Mortensen, P. B. (2012). Schizophrenia in patients with atopic disorders with particular emphasis on asthma: a Danish population-based study. *Schizophrenia research*, 138(1), 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.02.019>
- Plitman, E., Iwata, Y., Caravaggio, F., Nakajima, S., Chung, J. K., Gerretsen, P., Kim, J., Takeuchi, H., Chakravarty, M. M., Remington, G., & Graff-Guerrero, A. (2017). Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophrenia bulletin*, 43(4), 764–777. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw221>
- Pouget JG; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Han B, Wu Y, Mignot E, Ollila HM, Barker J, Spain S, Dand N, Trembath R, Martin J, Mayes MD, Bossini Castillo L, López-Isac E, Jin Y, Santorico SA, Spritz RA, Hakonarson H, Polychronakos C, Raychaudhuri S, Knight J. (2019). Cross-disorder analysis of schizophrenia and 19 immune mediated diseases identifies shared genetic risk. *Hum Mol Genet.* 15;28(20):3498-3513. doi: 10.1093/hmg/ddz145.
- Pouget, J. G., Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Han, B., Wu, Y., Mignot, E., Ollila, H. M., Barker, J., Spain, S., Dand, N., Trembath, R., Martin, J., Mayes, M. D., Bossini-Castillo, L., López-Isac, E., Jin, Y., Santorico, S. A., Spritz, R. A., Hakonarson, H., Polychronakos, C., Raychaudhuri, S., ... Knight, J. (2019). Cross-disorder analysis of schizophrenia and 19 immune-mediated diseases identifies shared genetic risk. *Human molecular genetics*, 28(20), 3498–3513. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz145>
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y. H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K. E., Graveley, B. R., & Collier, J. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, 160(6), 1111–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.029>
- Prudente, S., Andreozzi, F., Mercuri, L., Alberico, F., Di Gamberardino, A., Mannino, G. C., Ludovico, O., Piscitelli, P., Di Paola, R., Morano, S., Penno, G., Carella, M., De Cosmo, S., Trischitta, V.,

- & Barbetti, F. (2022). Contribution of ONECUT1 variants to different forms of non-autoimmune diabetes mellitus in Italian patients. *Acta diabetologica*, 59(8), 1113–1116.
<https://doi.org/10.1007/s00592-022-01889-w>
- Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F., & Sklar, P. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*, 460(7256), 748–752. <https://doi.org/10.1038/nature08185>
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71–85.
- Rawani, N. S., Chan, A. W., Dursun, S. M., & Baker, G. B. (2024). The Underlying Neurobiological Mechanisms of Psychosis: Focus on Neurotransmission Dysregulation, Neuroinflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Dysfunction. *Antioxidants*, 13(6), 709.
<https://doi.org/10.3390/antiox13060709>
- Reyes-Lizaola, S., Luna-Zarate, U., Tendilla-Beltrán, H., Morales-Medina, J. C., & Flores, G. (2024). Structural and biochemical alterations in dendritic spines as key mechanisms for severe mental illnesses. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 129, 110876.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110876>
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., & Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9577–9582.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0502272102>
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature cell biology*, 9(9), 1081–1088.
<https://doi.org/10.1038/ncb1629>
- Rosa, M. A., & Valentini, W. (2020). Atención comunitaria y salud mental: Enfoques para un mejor acceso a los servicios de salud. *Ciência & Saúde Coletiva*, 25(2), 395-408.
<https://www.scielo.br/j/csc/a/q9m6CKC9fXqt9578gpw3j6d>
- Saoud H, Inoubli O, Ben Fredj S, et al. Protective Effect of the MCP-1 Gene Haplotype against Schizophrenia. *Biomed Res Int*. 2019;2019:4042615. Published 2019 Dec 2.
doi:10.1155/2019/4042615
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511(7510), 421–427.
<https://doi.org/10.1038/nature13595>
- Schobel, S. A., Chaudhury, N. H., Khan, U. A., Paniagua, B., Styner, M. A., Asllani, I., Inbar, B. P., Corcoran, C. M., Lieberman, J. A., Moore, H., & Small, S. A. (2013). Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver. *Neuron*, 78(1), 81–93.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.011>

- Severance, E. G., Prandovszky, E., Castiglione, J., & Yolken, R. H. (2015). Gastroenterology issues in schizophrenia: why the gut matters. *Current psychiatry reports*, 17(5), 27. <https://doi.org/10.1007/s11920-015-0574-0>
- Sharma I., Priya I., Sharma S., Gupta S., Arora M., Mahajan R., Kapoor N., (2022). Association of toll like receptor 2 gene polymorphism (rs3804099) with susceptibility to Schizophrenia risk in the Dogra population of Jammu region, North India, *The European Journal of Psychiatry*, Volume 36, Issue 2, Pages 106-113, ISSN 0213-6163. <https://doi.org/10.1016/j.ejpsy.2022.02.001>.
- Shastri B. S. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 578, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1
- Shatoff, E., & Bundschuh, R. (2020). Single nucleotide polymorphisms affect RNA-protein interactions at a distance through modulation of RNA secondary structures. *PLoS computational biology*, 16(5), e1007852. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007852>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Song, R., Gao, Y., Dozmorov, I., Malladi, V., Saha, I., McDaniel, M. M., Parameswaran, S., Liang, C., Arana, C., Zhang, B., Wakeland, B., Zhou, J., Weirauch, M. T., Kottyan, L. C., Wakeland, E. K., & Pasare, C. (2021). IRF1 governs the differential interferon-stimulated gene responses in human monocytes and macrophages by regulating chromatin accessibility. *Cell reports*, 34(12), 108891. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108891>
- Sotelo-Ramírez, C. E., Camarena, B., Sanabrais-Jiménez, M. A., Zaragoza-Hoyos, J. U., Ordoñez Martínez, B., Escamilla-Orozco, R. I., & Gómez-González, B. (2023). Toll-Like Receptor (TLR) 1, 2, and 6 Gene Polymorphisms Support Evidence of Innate Immune Factors in Schizophrenia. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 19, 2353–2361. <https://doi.org/10.2147/NDT.S420952>
- Sotoyama, H., Namba, H., Tohmi, M., & Nawa, H. (2023). Schizophrenia Animal Modeling with Epidermal Growth Factor and Its Homologs: Their Connections to the Inflammatory Pathway and the Dopamine System. *Biomolecules*, 13(2), 372. <https://doi.org/10.3390/biom13020372>
- Staal, W. G., Hulshoff Pol, H. E., Schnack, H. G., Hoogendoorn, M. L., Jellema, K., & Kahn, R. S. (2000). Structural brain abnormalities in patients with schizophrenia and their healthy siblings. *The American journal of psychiatry*, 157(3), 416–421. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.3.416>
- Stahl S. M. (2007). Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *CNS spectrums*, 12(4), 265–268. <https://doi.org/10.1017/s1092852900021015>
- Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H. G., & Bogerts, B. (2008). Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *Journal of psychiatric research*, 42(2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.10.013>
- Stone, J. M., Morrison, P. D., & Pilowsky, L. S. (2007). Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia—a synthesis and selective review. *Journal of psychopharmacology* (Oxford, England), 21(4), 440–452. <https://doi.org/10.1177/0269881106073126>
- Stone, W. S., Phillips, M. R., Yang, L. H., Kegeles, L. S., Susser, E. S., & Lieberman, J. A. (2022). Neurodegenerative model of schizophrenia: Growing evidence to support a revisit. *Schizophrenia research*, 243, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2022.03.004>

- Sullivan P. F. (2005). The genetics of schizophrenia. *PLoS medicine*, 2(7), e212. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020212>
- Sullivan, P. F., Kendler, K. S., & Neale, M. C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of general psychiatry*, 60(12), 1187–1192. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.12.1187>
- Szabo, A., O'Connell, K. S., Ueland, T., Sheikh, M. A., Agartz, I., Andreou, D., Aukrust, P., Boye, B., Bøen, E., Drange, O. K., Elvsåshagen, T., Engh, J. A., Hope, S., Collier Høegh, M., Joa, I., Johnsen, E., Kroken, R. A., Vik Lagerberg, T., Lekva, T., Malt, U. F., ... Djurovic, S. (2022). Increased circulating IL-18 levels in severe mental disorders indicate systemic inflammasome activation. *Brain, behavior, and immunity*, 99, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.10.017>
- Tesli, M., Degerud, E., Plana-Ripoll, O., Gustavson, K., Torvik, F. A., Ystrom, E., Ask, H., Tesli, N., Høye, A., Stoltenberg, C., Reichborn-Kjennerud, T., Nesvåg, R., & Naess, Ø. (2022). Educational attainment and mortality in schizophrenia. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 145(5), 481–493. <https://doi.org/10.1111/acps.13407>
- Thara, R., & Srinivasan, T. N. (1997). Outcome of marriage in schizophrenia. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*, 32(7), 416–420. <https://doi.org/10.1007/BF00788182>
- 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., Wu, Y., ... Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (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>
- Tsai, J., & Rosenheck, R. A. (2013). Psychiatric comorbidity among adults with schizophrenia: a latent class analysis. *Psychiatry research*, 210(1), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.05.013>
- Tsuang M. (2000). Schizophrenia: genes and environment. *Biological psychiatry*, 47(3), 210–220. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(99\)00289-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00289-9)
- Uher, R., & Zwickler, A. (2017). Etiology in psychiatry: embracing the reality of poly-geneenvironmental causation of mental illness. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 16(2), 121–129. <https://doi.org/10.1002/wps.20436>
- Vallée A. (2022). Neuroinflammation in Schizophrenia: The Key Role of the WNT/β-Catenin Pathway. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2810. <https://doi.org/10.3390/ijms23052810>
- van der Raadt, J., van Gestel, S. H. C., Nadif Kasri, N., & Albers, C. A. (2019). ONECUT transcription factors induce neuronal characteristics and remodel chromatin accessibility. *Nucleic acids research*, 47(11), 5587–5602. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz273>
- Venkatasubramanian, G., & Debnath, M. (2013). The TRIPS (Toll-like receptors in immuno-inflammatory pathogenesis) Hypothesis: a novel postulate to understand schizophrenia. *Progress in neuro psychopharmacology & biological psychiatry*, 44, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.001>

- Vidal, P. M., & Pacheco, R. (2020). The Cross-Talk Between the Dopaminergic and the Immune System Involved in Schizophrenia. *Frontiers in pharmacology*, 11, 394. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00394>
- Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2018). Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *International reviews of immunology*, 37(1), 20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>
- Wang, J., Zhang, Z., Liu, J., Zhao, J., & Yin, D. (2016). Ectodomain Architecture Affects Sequence and Functional Evolution of Vertebrate Toll-like Receptors. *Scientific reports*, 6, 26705. <https://doi.org/10.1038/srep26705>
- Wang, M., & Liang, P. (2005). Interleukin-24 and its receptors. *Immunology*, 114(2), 166–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02094.x>
- WHO ASSIST Working Group (2002). The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility. *Addiction (Abingdon, England)*, 97(9), 1183–1194. <https://doi.org/10.1046/j.13600443.2002.00185.x>
- Widera, D., Holtkamp, W., Entschladen, F., Niggemann, B., Zänker, K., Kaltschmidt, B., & Kaltschmidt, C. (2004). MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 83(8), 381–387. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00403>
- Widera, D., Holtkamp, W., Entschladen, F., Niggemann, B., Zänker, K., Kaltschmidt, B., & Kaltschmidt, C. (2004). MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *European journal of cell biology*, 83(8), 381–387. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00403>
- Yang, A. C., & Tsai, S. J. (2017). New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1689. <https://doi.org/10.3390/ijms18081689>
- Yiu, J. H., Dorweiler, B., & Woo, C. W. (2017). Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 95(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1474-4>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(18), 6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zhan, N., Sham, P. C., So, H. C., & Lui, S. S. Y. (2023). The genetic basis of onset age in schizophrenia: evidence and models. *Frontiers in genetics*, 14, 1163361. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1163361>
- Zhang, L., Zhao, N., Zhu, M., Tang, M., Liu, W., & Hong, W. (2023). Adverse childhood experiences in patients with schizophrenia: related factors and clinical implications. *Frontiers in psychiatry*, 14, 1247063. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1247063>

Anexo 1: Carta de consentimiento informado para el reclutamiento de pacientes



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Versión 7, 25 de marzo 2024, Página 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE

Proyecto: "Genética neuropsiquiátrica de la psicosis en población mexicana (NeuroMex)".

Lea atentamente este documento

Esta carta de consentimiento puede contener palabras que usted no entienda. Pida al personal del estudio que le explique cualquier palabra o procedimiento que no comprenda claramente. El propósito de esta carta es brindarle información acerca de este estudio. Si firma este formulario, estará aceptando participar en el estudio. Este formulario describe la finalidad, los procedimientos, los beneficios, los riesgos y las incomodidades del estudio. Solo puede participar en este estudio si desea hacerlo; puede rehusarse a participar en el estudio o abandonarlo en cualquier momento, sin perder los beneficios a los que tendría derecho si no lo hiciera. Lea esta información y haga cualquier pregunta que considere necesaria.

¿Cuál es la finalidad del estudio?

La finalidad del estudio es investigar los genes que causan los trastornos psiquiátricos. Nuestro cuerpo está hecho de muchas partes diminutas llamadas células. Estas células contienen genes hechos de ADN, que le dicen a las células cómo deben crecer y funcionar. Heredamos nuestro ADN de nuestros padres. Cada célula del cuerpo tiene el mismo ADN. Pero nadie más en el mundo tiene el mismo ADN que usted, a menos que tenga un hermano gemelo idéntico. Las diferencias en el ADN son las que determinan que algunas personas sean altas y otras bajas, y es también lo que hace que los hombres y las mujeres sean distintos. Algunas enfermedades son causadas por problemas con el ADN. En estas enfermedades, algunas células no funcionan como deberían. El estudio del ADN recibe el nombre de genética. Los investigadores de genética usan tejido humano (como la sangre o la saliva) para observar el ADN. Los investigadores de genética están interesados en saber cómo los genes afectan a la forma en que funcionan nuestros cuerpos; por ejemplo, quiénes tienen riesgo de padecer ciertas enfermedades y cuál es la probabilidad con que responderán a un tratamiento. El análisis genético se realizará en las células que se encuentran en la sangre o la saliva, por lo tanto, se le pedirá una muestra de sangre o saliva para poder obtener ADN de allí. El estudio al que se le invitó a participar se llevará a cabo en colaboración con investigadores de los Estados Unidos, por lo que una parte de la muestra (el 1% de la muestra total) se enviará al Broad Institute en Estados Unidos para realizar un análisis de

Calz. México Xochimilco N° 101, Col. San Lorenzo Huipulco, CP. 14370, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México
Tel: (55) 4160 5050 www.inprf.gob.mx





miles de genes simultáneamente, debido a que en este momento no es posible realizar este tipo de metodología en este Instituto. En este estudio se incluirán participantes de todo el mundo, por lo que su muestra se sumará a las obtenidas en otros países.

¿Qué procedimientos involucrará su participación en el estudio?

Se le invita a participar en este estudio debido a que fue diagnosticado con un trastorno psíquico. Su participación consistirá en proporcionar 10 ml (el equivalente a tres cucharadas soperas) de sangre, o una muestra de saliva de 2 mL (el equivalente a media cucharadita) para el análisis genético, una entrevista sobre su salud y también se le pedirá su consentimiento para la obtención de información acerca de su enfermedad en su expediente médico, como enfermedades concomitantes, antecedentes familiares y edad de inicio de su enfermedad. También mediremos su presión arterial, frecuencia cardíaca, altura y peso. Su participación en el estudio tomará aproximadamente de 90 a 120 minutos. Después de participar, usted continuará recibiendo atención médica especializada habitual en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

¿Qué sucederá con mi información genética?

Una parte de su muestra (el 1% de la muestra total) será enviada al Broad Institute en los Estados Unidos para su resguardo y análisis. Otra parte será almacenada de forma indefinida y analizada en el departamento de Farmacogenética formando parte del biobanco de la subdirección de investigaciones clínicas del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz en Ciudad de México bajo el resguardo de la Dra. Beatriz Camarena Medellín.

Para avanzar en el conocimiento sobre estas enfermedades. Su ADN y la información sobre su salud se guardarán y compartirán con otros investigadores en universidades, hospitales, agencias y empresas de todo el mundo. Las muestras y la información estarán disponibles para cualquier pregunta de investigación, como entender cuál es la causa de cierta enfermedad (por ejemplo, las enfermedades cardíacas, el cáncer o los trastornos psiquiátricos), en el desarrollo de nuevos métodos científicos, en la investigación sobre estudios genéticos con los rasgos de comportamiento o en el estudio del origen de los diferentes grupos étnicos.

Sus datos genómicos y su información de salud no incluirán su nombre ni ninguna otra información que pudiera ser utilizada para identificarle, esta información se guardará y almacenarán en la Nube. "En la Nube" se refiere a servidores informáticos en un centro de datos que es manejado por una empresa u otra institución que no forma parte del equipo de



investigación, y a los que se puede acceder a través de Internet. Los datos con su información serán codificados; es decir, toda la información será convertida a un lenguaje formado por números o símbolos (5^*?4&\$7&) que lo hará imposible de entender para cualquier persona y sólo el remitente y el destinatario podrán entender la información. Si una persona ajena intercepta un archivo codificado o encriptado, por más que consiga abrirlo sólo verá un grupo de caracteres ilegibles, ya que se requiere una llave especial para llevarlos a formato normal. De esta manera, una vez que los datos son encriptados, se guardarán en el servidor de Nube, el cual es también seguro para evitar el acceso no autorizado. Tenga en cuenta que la empresa o institución que procesará y guardará los datos para esta investigación se encuentra en los Estados Unidos y también puede estar ubicada en otros países donde las leyes pueden no proteger su privacidad al mismo nivel que las leyes de su país. Sin embargo, se tomarán todas las medidas razonables para proteger su privacidad.

Para permitir que los investigadores compartan los resultados de las pruebas, los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos y otros repositorios centrales han desarrollado bancos de datos especiales (conjunto de datos almacenados) que analizan los datos y reúnen los resultados de los estudios completos sobre el genoma. Estos bancos también pueden analizar y almacenar muestras de ADN. Sus datos genómicos individuales y su información personal de salud se guardarán en una base de datos con acceso controlado. En estos bancos centrales se almacenan muestras e información genética que podrá ser utilizada por otros investigadores para hacer más estudios. Esto quiere decir que solo los investigadores que hayan solicitado y obtenido el permiso para utilizar la información en un proyecto de investigación específico tendrán acceso a dicha información. Los investigadores calificados que pueden acceder a las bases de datos pueden ser del gobierno, así como de instituciones académicas o comerciales. Los investigadores con autorización para acceder a la información de la base de datos no pueden identificarle y aceptarán no intentar identificarle.

¿Cuáles son los posibles riesgos e incomodidades al participar en el estudio?

Entrevista:

Al contestar los cuestionarios es posible que se toquen temas que puedan llegar a incomodarle, si esto sucede puede no responder la pregunta. Tiene la libertad de solicitar un descanso en el momento que usted lo requiera. En caso de necesitar contención le será proporcionada por el asistente clínico o su médico tratante.



Muestra de sangre:

Después de tomar la muestra de sangre podría aparecer un moretón, esto es poco frecuente, pero si llegase a ocurrir, el moretón desaparecerá en pocos días. La extracción de sangre será realizada por un médico o un técnico experimentado, disminuyendo la probabilidad de que esto ocurra.

Muestra de saliva:

Un investigador le solicitará que deposite su saliva en un tubo de plástico pequeño. Si usted ha consumido algún alimento, bebida, o masticado chicle, tendrá que esperar 30 minutos para poder donar su saliva. Una vez listo, usted donará alrededor de media cucharadita (2 mL) de saliva. Su ADN se encuentra en esa muestra de saliva. Usted puede llegar a sentir incomodidad al depositar su saliva en el tubo.

Confidencialidad:

Un riesgo potencial de participar en este estudio es la pérdida de su información. Esto es muy poco probable que suceda ya que le garantizamos que su información permanecerá siempre protegida. Para salvaguardar la confidencialidad, limitaremos el acceso, autorizando sólo a la Dra. Beatriz Camarena y a los administradores de la base de datos designados dentro del equipo de estudio de NeuroMex.

¿Cuáles son los beneficios que obtendrá de esta participación?

Su participación le permitirá unirse a un estudio cuyo objetivo es estudiar los genes relacionados con los trastornos psiquiátricos. Los datos genéticos no le proporcionarán ningún beneficio directo; sin embargo, se le proporcionará un folleto con información sobre esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar. El folleto contiene información sobre el proyecto NeuroMex y un sitio de internet en donde puede ver actualizaciones sobre el proyecto y del equipo de investigación.

¿Recibiré los resultados de las pruebas genéticas realizadas a mi muestra de sangre o saliva?

No recibirá ningún resultado individual obtenido a partir del estudio de las muestras de sangre o saliva que nos proporcione debido a que los resultados son sólo con fines de investigación y son analizados en toda la muestra; es decir los resultados de su muestra se suman a la obtenida de los 9000 participantes para tener un resultado total de la muestra de estudio.

Confidencialidad

Toda la información clínica será manejada a través de códigos. La información, que incluye su nombre, dirección u otra información personal, solo quedará registrada en el expediente de

investigación, consultado únicamente por los investigadores involucrados en el estudio. Los investigadores pueden escribir artículos y hacer presentaciones sobre la investigación que realizan con las muestras y la información que usted ha proporcionado. Estos documentos y presentaciones no incluirán su nombre, pero pueden incluir información resumida, como la frecuencia con la que ocurrieron cambios genéticos particulares en las personas que participaron en este estudio. Este tipo de información resumida también estará disponible en bases de datos que cualquiera pueda ver (por ejemplo, en la internet). Si los resultados de este estudio llegaran a presentarse, su identidad no será revelada. La muestra de ADN que se enviará a los Estados Unidos no incluirá su nombre; esta se identificará con un código para proteger a su identidad.

Todas sus respuestas en este estudio serán tratadas confidencialmente. Esto significa que no las compartiremos con nadie a menos que usted nos autorice o que pensemos que usted o alguien más esté en peligro. Específicamente, si nos dice que usted u otras personas están en peligro por sí mismo o por alguna otra persona, no podemos mantener esa información privada, y tomaremos medidas para asegurarnos de que todas las personas involucradas estén seguras. También proporcionaremos información confidencial sobre otros servicios de apoyo si usted u otros miembros de su familia necesitan más servicios médicos o sociales.

¿Qué ocurre si cambio de opinión?

Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene la libertad de abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee. Su muestra de ADN también puede ser destruida cuando lo solicite. La Dra. Beatriz Camarena del Departamento de Farmacogenética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, estará a cargo de la custodia de este material. Si ya se realizaron pruebas a su muestra al momento en que abandona el estudio, es posible que sus datos genéticos ya hayan sido compartidos con otros investigadores. En ese caso, no será posible destruir estos datos. Los datos que ya hayan sido utilizados permanecerán como parte de la base de datos del estudio y puede ser que no se eliminen para mantener la integridad de la investigación. Sin embargo, cualquier información que lo identifique será destruida para que nadie pueda decir que los datos le pertenecen a usted.

Costos

Su participación en el estudio no tendrá ningún costo para usted.





¿A quién puede solicitar información?

Si usted acepta participar en este estudio, se les garantiza una respuesta a sus preguntas. Un psiquiatra estará presente para atender cualquier pregunta o inquietud mientras se lleva a cabo el estudio. Si tiene alguna pregunta acerca del estudio, llame a la investigadora principal, la Dra. Beatriz Camarena, al 55 4160-5075 en horas regulares de trabajo (lunes a viernes de 9:00 a 17:00 hrs).

Si tiene alguna pregunta acerca de sus derechos con respecto a la investigación, llame al presidente del Comité de Ética en Investigación, el Dr. Ilyamin Merlin, al 55 4160-5467 en horas regulares de trabajo.

Declaración de consentimiento del participante:

- + Se me ha informado que participare en un estudio sobre los genes relacionados con los trastornos psicóticos titulado "Genética neuropsiquiátrica de la psicosis en población mexicana (NeuroMex)".
- + Se me ha informado que mis datos genéticos se almacenarán en una base de datos con acceso controlado y que se compartirán con investigadores tal como se describió anteriormente.
- + He tenido suficiente tiempo para considerar si deseo participar o no en este estudio.
- + Mi participación es voluntaria y puedo decidir no participar o abandonar el estudio en cualquier momento, sin que me aplique ninguna penalidad o pérdida de mi tratamiento habitual.
- + He tenido la oportunidad de preguntar y de resolver cualquier inquietud acerca de este estudio.
- + Se me ha informado acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo durante este estudio.
- + Se me ha informado acerca de los riesgos y beneficios de mi participación.
- + Se me ha informado que recibiré una copia firmada y con fecha de esta carta de consentimiento.
- + Recibiré un folleto informativo relacionado con estas enfermedades.





Participant ID

Saliva ID

Después de leer, comprender y aclarar cualquier inquietud acerca de las implicaciones de participar en este estudio, acepto voluntariamente participar en él.

Nombre del participante _____

Firma del participante _____ Fecha _____
(día/mes/año)

Nombre del testigo 1 _____

Firma del testigo 1 _____ Fecha _____
(día/mes/año)

Nombre del testigo 2 _____

Firma del testigo 2 _____ Fecha _____
(día/mes/año)

Nombre del investigador que solicitó el consentimiento _____

Firma del investigador que solicitó el consentimiento _____

Fecha _____ (día/mes/año)

Resguardo de Muestras Biológicas

Si usted acepta participar en el presente estudio en una investigación que tiene como objetivo el análisis de genes involucrados en el desarrollo de los trastornos psicóticos. Una parte de su muestra (el 1% de la muestra total) será enviada a Estados Unidos para su análisis, debido a que la institución no cuenta con los equipos necesarios para su análisis. Sin embargo, algunos análisis se harán por nuestro grupo de investigación en México. De tal manera, se le invita a que su muestra de ADN sea almacenada en el departamento de Farmacogenética indefinidamente, formando parte del biobanco de la subdirección de investigaciones clínicas, bajo el resguardo de la Dra. Beatriz Camarena Medellín.

Asimismo, su muestra de ADN podrá ser destruida en el momento en que lo solicite, sin que se afecte los beneficios a los cuales tiene derecho como participante de un estudio de investigación. Su muestra será manejada por medio de códigos para proteger su identidad. La información que incluya su nombre, dirección u otros datos personales solo será registrada en el expediente de investigación, el cual solo será consultado por los investigadores involucrados en el estudio. Si los resultados de esta investigación son presentados, su identidad no será revelada.

Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, por favor comuníquese con la investigadora principal, Dra. Beatriz Camarena al teléfono 55 4160-5075, en horas regulares de trabajo (lunes a viernes de 9:00 a 17:00 hrs).

Estoy de acuerdo en que el material genético sea almacenado en el departamento de farmacogenética.

Sí ☐ No ☐

Firma del participante _____

Fecha _____ (día/mes/año)



Anexo 2: Carta de consentimiento informado para el reclutamiento de controles



Versión 7, 25 de marzo 2024, Página 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CONTROL

Proyecto: “Genética neuropsiquiátrica de la psicosis en población mexicana (NeuroMex)”

Lea atentamente este documento

Esta carta de consentimiento puede contener palabras que usted no entienda. Pida al personal del estudio que le explique cualquier palabra o procedimiento que no comprenda claramente. El propósito de esta carta es brindarle información acerca de este estudio. Si firma este formulario, estará otorgando permiso para participar en el estudio. Este formulario describe la finalidad, los procedimientos, los beneficios, los riesgos, las incomodidades y las advertencias del estudio. Solo debe participar en este estudio si desea hacerlo; puede rehusarse a participar en el estudio o abandonarlo en cualquier momento, sin perder los beneficios a los que tendría derecho si no lo hiciera. Lea esta información y haga cualquier pregunta que considere necesaria.

¿Cuál es la finalidad del estudio?

La finalidad del estudio es investigar los genes que causan trastornos psiquiátricos. Nuestro cuerpo está hecho de muchas partes diminutas llamadas células. Estas células contienen genes hechos de ADN, que le dicen a las células cómo deben crecer y funcionar. Heredamos nuestro ADN de nuestros padres. Cada célula del cuerpo tiene el mismo ADN. Pero nadie más en el mundo tiene el mismo ADN que usted, a menos que tenga un hermano gemelo idéntico. Las diferencias en el ADN son las que determinan que algunas personas sean altas y otras bajas, y es también lo que hace que los hombres y las mujeres sean distintos. Algunas enfermedades son causadas por problemas con el ADN. En estas enfermedades, algunas células no funcionan como deberían. El estudio del ADN recibe el nombre de genética. Los investigadores de genética usan tejido humano (como la sangre o la saliva) para observar el ADN. Los investigadores de genética están interesados en saber cómo los genes afectan a la forma en que funcionan nuestros cuerpos; por ejemplo, quiénes tienen riesgo de padecer ciertas enfermedades y cuál es la probabilidad con que responderán a un tratamiento. El análisis genético se realizará en las células que se encuentran en la sangre o la saliva, por lo tanto, se le pedirá una muestra de sangre o saliva para poder obtener ADN de allí. El estudio al que se le invitó a participar se llevará a cabo en colaboración con investigadores de los Estados Unidos, por lo que una parte de la muestra (el 1%

Culz, México Xochimilco N° 101, Col. San Lorenzo Huipulco, CP, 14370, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México
Tel: (55) 4160 5050 www.inprf.gob.mx



de la muestra total) se enviará al Broad Institute en Estados Unidos para realizar un análisis de miles de genes simultáneamente, debido a que en este momento no es posible realizar este tipo de metodología en este Instituto. En este estudio se incluirán participantes de todo el mundo, por lo que su muestra se sumará a las obtenidas en otros países.

¿Qué procedimientos involucrará su participación en el estudio?

Se le invita a participar en este estudio, por lo que su información genética será comparada con la de los pacientes con trastornos psicóticos. Su participación consistirá en proporcionar 10 ml (el equivalente a tres cucharas soperas) de sangre, o una muestra de saliva de 2 mL (el equivalente a media cucharadita) para el análisis genético y una entrevista sobre su salud. También mediremos su presión arterial, frecuencia cardíaca, altura y peso. Su participación en el estudio tomará aproximadamente de 90 a 120 minutos.

¿Qué sucederá con mi información genética?

Una parte de su muestra (el 1% de la muestra total) será enviada al Broad Institute en los Estados Unidos para su resguardo y análisis. Otra parte será almacenada de forma indefinida y analizada en el departamento de Farmacogenética formando parte del biobanco de la subdirección de investigaciones clínicas del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz en Ciudad de México bajo el resguardo de la Dra. Beatriz Camarena Medellín.

Para avanzar en el conocimiento sobre estas enfermedades. Su ADN y la información sobre su salud se guardarán y compartirán con otros investigadores en universidades, hospitales, agencias y empresas de todo el mundo. Las muestras y la información estarán disponibles para cualquier pregunta de investigación, como entender cuál es la causa de cierta enfermedad (por ejemplo, las enfermedades cardíacas, el cáncer o los trastornos psiquiátricos), en el desarrollo de nuevos métodos científicos, en la investigación sobre estudios genéticos con los rasgos de comportamiento o en el estudio del origen de los diferentes grupos étnicos.

Sus datos genómicos y su información de salud no incluirán su nombre ni ninguna otra información que pudiera ser utilizada para identificarle, esta información se guardará y almacenarán en la Nube. “En la Nube” se refiere a servidores informáticos en un centro de datos que es manejado por una empresa u otra institución que no forma parte del equipo de investigación, y a los que se puede acceder a través de Internet. Los datos con su información serán codificados; es decir, toda la información será convertida a un lenguaje formado por



números o símbolos (5^*?4&\$7&) que lo hará imposible de entender para cualquier persona y sólo el remitente y el destinatario podrán entender la información. Si una persona ajena intercepta un archivo encriptado, por más que consiga abrirlo sólo verá un grupo de caracteres ilegibles, ya que se requiere una llave especial para llevarlos a formato normal. De esta manera, una vez que los datos son encriptados, se guardarán en el servidor de Nube, el cual es también seguro para evitar el acceso no autorizado. Tenga en cuenta que la empresa o institución que procesará y guardará los datos para esta investigación se encuentra en los Estados Unidos y también puede estar ubicada en otros países donde las leyes pueden no proteger su privacidad al mismo nivel que las leyes de su país. Sin embargo, se tomarán todas las medidas razonables para proteger su privacidad.

Para permitir que los investigadores compartan los resultados de las pruebas, los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos y otros repositorios centrales han desarrollado bancos de datos especiales (conjunto de datos almacenados) que analizan los datos y reúnen los resultados de los estudios completos sobre el genoma. Estos bancos también pueden analizar y almacenar muestras de ADN. Sus datos genómicos individuales y su información personal de salud se guardarán en una base de datos con acceso controlado. En estos bancos centrales se almacenan muestras e información genética que podrá ser utilizada por otros investigadores para hacer más estudios. Esto quiere decir que solo los investigadores que hayan solicitado y obtenido el permiso para utilizar la información en un proyecto de investigación específico tendrán acceso a dicha información. Los investigadores calificados que pueden acceder a las bases de datos pueden ser del gobierno, así como de instituciones académicas o comerciales. Los investigadores con autorización para acceder a la información de la base de datos no pueden identificarle y aceptarán no intentar identificarle.

¿Cuáles son los posibles riesgos e incomodidades al participar en el estudio?

Entrevista:

Al contestar los cuestionarios es posible que se toquen temas que puedan llegar a incomodarle, si esto sucede puede no responder la pregunta. Tiene la libertad de solicitar un descanso en el momento que usted lo requiera. En caso de necesitar contención le será proporcionada por el asistente clínico.

Muestra de sangre:

Después de tomar la muestra de sangre podría aparecer un moretón, esto es poco frecuente, pero si llegase a ocurrir, el moretón desaparecerá en pocos días. La extracción de sangre será



realizada por un médico o un técnico experimentado, disminuyendo la probabilidad de que esto ocurra.

Muestra de saliva:

Un investigador le solicitará que deposite su saliva en un tubo de plástico pequeño. Si usted ha consumido algún alimento, bebida, o masticado chicle, tendrá que esperar 30 minutos para poder donar su saliva. Una vez listo, usted donará alrededor de media cucharadita (2 mL) de saliva. Su ADN se encuentra en esa muestra de saliva. Usted puede llegar a sentir incomodidad al depositar su saliva en el tubo.

Confidencialidad:

Un riesgo potencial de participar en este estudio es la pérdida de su información. Esto es muy poco probable que suceda ya que le garantizamos que su información permanecerá siempre protegida. Para salvaguardar la confidencialidad, limitaremos el acceso, autorizando sólo a la Dra. Beatriz Camarena y a los administradores de la base de datos designados dentro del equipo de estudio de NeuroMex.

¿Cuáles son los beneficios que obtendrá de esta participación?

Su participación le permitirá unirse a un estudio cuyo objetivo es estudiar los genes relacionados con los trastornos psiquiátricos. Los datos genéticos no le proporcionarán ningún beneficio directo; sin embargo, se le proporcionará un folleto con información sobre esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo y trastorno bipolar. El folleto contiene información sobre el proyecto NeuroMex y un sitio de internet en donde puede ver actualizaciones sobre el proyecto y del equipo de investigación.

¿Recibiré los resultados de las pruebas genéticas realizadas a mi muestra de sangre o saliva?

No recibirá ningún resultado individual obtenido a partir del estudio de las muestras de sangre o saliva que nos proporcione debido a que los resultados son sólo con fines de investigación y son analizados en toda la muestra; es decir los resultados de su muestra se suman a la obtenida de los 9000 participantes para tener un resultado total de la muestra de estudio.

Confidencialidad

Toda la información clínica será manejada a través de códigos. La información, que incluye su nombre, dirección u otra información personal, solo quedará registrada en el expediente de investigación, consultado únicamente por los investigadores involucrados en el estudio. Los investigadores pueden escribir artículos y hacer presentaciones sobre la investigación que

realizan con las muestras y la información que usted ha proporcionado. Estos documentos y presentaciones no incluirán su nombre, pero pueden incluir información resumida, como la frecuencia con la que ocurrieron cambios genéticos particulares en las personas que participaron en este estudio. Este tipo de información resumida también estará disponible en bases de datos que cualquiera pueda ver (por ejemplo, en la internet). Si los resultados de este estudio llegaran a presentarse, su identidad no será revelada. La muestra de ADN que se enviará a los Estados Unidos no incluirá su nombre; esta se identificará con un código para proteger a su identidad.

Todas sus respuestas en este estudio serán tratadas confidencialmente. Esto significa que no las compartiremos con nadie a menos que usted nos autorice o que pensemos que usted o alguien más esté en peligro. Específicamente, si nos dice que usted u otras personas están en peligro por sí mismo o por alguna otra persona, no podemos mantener esa información privada, y tomaremos medidas para asegurarnos de que todas las personas involucradas estén seguras. También proporcionaremos información confidencial sobre otros servicios de apoyo si usted u otros miembros de su familia necesitan más servicios médicos o sociales.

¿Qué ocurre si cambio de opinión?

Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene la libertad de abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee. Su muestra de ADN también puede ser destruida cuando lo solicite. La Dra. Beatriz Camarena del Departamento de Farmacogenética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, estará a cargo de la custodia de este material. Si ya se realizaron pruebas a su muestra al momento en que abandona el estudio, es posible que sus datos genéticos ya hayan sido compartidos con otros investigadores. En ese caso, no será posible destruir estos datos. Los datos que ya hayan sido utilizados permanecerán como parte de la base de datos del estudio y puede ser que no se eliminen para mantener la integridad de la investigación. Sin embargo, cualquier información que lo identifique será destruida para que nadie pueda decir que los datos le pertenecen a usted.

Costos

Su participación en el estudio no tendrá ningún costo para usted.



¿A quién puede solicitar información?

Si usted aceptara participar en este proyecto, se le garantiza una respuesta a sus preguntas. Un psiquiatra estará presente para atender cualquier pregunta o inquietud mientras se lleva a cabo el estudio.

Si tiene alguna pregunta acerca del estudio, llame a la investigadora principal, la Dra. Beatriz Camarena, al 55 4160-5075 en horas regulares de trabajo (lunes a viernes de 9:00 a 17:00 hrs).

Si tiene alguna pregunta acerca de sus derechos con respecto a la investigación, llame al presidente del Comité de Ética en Investigación, el Dr. Ilyamin Merlin, al 55 4160-5467 en horas regulares de trabajo.

Declaración de consentimiento del participante:

- + Se me ha informado que participare como sujeto sano en un estudio sobre los genes relacionados con los trastornos psicóticos titulado "Genética neuropsiquiátrica de la psicosis en población mexicana (NeuroMex)"
- + Se me ha informado que mis datos genéticos se almacenarán en una base de datos con acceso controlado y que se compartirán con investigadores tal como se describió anteriormente.
- + He tenido suficiente tiempo para considerar si deseo participar o no en este estudio.
- + Mi participación es voluntaria y puedo decidir no participar o abandonar el estudio en cualquier momento.
- + He tenido la oportunidad de preguntar y de resolver cualquier inquietud acerca de este estudio.
- + Se me ha informado acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo durante este estudio.
- + Se me ha informado acerca de los riesgos y beneficios de mi participación.
- + Se me ha informado que recibiré una copia firmada y con fecha de esta carta de consentimiento.
- + Recibiré un folleto informativo relacionado con estas enfermedades



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Participant ID

Saliva ID

Después de leer, comprender y aclarar cualquier inquietud acerca de las implicaciones de participar en este estudio, acepto voluntariamente participar en él.

Nombre del participante _____

Firma del participante _____ Fecha _____
(día/mes/año)

Nombre del testigo 1 _____

Firma del testigo 1 _____ Fecha _____
(día/mes/año)

Nombre del testigo 2 _____

Firma del testigo 2 _____ Fecha _____
(día/mes/año)

Nombre del investigador que solicitó el consentimiento _____

Firma del investigador que solicitó el consentimiento _____

Fecha _____ (día/mes/año)



Resguardo de Muestras Biológicas

Si usted acepta participar en el presente estudio en una investigación que tiene como objetivo el análisis de genes involucrados en el desarrollo de los trastornos psicóticos. Una parte de su muestra (el 1% de la muestra total) será enviada a Estados Unidos para su análisis, debido a que la institución no cuenta con los equipos necesarios para su análisis. Sin embargo, algunos análisis se harán por nuestro grupo de investigación en México. De tal manera, se le invita a que su muestra de ADN sea almacenada en el departamento de Farmacogenética indefinidamente, formando parte del biobanco de la subdirección de investigaciones clínicas, bajo el resguardo de la Dra. Beatriz Camarena Medellín.

Asimismo, su muestra de ADN podrá ser destruida en el momento en que lo solicite, sin que se afecte los beneficios a los cuales tiene derecho como participante de un estudio de investigación.

Su muestra será manejada por medio de códigos para proteger su identidad. La información que incluya su nombre, dirección u otros datos personales solo será registrada en el expediente de investigación, el cual solo será consultado por los investigadores involucrados en el estudio. Si los resultados de esta investigación son presentados, su identidad no será revelada.

Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, por favor comuníquese con la investigadora principal, Dra. Beatriz Camarena al teléfono 55 4160-5075, en horas regulares de trabajo (lunes a viernes de 9:00 a 17:00 hrs).

Estoy de acuerdo en que el material genético sea almacenado en el departamento de farmacogenética.

Sí ☐ No ☐

Firma del participante _____

Fecha _____ (día/mes/año)



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Molecular and Functional Analysis of TLR 1, 2 and 6 in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Schizophrenia: A Pilot Study

Carlo E. Sotelo-Ramírez, Marcela Valdés-Tovar, Julio Uriel Zaragoza-Hoyos, Leonardo Ortiz-López, Jesús Argueta, Mauricio Rosel-Vales, Roxana U. Miranda-Labra and Beatriz Camarena

Special Issue

Molecular Mechanisms of Schizophrenia and Novel Treatment Targets

Edited by
Dr. Jenifer Vohs



<https://doi.org/10.3390/ijms26030926>



Article

Molecular and Functional Analysis of TLR 1, 2 and 6 in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Schizophrenia: A Pilot Study

Carlo E. Sotelo-Ramírez ^{1,2} , Marcela Valdés-Tovar ³ , Julio Uriel Zaragoza-Hoyos ² , Leonardo Ortiz-López ³, Jesús Argueta ⁴ , Mauricio Rosel-Vales ⁵, Roxana U. Miranda-Labra ⁶ and Beatriz Camarena ^{2,*}

¹ Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico; csotelor9494@gmail.com

² Departamento de Farmacogenética, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City 14370, Mexico; biojuzh@hotmail.com

³ Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City 14370, Mexico; mvaldes@inprf.gob.mx (M.V.-T.); leosan@inprf.gob.mx (L.O.-L.)

⁴ Laboratorio de Neurofarmacología, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City 14370, Mexico; jadclear@yahoo.com

⁵ Dirección de Servicios Clínicos, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City 14370, Mexico; mrosel1983@gmail.com

⁶ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico; roxml@xanum.uam.mx

* Correspondence: bcamarenam@gmail.com or camare@inprf.gob.mx; Tel.: +52-55-4160-5075

Abstract: Schizophrenia (SZ) is a chronic disabling mental disorder with high heritability, and several immune-regulating genes have been implicated in its pathophysiology. In this study, we investigated the expression of Toll-like receptors (TLRs) 1, 2, and 6 in peripheral blood monocytes from SZ patients and healthy control subjects (HCSs) in the Mexican population, focusing on specific SZ-associated gene variants. Gene expressions were assessed by qPCR, and protein expression was measured using flow cytometry. The secretory profiles of MALP2-stimulated monocytes were evaluated through immunoproteomic arrays. Our results indicate that patients with SZ carrying the rs4833093/*TLR1* GG genotype exhibited significantly lower *TLR1* gene expression compared to TT carriers. Notably, HCSs with the TT genotype showed markedly higher *TLR1* protein expression, while all patients with SZ exhibited significantly reduced protein levels regardless of genotype. Furthermore, monocytes from patients with SZ displayed altered secretion profiles upon TLR stimulation, with significant elevations in IL-18, uPAR, angiopoietin-2, and serpin E1, alongside reductions in MCP-1, IL-17A, IL-24, MIF, and myeloperoxidase compared to HCSs. These findings suggest a dysfunctional TLR-mediated innate immune response in SZ.

Keywords: TLR1; TLR2; TLR6; single-nucleotide polymorphisms; gene expression; schizophrenia



Academic Editor: Philippe De
Deurwaerdère

Received: 5 November 2024

Revised: 5 December 2024

Accepted: 13 December 2024

Published: 23 January 2025

Citation: Sotelo-Ramírez, C.E.; Valdés-Tovar, M.; Zaragoza-Hoyos, J.U.; Ortiz-López, L.; Argueta, J.; Rosel-Vales, M.; Miranda-Labra, R.U.; Camarena, B. Molecular and Functional Analysis of TLR 1, 2 and 6 in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Schizophrenia: A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 926. <https://doi.org/10.3390/ijms26030926>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Schizophrenia (SZ) is considered a disabling, complex, and chronic psychiatric disorder characterized by five symptomatic domains, which can include positive, negative, aggressive, depressive, and cognitive symptoms [1]. According to the World Health Organization, SZ affects over 21 million people worldwide [2]. Family, twin, and adoption studies have indicated that the predisposition to develop SZ is among the highest for psychiatric

disorders, with an estimated heritability of approximately 0.81, highlighting a significant genetic component in its etiology [3]. Genome-wide association studies (GWASs) support a relationship between regulatory genes of the immune response and SZ [4]. Two of the largest GWASs to date [5,6] identified associations with regions within the major histocompatibility complex (MHC), which contains over 200 genes that are key regulators of immune function [7,8]. Post-GWAS analyses have further implicated biological pathways associated with glutamatergic transmission, the gut-brain axis, cytokine signaling, and Toll-like receptor (TLR) signaling [9].

Toll-like receptors (TLRs) are a primary family of pattern recognition receptors that initiate innate immune response. Upon the recognition of pathogen- or damage-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs, respectively), TLRs activate pathways that lead to the synthesis of pro-inflammatory molecules [9]. In preclinical models, mice lacking the *tlr2* gene have exhibited behavioral alterations that resemble the negative symptoms of SZ [10]. Altered levels of biochemical mediators, including cytokines and chemokines, have also been reported in patients with SZ [11–13]. Additionally, postmortem brain analyses of patients with SZ reveal an altered gene expression of molecules critical to the TLR signaling cascade, such as myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) [14]. Furthermore, Kozłowska et al. [15] reported alterations in the expression of different TLRs in European patients with SZ compared with a control group. A previous genetic association study in Mexican population identified that the rs4833093/*TLR1* variant confers an increased risk of developing SZ, while the rs5743709/*TLR2* and rs3775073/*TLR6* variants provide protection [16]. Also, a GxG interaction analysis showed an increased risk of developing SZ between the *TLR1*/rs483309 and *TLR2*/rs5743709 variants [16]. This evidence suggests that TLRs could be related to SZ; however, the effect of the rs4833093, rs5743709, and rs3775073 gene variants on the expression and function of their corresponding receptors is yet unknown.

Taking this into consideration, the aims of this study were to (1) determine the effect of rs483309 of the *TLR1*, rs5743709 of the *TLR2*, and rs3775073 of the *TLR6* by the evaluation of mRNA and protein expression levels in monocytes of patients with SZ and HCSs, and (2) evaluate the *TLR2*/*TLR6* heterodimer function by the analysis of the ligand-stimulated secretory profile of monocytes of patients with SZ and HCSs.

2. Results

2.1. Demographic and Clinical Characteristics of the Sample

The clinical and demographic characteristics of the sample are summarized in Table 1. There were no significant differences in age and sex between patients and controls. Regarding substance use, neither patients nor controls reported illegal drug consumption. Therefore, only tobacco and alcohol consumption in patients and controls are presented in Table 1, showing no significant differences between the groups. Patients had a higher percentage of single individuals than controls. Patients were more likely to have only basic education, while controls showed a higher frequency of advanced education levels. Similarly, a higher proportion of unemployed individuals were noted among patients compared to controls.

2.2. Immunofluorescent Detection of CD14, *TLR1*, *TLR2* and *TLR6*

Immunofluorescent staining for CD14 was conducted to evaluate the efficiency of an immunomagnetic positive selection of human peripheral blood monocytes using MACS® technology (Figure 1A). CD14⁺ cells represented $87.5 \pm 2.6\%$ of the total nuclei count across five randomly selected fields. Among these CD14⁺ cells, the assessment of TLR

immunoreactivity indicated that over 89% of the cells expressed TLR1, TLR2, and TLR6 (Figure 1B).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the sample.

Characteristic	Controls (n = 24)	Patients (n = 24)	Statistics
Age, mean (SD), years	36.4 (5.3)	41.7 (3.2)	$t = 1.63, p = 0.108$
Sex, n (%)			
Male	13 (59.1)	15 (62.5)	$\chi^2 = 0.05, p = 0.812$
Female	9 (40.91)	9 (37.5)	
Marital status, n (%)			
Married/cohabiting	10 (41.7)	1 (4)	$\chi^2 = 9.97, p = 0.0016$
Single	14 (58.3)	24 (96)	
Level of education, n (%), years			
Elementary	2 (8)	11 (46)	$\chi^2 = 16.1, p = 0.0003$
Secondary	6 (25)	10 (41)	
Higher	16 (57)	3 (13)	
Employment status, n (%)			
Yes	24 (100)	13 (54.1)	$\chi^2 = 14.2, p = 0.0002$
No	0 (0)	11 (45.9)	
Tobacco use, n (%)	15 (62.5)	14 (58.3)	$\chi^2 = 0.08, p = 0.767$
Alcohol use, n (%)	14 (66.7)	19 (79.2)	$\chi^2 = 0.89, p = 0.344$
Systolic blood pressure, mean (SD), mmHg	120 (11.1)	117 (14.2)	$t = 0.69, p = 0.492$
Diastolic blood pressure, mean (SD), mmHg	73.8 (10.3)	73.5 (10.2)	$t = 0.098, p = 0.921$
Body mass index, mean (SD), kg/m ²	27.5 (7.1)	29.3 (6.4)	$t = 0.918, p = 0.363$
Age of onset, mean (SD), years	-	23.2 (8.4)	
Age of diagnosis, mean (SD), years	-	26.1 (8.5)	
Second-generation antipsychotic treatment, n (%)	-	15 (62)	
First-generation antipsychotic treatment, n (%)	-	11 (46)	
Antidepressant treatment, n (%)	-	13 (54)	

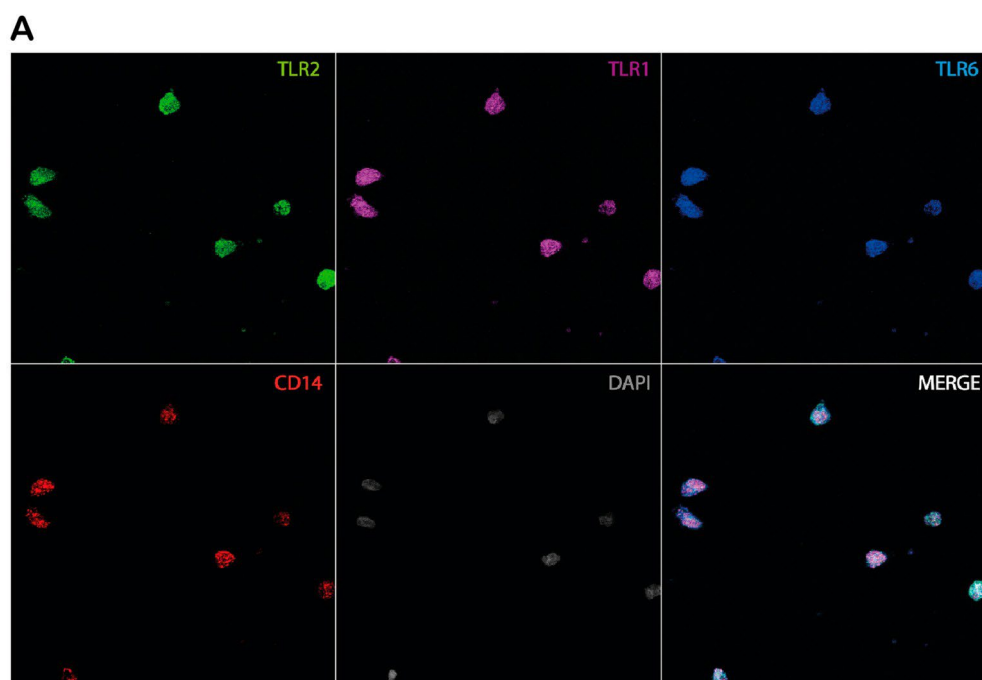


Figure 1. Cont.

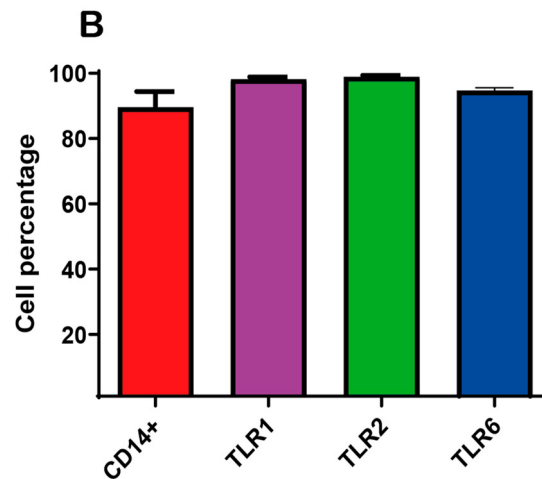


Figure 1. Immunofluorescent characterization of blood CD14⁺-monocytes isolation and detection of TLR1, TLR2, and TLR6 receptors. (A) Immunodetection of markers for DAPI (gray), CD14 (red), TLR1 (purple), TLR2 (green) and TLR6 (blue) were performed. (B) Graph of the percentage of immunoreactive cells to CD14 (87.6 ± 2.7), TLR1 (98.3 ± 2.1), TLR2 (99 ± 0.5) and TLR6 (89 ± 1.1).

2.3. Gene Expression Analysis of TLR1, TLR2, and TLR6

Significant differences were observed in the gene expression levels of *TLR1* ($t = 17.3$, $p < 0.0001$), *TLR2* ($t = 8.61$, $p < 0.0001$), and *TLR6* ($t = 13.8$, $p = 0.0001$) between the total sample of SZ patients and HCSs (Figure 2). In monocytes from patients with SZ, the gene expression levels of all three TLRs were notably lower compared to those in HCSs.

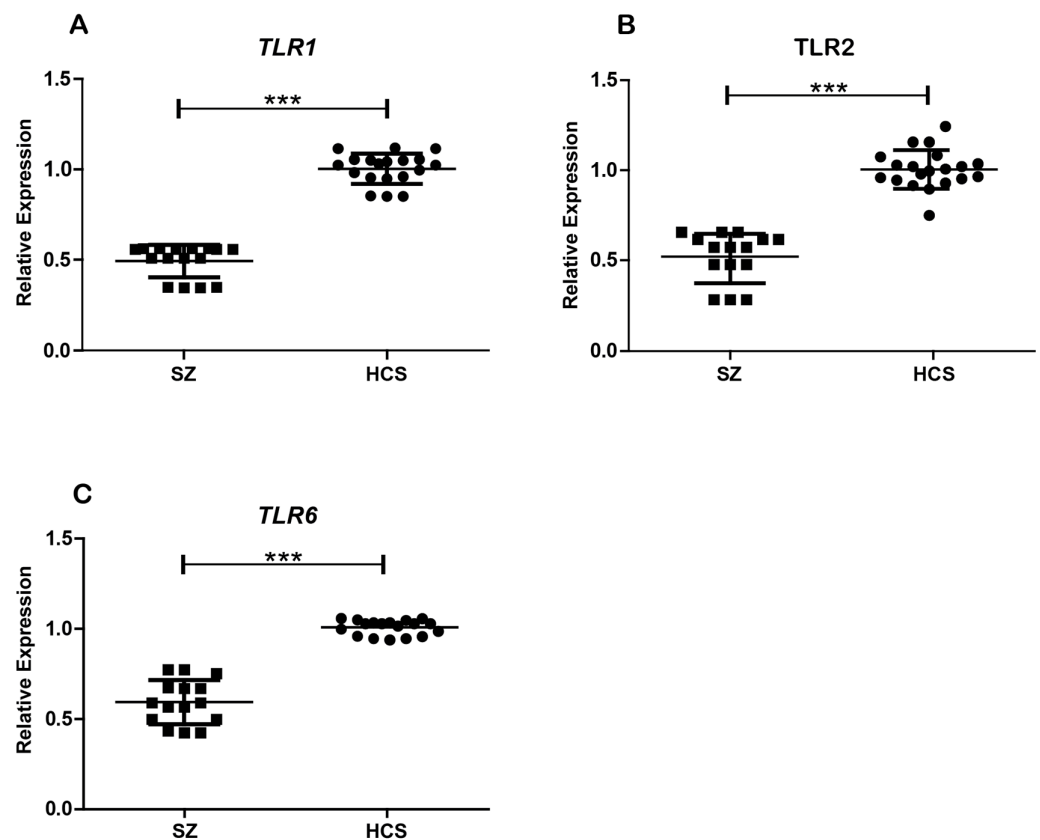


Figure 2. Relative expression of *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* genes in patients with SZ and HCSs. The relative expression of TLR was measured in peripheral blood monocytes via qPCR and normalized to

the endogenous control gene. (A) *TLR1* mRNA expression in monocytes from patients with SZ and HCSs. (B) *TLR2* mRNA expression in monocytes from patients with SZ and HCSs. (C) *TLR6* mRNA expression in monocytes from patients with SZ and HCSs. Data are presented as the mean $\pm$ SEM, and significant differences between groups are indicated (*** $p < 0.001$).

The analysis of gene expression levels in patients with SZ revealed significant differences between the TT and GG genotypes of rs4833092/*TLR1* ($p \leq 0.0001$). In contrast, no significant differences in gene expression were observed among HCSs when comparing the TT and CC genotypes. Additionally, patients with the GG genotype showed a marked decrease in gene expression compared to HCS carriers of both the TT genotype ($p \leq 0.0001$) and the GG genotype ($p \leq 0.0001$) (Figure 3A).

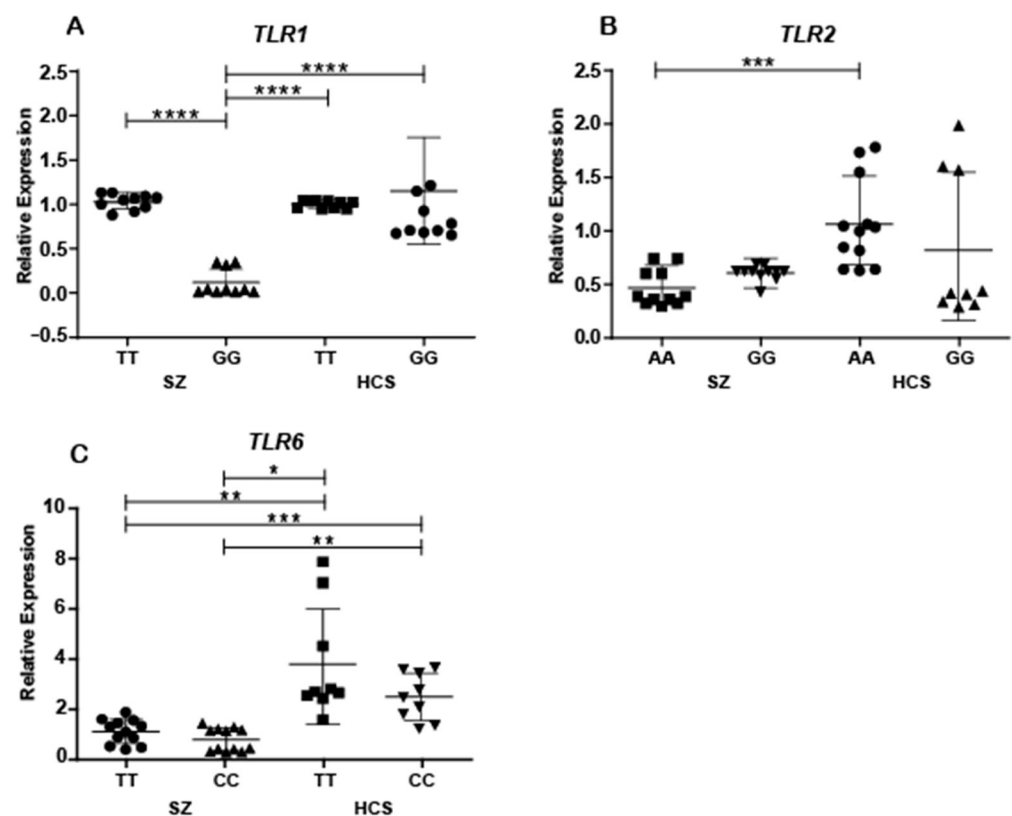


Figure 3. Expression levels of *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* mRNA in monocytes from patients with SZ and HCSs carrying the genotypes of interest. The relative expression of TLR was measured in peripheral blood monocytes via qPCR and normalized to the endogenous control gene. (A) *TLR1* mRNA expression in monocytes from SZ and HCSs carrying different genotypes for the rs4833093 variant (**** $p = 0.0001$). (B) *TLR2* mRNA expression in monocytes from patients with SZ and HCSs carrying different genotypes for the rs5743709 variant (*** $p = 0.0006$). (C) *TLR6* mRNA expression in monocytes from patients with SZ and HCSs carrying different genotypes for the rs3775073 variant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Significant differences in *TLR2* gene expression levels were observed between patients with SZ and HCSs carrying the AA genotype ($p < 0.05$). However, no significant differences were found in gene expression levels between SZ patients and HCSs carrying the GG genotype (Figure 3B).

A decrease in the expression levels of the *TLR6* gene was observed in patient carriers of the CC genotype of rs3775073/*TLR6* compared to HCS carriers of the CC and TT genotypes ($p < 0.05$). Additionally, significant differences were found between patients who were carriers of the CC genotype and HCSs carrying the TT genotype ($p < 0.05$). Finally, the comparison between patients with SZ and HCS carriers of TT genotype showed significant

differences in gene expression levels ($p < 0.05$) (Figure 3C). In contrast, no significant differences in gene expression were observed among SZ when comparing carriers of the TT and CC genotypes.

2.4. Protein Expression Analysis of TLR1, TLR2, and TLR6

To assess the levels of TLR1, TLR2, and TLR6 receptors in monocytes from patients with SZ and HCSs, an initial analysis was conducted without considering allele carriage (Figure 4). The protein expression analysis showed a significant decrease in TLR1 levels in monocytes from SZ patients compared to healthy controls ($p < 0.05$). However, no significant differences were found in the protein expression levels of TLR2 and TLR6 between the two groups (Figure 4).

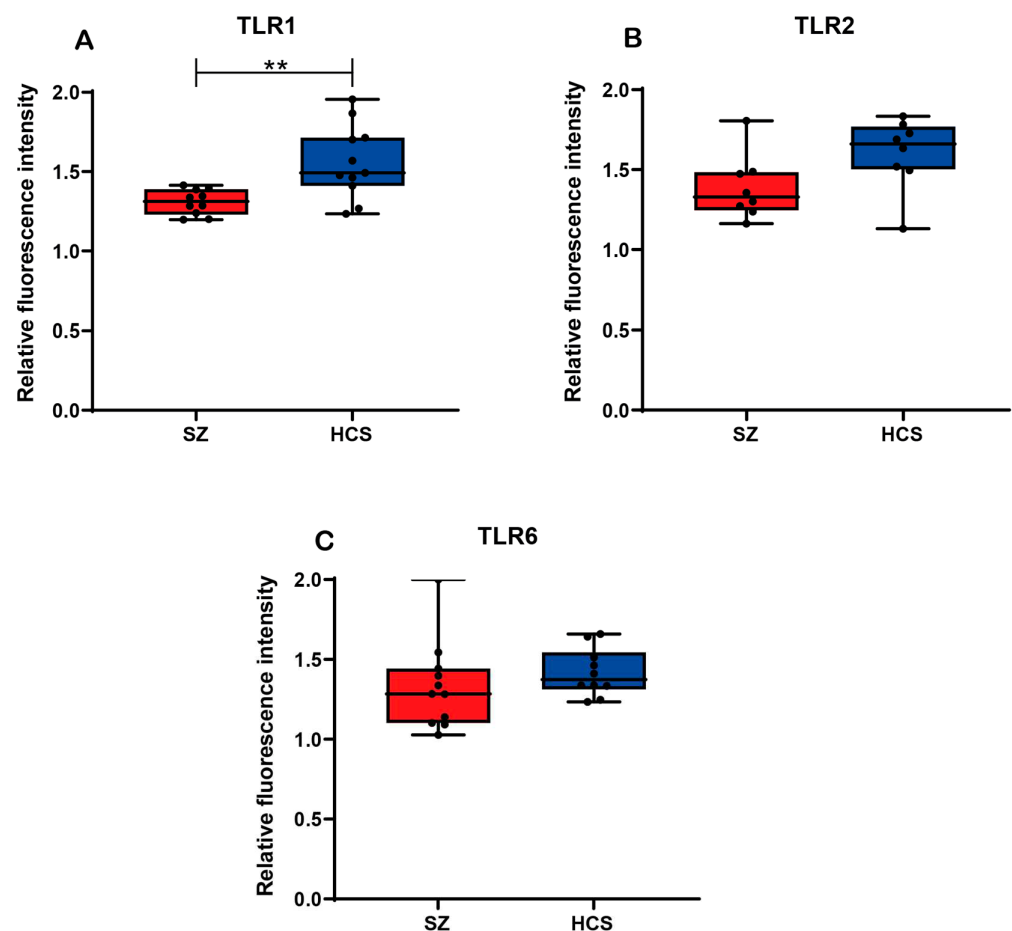


Figure 4. Relative fluorescence intensity of TLR1, TLR2, and TLR6 in monocytes from patients with SZ and HCSs. The relative protein expression of TLR was measured in peripheral blood monocytes via flow cytometry. (A) Comparison of protein expression of TLR1 in patients with SZ and HCSs. (B) Comparison of protein expression of TLR2 in patients with SZ and HCSs. (C) Comparison of protein expression of TLR6 in patients with SZ and HCSs. Data are presented as the mean $\pm$ SEM, and significant differences between groups are indicated (** $p < 0.05$).

Figure 5 illustrates the protein levels associated with TLR1, TLR2, and TLR6 genotypes in patients with SZ and HCSs. A significantly higher protein expression of TLR1 was observed in HCSs with the TT genotype compared to HCSs with the GG genotype of the rs4833093/*TLR1* variant ($p = 0.0021$). In contrast, patients carrying the TT genotype exhibited a decreased TLR1 protein expression compared to both HCSs with the TT genotype ($p < 0.0001$) and HCSs with the GG genotype ($p = 0.0007$).

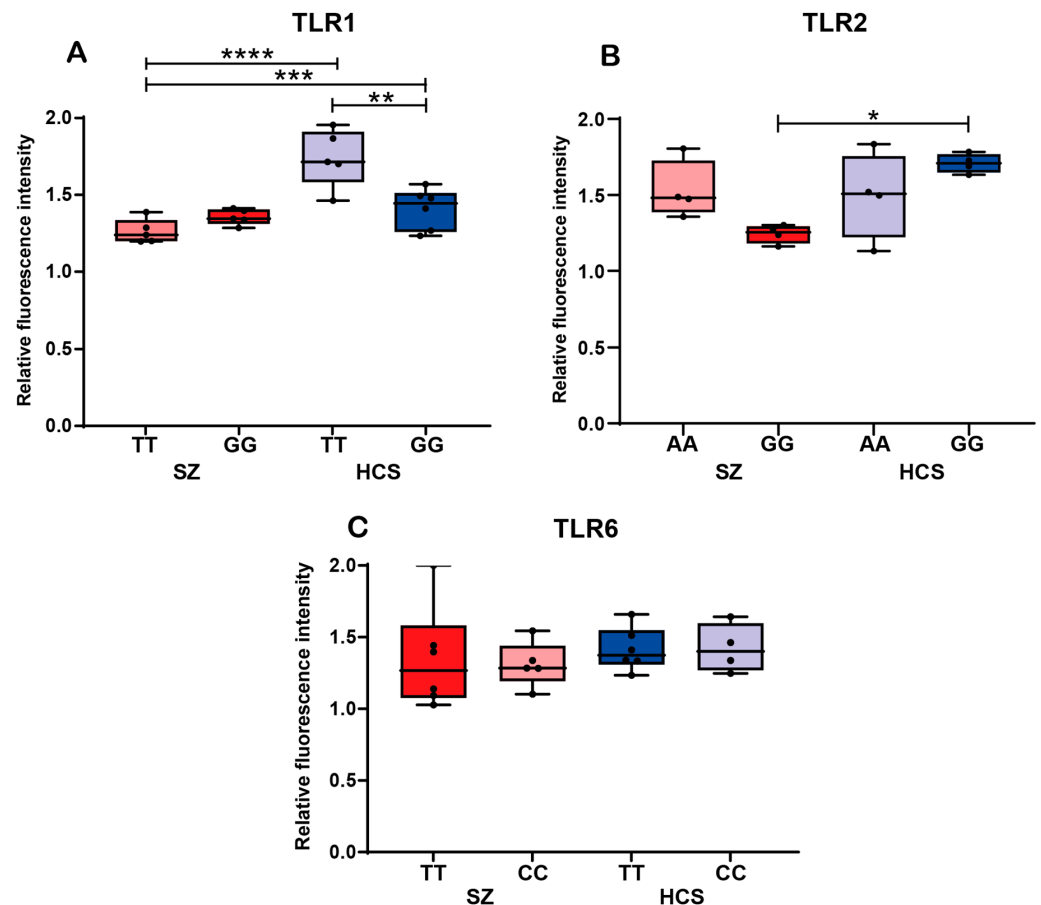


Figure 5. Protein expression of TLR1, TLR2, and TLR6 in monocytes of patients with schizophrenia and healthy controls carrying the genotypes of interest. The relative protein expression of TLR was measured in peripheral blood monocytes via flow cytometry. (A) TLR1 protein expression in monocytes from SZ and HCSs carrying different genotypes for the rs4833093 variant (** $p = 0.0021$, *** $p = 0.0007$, **** $p < 0.0001$). (B) TLR2 protein expression in monocytes from patients with SZ and HCSs carrying different genotypes for the rs5743709 variant (* $p < 0.014$). (C) TLR6 protein expression in monocytes from patients with SZ and HCSs carrying different genotypes for the rs3775073 variant.

TLR2 protein levels were significantly reduced in patients with the GG genotype compared to HCSs carrying the same rs5743709/TLR2 genotype ($p < 0.014$) (Figure 5B). However, no significant differences in TLR2 protein expression were observed between the other genotype groups. In contrast, TLR6 protein expression analysis across different rs3775073/TLR6 genotypes did not reveal any significant differences between comparison groups (Figure 5C).

2.5. Functional Evaluation of TLR2/TLR6 in Human Peripheral Blood Monocytes

A proteome array enabling the immunodetection of 105 analytes was used to identify the ligand-induced secretory profile of CD14⁺ monocytes from patients with SZ and HCSs (Figure 6A). Out of the 105 analytes, only 40 were detectable in the cell culture supernatants of both MALP2-stimulated (MALP2⁺) and unstimulated (MALP2⁻) monocytes. The sub-sample cluster analysis showed that MALP2⁻ monocytes from two controls (HCS1, HCS3) and two patients with SZ (SZ2, SZ3) formed a cluster characterized by a generally low immunoreactive signal compared to their corresponding MALP2⁺ stimulated samples (HCS1.s, HCS3.s, SZ2.s, SZ3.s; samples marked with *) showing an increment in the signal (Figure 6B). Interestingly, another cluster with a consistently low immunoreactive secretory signal was formed by HCS2, HCS2.s, SZ1, and SZ1.s. Additionally, the protein cluster analysis revealed two main groups (Figure 6B). Interestingly, the proteins whose levels

were significantly higher in patients with SZ (Angiopoietin 2, Serpin E1, uPAR, and IL-18; marked with ⁺) grouped together in the upper cluster analysis, whereas the proteins with significantly lower levels in SZ regarding the HCSs (myeloperoxidase, MIF, IL-17A, IL-24, and MCP-1; marked with [~]) were grouped together in the lower cluster (Figure 6B).

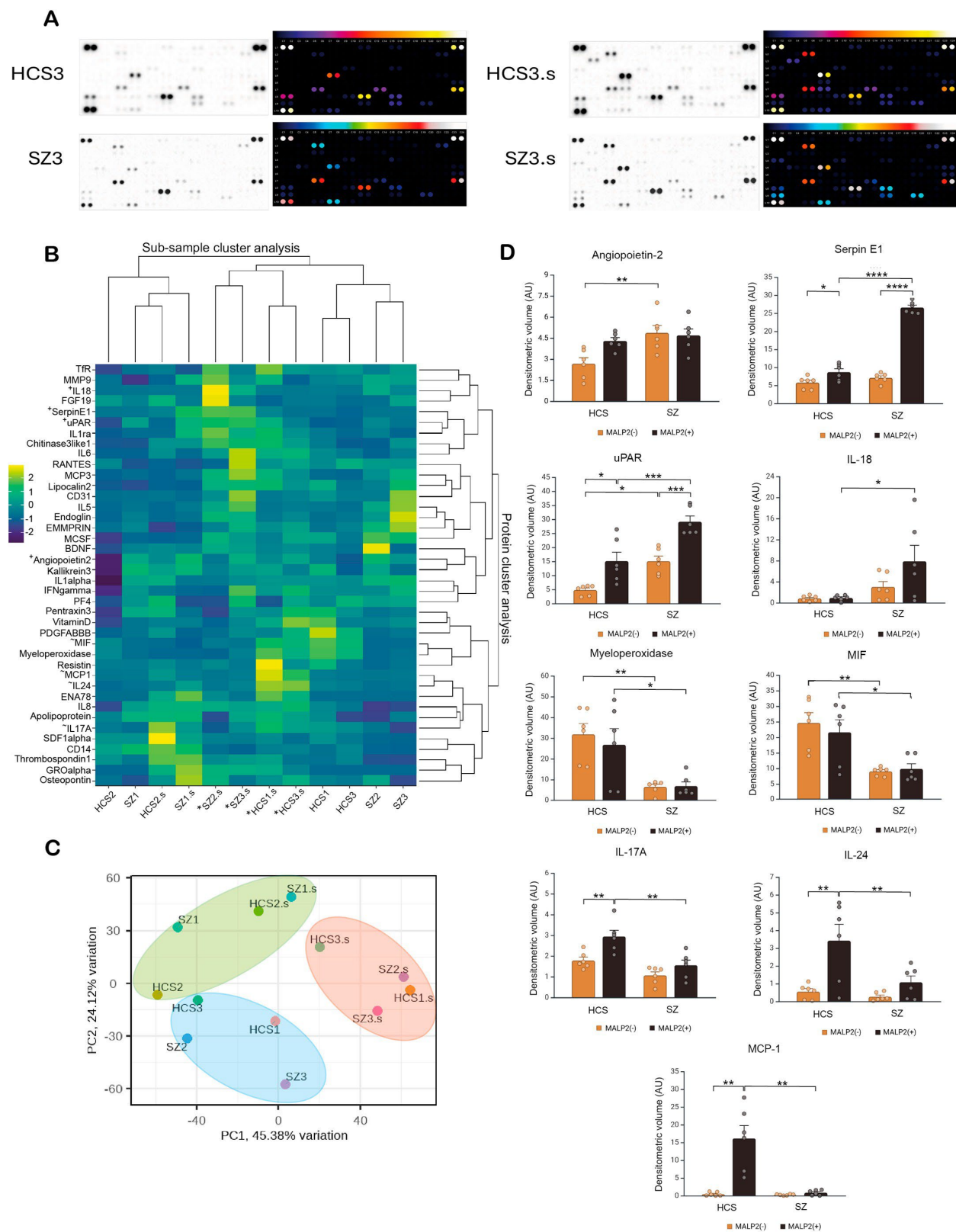


Figure 6. Exploratory data analysis of the secretory profile induced by TLR2/TLR6 ligand stimulation of CD14⁽⁺⁾-monocytes from patients with SZ and HCSs. Monocytes were incubated with 25 ng/mL

MALP2 or without this ligand (MALP2-) in a serum-free medium for 24 h, and the cultured supernatants were collected for further proteomic immunoassays. (A) Representative images of the immunoreactive spots detected in the proteomic arrays and their corresponding representation as densitometric heatmaps. (B) Cluster analysis heatmap that shows the subsample cluster analysis and the protein clustering analysis. (C) Principal component analysis (PCS) biplot indicating the distribution of the subject samples in the first two components, which explains 69.5% of the total variance. (D) Graphic representation of the densitometric volume of the immunoreactive spots, showing significant differences between the SZ and HCS samples. Data represents the mean + SEM; statistical differences were assessed by two-way ANOVA and Tukey post hoc test for multiple comparisons, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. HCS (healthy control subject), SZ (schizophrenia patient), macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP2).

The PCA (Figure 6C) showed us the same groups of HCS and SZ subjects that we obtained with the cluster analysis. Two principal components are represented in the biplot, explaining 69.5% of the total variance (PC1 45.38% and PC2 24.12%).

Panel D displays bar plots of the densitometric volume of immunoreactive spots for the nine proteins that showed significant differences between patients with SZ and HCSs. The immunoreactive signal for Angiopoietin 2 was higher in the supernatants of MALP2- monocytes from patients with SZ with no changes following MALP2 stimulation. Both serpin E1 and uPAR showed significantly higher densitometric volumes in MALP2+ cells, which were even higher in the supernatants of SZ regarding the HCS monocytes. Similarly, IL-18 levels were significantly elevated in MALP2+ monocytes from patients with SZ relative to HCSs under the same conditions. On the other hand, myeloperoxidase and MIF showed a significant reduction in SZ-derived monocyte supernatants regardless of MALP2 stimulation. Additionally, IL-17A, IL-24, and MCP-1 levels significantly increased in the supernatants of MALP2-stimulated HCS monocytes, but these signals were markedly reduced in SZ monocytes under the same conditions.

3. Discussion

Genetic association studies provide evidence of inflammatory-related genes in SZ [5,6,16]; however, the effect of the risk variants in the gene expression could provide additional information about their role in the development of SZ. The biological importance of these changes in the pathophysiology of SZ is unclear; therefore, we investigated the effect of three genetic variants previously associated with SZ, analyzing the gene expression levels in Mexican patients compared with a control group.

The analysis of clinical and demographic characteristics revealed that 96% of our patients were single. A lower marital rate has been observed among patients with this disorder, particularly among men [17]. Additionally, studies have reported that a stable marital status significantly enhances the quality of life in patients with schizophrenia [18]. It was also observed that patients with schizophrenia had a basic level of education and unemployment, which is a finding consistent with reports from other studies [19,20]. Schizophrenic patients tend to have lower educational attainment than the general population due to a combination of symptoms, including cognitive impairments such as memory, attention, and executive function deficits [21], which are characteristics that also impact getting a job [22]. Long-term employment is difficult for many individuals with schizophrenia due to employment discrimination and inadequate workplace support systems [23].

Our findings showed a decrease in the gene expression of *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* in patients compared to controls. Kozłowska et al. [15] reported alterations in the expression levels of the *TLR1–TLR9* genes in patients with SZ. However, this study was carried out

in a European population, and they only evaluated changes in the gene expression of the TLRs between patients with SZ and healthy subjects.

To our knowledge, this is the first study aimed at identifying the role of genotype carriage in gene expression among patients with SZ. Our focus was on individuals who had homozygous copies of each of the polymorphic variants. *TLR1* observed a decrease in gene expression in patients with the GG genotype compared to those with the TT genotype and the control groups with either the TT or GG genotypes. These findings suggest that carrying the GG genotype may be associated with reduced *TLR1* gene expression in patients with SZ.

Regarding *TLR2*, genotype carriage analysis revealed lower gene expression in patients with the AA genotype compared to AA controls. This difference in expression may be influenced by other genetic factors or the underlying disease itself. Finally, the analysis of *TLR6* gene expression revealed significant differences between the study groups. Notably, patients with schizophrenia (SZ) exhibited markedly lower *TLR6* expression levels compared to healthy control subjects (HCSs) independent of genotype. However, no significant differences were detected between patients or controls with the different genotypes. This suggests a potential dysregulation of *TLR6* in individuals with schizophrenia, further supporting the hypothesis that *TLR6* may play a role in the immune-related mechanisms underlying the disorder [15]. These findings emphasize the need for further investigation into how genotype-specific variations in *TLR6* expression contribute to the pathophysiology of schizophrenia.

To investigate the potential impact of rs4833093 polymorphism in *TLR1*, we employed the JASPAR database to analyze DNA-binding motifs [24]. Our analysis revealed that rs4833093 is located within a binding site for several transcription factors, including One Cut Homeobox 1 (ONECUT1), which is associated with nervous system development [25]; Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1), known for its role in immune response activation [26]; and Zinc Finger Protein 354A (ZNF354A), which facilitates DNA-binding transcription factor activity [27]. These findings suggest that the rs4833093/*TLR1* polymorphism could modify the binding affinity of these transcription factors, potentially altering *TLR1* gene expression levels.

It has been suggested that mRNA stability is affected by the number of optimal and non-optimal codons presented in a protein [28,29]. Genetic variants of *TLR2* and *TLR6* genes could be related to the mRNA stability, conferring a higher risk to developed SZ.

Regarding the analysis of *TLR1* protein expression in the total sample, a lower level of the receptor was observed in patients with SZ compared to healthy controls. This finding aligns with the decreased gene expression observed in our previous analysis, suggesting a potential relationship between reduced *TLR1* gene expression and lower protein levels in patients with SZ. In contrast, no significant differences were found in the protein expression of *TLR2* and *TLR6* between patients and controls.

To our knowledge, this is the first study to investigate the role of polymorphic variants and protein expression in patients with SZ. The analysis of *TLR1* protein expression, stratified by genotype, revealed a significant reduction in protein levels in patients with the TT genotype compared to TT and GG in controls. This finding suggests an association between *TLR1* genotype carriage and SZ. However, no relation was observed between *TLR1* gene expression levels and protein expression, indicating the possible involvement of post-transcriptional and/or post-translational modifications that influence the regulation of gene and protein expression.

The relationship between gene expression and protein expression is inherently complex and subject to regulation at multiple stages of the gene expression process. The lack of correlation between mRNA and protein levels observed in this study can be attributed to sev-

eral regulatory factors, including post-transcriptional, translational, and post-translational modifications.

Post-transcriptional regulation is a key determinant of protein levels [30]. After transcription, various regulatory mechanisms, such as microRNAs (miRNAs) and RNA-binding proteins, can bind to mRNA and modulate its stability or translational efficiency [31]. This can result in diminished protein production even in the presence of high mRNA levels. Furthermore, the alternative splicing of pre-mRNA can produce multiple isoforms with differing stability or functionality, further complicating the relationship between mRNA and protein levels [32]. The stability and degradation of mRNA are also important contributors to this discrepancy. mRNAs vary in their half-lives, with some undergoing rapid degradation while others persist longer within the cell, thereby affecting the total amount of protein synthesized. In addition, translational efficiency can be influenced by mRNA secondary structures, ribosomal availability, and other factors that impact the translation process [33].

Post-translational modifications (PTMs) also play a crucial role in regulating protein levels. Proteins may undergo a range of modifications after translation, such as phosphorylation, glycosylation, or ubiquitination, which can alter their stability, activity, or localization within the cell. These modifications may result in protein degradation or functional changes, reducing the detectable protein levels even if mRNA levels remain constant. Protein degradation pathways, particularly the ubiquitin–proteasome system, may further contribute to the observed discrepancies between mRNA and protein levels. Proteins marked for degradation may be rapidly removed from the cell, leading to reduced protein levels despite the continued presence of their corresponding mRNA transcripts [34].

In conclusion, the lack of correlation between mRNA and protein levels observed in this study likely reflects the influence of multiple regulatory layers, particularly post-transcriptional and post-translational modifications. These mechanisms highlight the complexity of gene expression, emphasizing that protein levels cannot always be directly inferred from mRNA levels. Therefore, it is essential to consider these regulatory mechanisms in future studies and investigate their role in the regulation of TLRs in patients with SZ.

The functional analysis of TLRs showed significant differences in expression profiles between patients with SZ and HCSs, which in turn may offer new insights into the underlying mechanisms of the disease and its response to immune-related receptor activation. Specifically, the hierarchical clustering of protein expression profiles revealed a distinction between the profiles of HCSs and patients with SZ. Notably, treatment with MALP2 seems to induce a marked shift in protein expression patterns in patients with SZ, suggesting a unique response to TLR activation, which may indicate an underlying immunological susceptibility.

Furthermore, principal component analysis (PCA) demonstrated a clear separation between the HCS and SZ groups, reflecting significant variability in protein expression profiles. The distinct clustering of HCS and SZ groups suggests that patients with SZ exhibit a unique proteomic profile. Moreover, MALP2 treatment intensifies the divergence between the groups, thereby indicating that this treatment exacerbates differences in protein expression, particularly in patients with SZ. However, partial overlap between the untreated HCS and SZ groups indicates that although there are baseline differences between the groups, MALP2 accentuates these distinctions. Additionally, the analysis of specific proteins further highlights the differences between the groups. In general, MALP2 treatment increases the levels of several inflammatory proteins, such as angiopoietin-2, Serpin E1, uPAR, and IL-18 in patients with SZ, suggesting an altered immune and inflammatory response.

The association of these molecules with inflammatory and tissue remodeling processes indicates that they may contribute to immune dysregulation in SZ, potentially influencing disease progression and symptomatology. For instance, angiopoietin-2, a key regulator of

angiogenesis and vascular remodeling, normally stabilizes blood vessels, but its overexpression can lead to increased vascular permeability and inflammation [35]. In the context of SZ, elevated angiopoietin-2 may contribute to blood–brain barrier dysfunction, allowing inflammatory cells and mediators to enter the brain [36]. This disruption, in turn, could exacerbate oxidative stress and neuroinflammation, which are processes implicated in SZ pathogenesis [37–40].

Similarly, Serpin E1, a plasminogen activator inhibitor, plays a crucial role in regulating fibrinolysis and extracellular matrix remodeling. Its elevation in patients with SZ may suggest increased tissue remodeling activity and an altered fibrinolytic response [41]. Moreover, Serpin E1 overexpression has been linked to neurodegenerative diseases and is thought to promote chronic inflammation [42,43]. As a result, elevated Serpin E1 levels in patients with SZ could contribute to sustained inflammation and neuronal damage, thereby exacerbating cognitive deficits and functional impairments in these patients.

In addition, uPAR, a receptor that regulates extracellular matrix degradation and cellular signaling, plays a role in cell migration and inflammatory responses. Increased uPAR levels in patients with SZ may indicate heightened immune cell activation, which could lead to chronic inflammation [44]. Moreover, uPAR is also involved in cell adhesion and synaptic plasticity, which are critical factors for neuronal connectivity and development [45]. Thus, the dysregulation of uPAR may contribute to the structural brain abnormalities observed in SZ, negatively impacting synaptic function and neural connectivity [46,47].

Likewise, IL-18, a pro-inflammatory cytokine, plays a central role in both innate and adaptive immune responses. It is known to activate NK cells and T-helper cells as well as promote the production of other pro-inflammatory cytokines [48]. Indeed, elevated IL-18 levels in patients with SZ suggest persistent immune activation, potentially fostering an inflammatory environment in the central nervous system [49]. Furthermore, this cytokine has been associated with oxidative stress and cellular damage, contributing to neuronal deterioration and synaptic dysfunction. Additionally, IL-18 is linked to mood disorders and cognitive dysfunction, which are common symptoms in SZ [50,51].

Taken together, the elevated levels of angiopoietin-2, Serpin E1, uPAR, and IL-18 may promote chronic inflammation, blood–brain barrier dysfunction, and neuronal damage, contributing to the neuroinflammation and cognitive decline characteristic of SZ.

On the other hand, a decreased expression of myeloperoxidase (MPO), MIF, IL-17A, IL-24, and MCP-1 was observed in patients with SZ compared to HCSs. MPO, an enzyme produced by neutrophils and macrophages, generates reactive oxygen species (ROS), which are crucial for pathogen defense but can cause tissue damage if overproduced [52]. Thus, reduced MPO levels in SZ may indicate a diminished inflammatory response capacity, which could have counterproductive effects on innate immune function. Additionally, since oxidative stress is a key factor in SZ pathology, lower MPO activity may be related to an altered redox balance in the brain, affecting neuronal metabolism and synaptic function [53].

Likewise, MIF, a cytokine with both pro-inflammatory and immune regulatory properties, stimulates the release of other pro-inflammatory cytokines and promotes macrophage survival [54]. In SZ, reduced MIF levels may reflect impaired macrophage activation and a diminished capacity to mount adequate inflammatory responses. This reduction could result in a less reactive cerebral environment, affecting processes such as neurogenesis and synaptic plasticity, which are essential for maintaining neuronal health [55].

Moreover, IL-17A, a cytokine produced by T-helper (Th17) cells, is essential for defense against bacterial and fungal infections and plays a key role in autoimmune inflammation [56]. Therefore, the reduction in IL-17A in patients with SZ may indicate decreased Th17 cell activation, suggesting possible immunosuppression or the dysregulation of specific inflammatory responses [57]. The decrease in IL-17A could also affect the blood–brain

barrier, as this cytokine facilitates immune cell migration into the brain [58], potentially limiting the brain's ability to respond to pathogenic challenges and contributing to neuroinflammatory dysfunction.

In addition, IL-24, a cytokine involved in apoptosis regulation and the inflammatory response, plays a role in tissue repair and remodeling and has immunomodulatory properties [59]. Reduced IL-24 expression in patients with SZ may indicate a decreased ability to repair damage and respond appropriately to inflammation. This reduction, in turn, could be related to the neurodegeneration observed in SZ, as IL-24 contributes to neuronal protection and regeneration [60]. Consequently, a lack of IL-24 could exacerbate the effects of other pro-inflammatory pathways, facilitating neuronal damage and altering synaptic functions.

Finally, MCP-1, a chemokine critical for recruiting monocytes and other immune cells to sites of inflammation, is also reduced in patients with SZ. This suggests that reduced immune cell recruitment to the brain may impair the central nervous system's ability to respond to pathological processes [61]. Lower MCP-1 activity could indicate an insufficient immune response, reducing the brain's capacity to clear damaged cells and respond to chronic inflammation [62]. Moreover, MCP-1 is associated with neurogenesis and synaptic plasticity, and its reduction may negatively impact the formation of new neuronal connections and the maintenance of the neuronal network [61–63].

Altogether, the decreased levels of MPO, MIF, IL-17A, IL-24, and MCP-1 in patients with SZ may impair the brain's ability to respond to damage and maintain neuronal homeostasis, thus exacerbating neurodegeneration and synaptic plasticity issues commonly seen in SZ. These findings underscore the importance of considering immune dysregulation in SZ and suggest that modulation of these inflammatory pathways could represent a potential therapeutic approach.

In conclusion, the results suggest that MALP2 has a more pronounced impact on protein expression in patients with SZ than in healthy controls. This may indicate that TLR activation contributes to SZ pathophysiology by exacerbating an altered inflammatory state. Thus, the modulation of these receptors could represent a potential therapeutic target in the treatment of SZ, and these findings highlight the importance of further studying the role of TLRs in this disease.

4. Materials and Methods

4.1. Sample

The sample comprised twenty-four patients diagnosed with schizophrenia according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5 (DSM-5) criteria using the Spanish version of the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI-5).

Inclusion criteria were patients who were 18 years or older, had no chronic immunologic diseases, and did not have a first- or second-degree family member participating in the study. The patients were recruited from the Schizophrenia Clinic of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz in Mexico City. The exclusion criteria were active infection at the time of blood sampling, patients diagnosed with an autoimmune or chronic inflammatory disease, and patients who have been on non-steroidal or steroidal anti-inflammatory drugs for at least a week. The control group consisted of twenty-four participants who were not diagnosed with a psychiatric disorder, without a family history of psychiatric disorders, and did not have a first- or second-degree family member participating in the study. Exclusion criteria included subjects with an active infection at the time of blood sampling, subjects diagnosed with an autoimmune or chronic inflammatory disease, and subjects in treatment with non-steroidal or steroidal anti-inflammatory drugs for at least one week.

The forty-eight subjects consisted of 8 homozygous individuals (4 patients with schizophrenia and 4 controls) for the two alleles of each gene variant. All participants were Mexican with a family background generation of at least three generations born in Mexico.

The Alcohol, Smoking, and Substance Involvement Screening Test (ASSIST), developed by the World Health Organization ASSIST Working Group [64], was used to evaluate both the lifetime and recent (past 3 months) use of 10 substances as well as symptoms of abuse and dependence in patients and controls. All substances analyzed by the ASSIST were assessed in this study. However, among the substances evaluated, alcohol and tobacco were the only ones reported as consumed by patients within the past 3 months.

4.2. Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Venous blood samples (15 mL) were obtained in Vacutainer™ tubes with EDTA. All tubes were identified with a numerical code to protect the identity of the participants. The isolation of PBMCs was performed by the density gradient centrifugation method according to Fuss et al. [65]. Briefly, blood samples were centrifuged for 15 min at $2000\times g$ at room temperature (RT) to obtain a leukocyte-enriched buffy coat. The buffy coat was collected and resuspended with 10 mL of Hank's Balanced Saline Solution (HBSS). Leukocyte-enriched suspension was slowly layered over Ficoll-Hypaque® solution (3 mL of Ficoll-Hypaque® per 9 mL cell suspension) and centrifuged for 30 min at $900\times g$, RT. The PBMCs-enriched interphase was transferred to another conic tube, washed twice, and centrifuged for 10 min at $600\times g$, RT, for platelet depletion. Cell count was performed with a hemocytometer, and cell viability was determined by trypan blue exclusion.

4.3. Positive Selection of CD14⁺ Cells with MACS® Technology

CD14⁺ monocytes were enriched from human PBMCs using a positive selection protocol with the MACS® system according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly, PBMCs were incubated with CD14⁺ magnetic beads (Cat. 130117337; $20\ \mu\text{L}/10^7$ cells, 2–4 °C for 15 min); then, while the magnetic column was attached to the magnet, the cell suspension passed through the LS column (130042401, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for monocyte sorting by positive selection. The monocyte-depleted cell suspension was used to perform the genotyping of the variants of interest. Then, the column was detached from the magnet, and the CD14⁺-monocytes-enriched cell suspension was eluted with the plunger. Cell count was performed with a hemocytometer, and cell viability was determined by trypan blue exclusion.

4.4. Immunofluorescent Detection of CD14, TLR1, TLR2 and TLR6

Immediately after MACS® column elution, the cell suspension enriched in CD14⁺-monocytes was washed twice with HBSS and finally resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, $1\times$ GlutaMAX, $1\times$ penicillin-streptomycin, and then plated into 12 mm round glass coverslips at 25,000 cells/well in 4-well culture plates. Cells were incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂, with a humid atmosphere. After incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and washed twice with TBS. Blocking was performed with 10% donkey serum, 0.3 M glycine, and 0.05% Tween 20 in TBS for 30 min. TLRs were detected by indirect fluorescence using the following primary antibodies: rabbit anti-TLR1 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA. NB100-56563), mouse anti-TLR2 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA. NB100-56722) and rabbit anti-TLR6 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA. NBP1-76664), all diluted 1:200 in 1% donkey serum, 0.05% Tween20 in TBS, overnight, at 4 °C in a humid chamber protected from light. After washing 4 times with TTBS (0.1%), cells were incubated with the corresponding secondary antibodies, i.e., Alexa Fluor® 647-conjugated donkey

anti-rabbit IgG (Abcam ab150075, Cambridge, UK; dilution 1:1000) and Alexa Fluor® 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch 715-545-150, West Grove, PA, USA; dilution 1:800) in TTBS for 1 h at room temperature and protected from light. CD14 was detected by direct immunofluorescence using an R-PE-conjugated anti-human CD14 (Life Technologies MHCD1404, Thermo Fisher, ScientificWaltham, MA, USA), which was diluted 1:150. After extensive washing, 1 µM DAPI was added for 10 min for nuclei counterstaining, washed with deionized water, and finally, coverslips were mounted with CitiFluor® (Hatfield, PA, USA) for further image acquisition. Images were acquired with an LSM-900 confocal microscope with Airyscan (ZEISS) and analyzed with FIJI Image J version 2.9.0 (NIH Image J, Bethesda, MD, USA).

4.5. Flow Cytometry Analysis

To evaluate the protein expression of TLR1, 2, and 6 in monocytes from patients and healthy controls, an analysis by flow cytometry was performed. First, 4.5×10^6 CD14⁺-monocytes were fixed with 4% paraformaldehyde and resuspended in PBS. Subsequently, indirect immunofluorescence was performed for either TLR1/AF647 (NB100-56563; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), TLR2/AF488 (NB100-56722; Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), or TLR6/AF647 (NBP1-76664; NBP1-76664) for 30 min. CD14/PE antibody (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, MHCD1404) was incubated for 30 min. Cells were analyzed using the Attune flow cytometer (Thermo Fisher, ScientificWaltham, MA, USA), and data were analyzed with the WinList™ software package version 10.1.

4.6. RNA Extraction, cDNA Obtention, and Quantitative Analysis by PCR

Total RNA was extracted from monocytes using TRIzol™ (Roche; Germany) reagent, following the manufacturer's instructions. The first-strand cDNA was synthesized with SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in three technical replicates per sample using 500 ng of total RNA. The expression assay was assessed with TaqMan probes for *TLR1* (Hs00413978_m1), *TLR2* (Hs02621280_s1), *TLR6* (Hs00271977_s1) and *ACTB* (Hs99999903_m1) as housekeeping gene, using the ABI Prism®7500 Sequence Detection System according to the manufacturer's protocols (Applied Biosystems Inc.; Foster City, CA, USA). The PCR reaction was performed in a 10 µL reaction volume, consisting of 500 ng of cDNA, 1× TaqMan Universal Master Mix II and 0.5× of TaqMan Gene Expression Assay. cDNA was amplified for 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

4.7. Assessment of TLRs Function: Analysis of Ligand-Induced Secretory Profile

To conduct an exploratory analysis of TLR function, we randomly selected a subsample consisting of three patients and three controls for proteomic analysis of the ligand-stimulated secreted molecules. Two culture dishes per individual were prepared, each containing 2.25×10^6 monocytes. The cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1× GlutaMAX, and 1× penicillin-streptomycin. The cultures were incubated overnight at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After total culture medium change for serum-free medium, one of the dishes was stimulated with 25 ng/mL of macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2) (Novus Biologicals, NBP2-26219, Centennial, CO, USA), a specific ligand for the heterodimer TLR2/TLR6, while the other dish served as an unstimulated control sample. After incubation for 24 h, supernatants were collected and stored at −20 °C until further analysis. The total protein in the supernatants was determined with the BCA Protein Assay kit (Pierce, Appleton, WI, USA) as recommended by the manufacturer. The culture supernatants (500 µg of protein per sample) were assayed to immunodetect the monocyte-secreted factors using the Proteome Profiler™ Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA),

following the protocol provided by the manufacturer. The volumetric densitometry of the immunoreactive spots was determined with the FIJI/ImageJ software version 2.9.0 (Bethesda, MD, USA). The data were normalized by subtracting the densitometric volume of the negative control spots and expressed as a percentage of the densitometric volume of the positive control spots of the immunoarray.

4.8. Statistical Analyses

The demographic and clinical characteristics of patients and controls were analyzed using Student's *t*-test for continuous variables such as age, body mass index, and blood pressure. Additionally, the chi-square test was employed for categorical variables, including sex, marital status, level of education, employment status, and substance use. An additional analysis was performed to assess the potential confounding effects for evaluating their association between tobacco and alcohol use in cases and controls. Also, we evaluated the variables' confusers, such as tobacco and alcohol use, age of onset, age of diagnosis, and pharmacological treatments in cases stratified by the carriage of the alleles. No significant differences were observed, confirming that these variables do not act as confounding factors in the study.

The gene expression analysis was performed using GraphPad Prism software version 5.0.0 [66]. Cycle threshold values were averaged, and relative *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* gene expression levels were determined using the comparative cycle threshold method [67]. The expression data were normalized using a Q-Q plot analysis to assess the distribution of the data. Differences between the *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* expression of patients and controls were calculated using a *t*-test. All the results were normalized to *ACTB*. Changes in gene expression in relationship to the allelic carriage were analyzed using ANOVA and Tukey's multiple comparison post hoc test. The amount of relative fluorescence of *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* from the flow cytometry analysis between patients and controls was calculated. ANOVA and Tukey's multiple comparison post hoc tests were analyzed to evaluate differences in relative fluorescence in relation to the allelic carriage in patients and controls.

A heatmap and a PCA were created for the exploratory data analysis of the secretory profiles. The first approach to the experimental values was a heatmap scaled by row (z scale for each variable) and non-directed classification dendrograms. Each column represented a different subject with or without treatment. The other form of visualization was with the biplot derived from the PCA method. With this approach, the first two components were used to explain our data variability. The heatmap was assessed using the library heatmaply ver. 1.4.0 and the PCA approach with the library PCA tools ver. 2.16.0. all within the R version 4.4.1 software package.

5. Conclusions

This study provides new insights into the role of *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* genetic variants in the regulation of gene and protein expression in Mexican patients with SZ. Our findings demonstrate a significant reduction in the gene expression of *TLR1*, *TLR2* and *TLR6* in patients with SZ compared to HCSs, suggesting that TLRs play an important role in the pathophysiology of SZ. Specifically, the rs4833093 polymorphism in *TLR1* might alter transcription factor binding, potentially affecting gene expression and contributing to the immune dysregulation observed in SZ. At the protein level, *TLR1* expression was reduced in patients with SZ, particularly among those carrying the TT genotype. However, this reduction in protein levels did not correlate directly with mRNA expression, highlighting the complex regulatory mechanisms involved, including post-transcriptional and post-translational modifications. *TLR2* and *TLR6* protein expression did not show significant

differences between patients and controls, underscoring the need for further investigation into the influence of these genes on SZ pathogenesis.

Additionally, the analysis of inflammatory protein profiles revealed altered immune responses in SZ patients supporting the hypothesis of immune dysfunction in this disorder. Treatment with MALP2 exacerbated these differences, suggesting that TLR activation may contribute to the unique immunological landscape of SZ.

In conclusion, our findings emphasize the importance of *TLR* gene variants in modulating immune responses in SZ, providing a potential avenue for future therapeutic interventions targeting immune dysregulation in this disorder. Further studies are needed to explore the precise mechanisms through which these TLRs contribute to the etiology of SZ.

Author Contributions: Conceptualization, C.E.S.-R., M.V.-T. and B.C.; methodology, C.E.S.-R., M.V.-T., J.U.Z.-H. and L.O.-L.; validation, C.E.S.-R., J.U.Z.-H. and L.O.-L.; formal analysis, C.E.S.-R., M.V.-T. and J.A.; investigation, C.E.S.-R., M.V.-T. and B.C.; resources, M.R.-V., M.V.-T. and B.C.; writing—original draft preparation, C.E.S.-R.; writing—review and editing, M.V.-T. and B.C.; visualization, C.E.S.-R.; supervision, M.V.-T., R.U.M.-L. and B.C.; project administration, M.V.-T., R.U.M.-L. and B.C.; funding acquisition, M.V.-T. and B.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, grant number 287115-CB2016 to M.V.-T., and Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz to B.C.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (Approval No. CEI/C/017/2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

Acknowledgments: This work was supported by Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología Scholarship (No. 926391) to Carlo E. Sotelo Ramírez. We thank all the participants of this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. McCutcheon, R.A.; Marques, T.R.; Howes, O.D. Schizophrenia-An Overview. *JAMA Psychiatry* **2020**, *77*, 201–210. [[CrossRef](#)]
2. Charlson, F.J.; Ferrari, A.J.; Santomauro, D.F.; Diminic, S.; Stockings, E.; Scott, J.G.; McGrath, J.J.; A Whiteford, H. Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016. *Schizophr. Bull.* **2018**, *44*, 1195–1203. [[CrossRef](#)]
3. Benros, M.E.; Nielsen, P.R.; Nordentoft, M.; Eaton, W.W.; Dalton, S.O.; Mortensen, P.B. Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for schizophrenia: A 30-year population-based register study. *Am. J. Psychiatry* **2011**, *168*, 1303–1310. [[CrossRef](#)]
4. Corvin, A.; Morris, D.W. Genome-wide association studies: Findings at the major histocompatibility complex locus in psychosis. *Biol. Psychiatry* **2014**, *75*, 276–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pouget, J.G.; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; Han, B.; Wu, Y.; Mignot, E.; Ollila, H.M.; Barker, J.; Spain, S.; Dand, N.; Trembath, R.; et al. Cross-disorder analysis of schizophrenia and 19 immune-mediated diseases identifies shared genetic risk. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 3498–3513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **2014**, *511*, 421–427. [[CrossRef](#)]
7. Shi, J.; Levinson, D.; Duan, J.; Sanders, A.R.; Zheng, Y.; Pe'er, I.; Dudbridge, F.; Holmans, P.A.; Whittemore, A.S.; Mowry, B.J.; et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* **2009**, *460*, 753–757. [[CrossRef](#)]
8. Lin, J.R.; Cai, Y.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Nogales-Cadenas, R.; Zhang, Z.D. Integrated Post-GWAS Analysis Sheds New Light on the Disease Mechanisms of Schizophrenia. *Genetics* **2016**, *204*, 1587–1600. [[CrossRef](#)]

9. Chen, C.Y.; Shih, Y.C.; Hung, Y.F.; Hsueh, Y.P. Beyond defense: Regulation of neuronal morphogenesis and brain functions via Toll-like receptors. *J. Biomed. Sci.* **2019**, *26*, 90. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Park, S.; Lee, J.; Kim, S.; Choi, S.-Y.; Yune, T.Y.; Ryu, J.H. Toll-like receptor-2 deficiency induces schizophrenia-like behaviors in mice. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8502. [\[CrossRef\]](#)
11. Khandaker, G.M.; Dantzer, R.; Jones, P.B. Immunopsychiatry: Important facts. *Psychol. Med.* **2017**, *47*, 2229–2237. [\[CrossRef\]](#)
12. Goldsmith, D.R.; Rapaport, M.H.; Miller, B.J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: Comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Mol. Psychiatry* **2016**, *21*, 1696–1709. [\[CrossRef\]](#)
13. Fond, G.; Lançon, C.; Korchia, T.; Auquier, P.; Boyer, L. The Role of Inflammation in the Treatment of Schizophrenia. *Front. Psychiatry* **2020**, *11*, 160. [\[CrossRef\]](#)
14. García-Bueno, B.; Gassó, P.; MacDowell, K.S.; Callado, L.F.; Mas, S.; Bernardo, M.; Lafuente, A.; Meana, J.J.; Leza, J.C. Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 proinflammatory pathway in patients with schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* **2016**, *41*, E46–E55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Kozłowska, E.; Agier, J.; Wysokiński, A.; Łucka, A.; Sobierajska, K.; Brzezińska-Błaszczyk, E. The expression of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells is altered in schizophrenia. *Psychiatry Res.* **2019**, *272*, 540–550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Sotelo-Ramírez, C.E.; Camarena, B.; Sanabrais-Jiménez, M.A.; Zaragoza-Hoyos, J.U.; Ordoñez-Martínez, B.; Escamilla-Orozco, R.; Gómez-González, B. Toll-Like Receptor (TLR) 1, 2, and 6 Gene Polymorphisms Support Evidence of Innate Immune Factors in Schizophrenia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2023**, *19*, 2353–2361. [\[CrossRef\]](#)
17. Thara, R.; Srinivasan, T.N. Outcome of marriage in schizophrenia. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* **1997**, *32*, 416–420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Nyer, M.; Kasckow, J.; Fellows, I.; Lawrence, E.C.; Golshan, S.; Solorzano, E.; Zisook, S. The relationship of marital status and clinical characteristics in middle-aged and older patients with schizophrenia and depressive symptoms. *Ann. Clin. Psychiatry* **2010**, *22*, 172–179.
19. Tesli, M.; Degerud, E.; Plana-Ripoll, O.; Gustavson, K.; Torvik, F.A.; Ystrom, E.; Ask, H.; Tesli, N.; Høye, A.; Stoltenberg, C.; et al. Educational attainment and mortality in schizophrenia. *Acta Psychiatr. Scand.* **2022**, *145*, 481–493. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Cano-Ramirez, H.; Diaz-Castro, L.; Hoffman, K.L. Analysis of Educational Attainment in a Mexican Psychiatric Patient Population with Bipolar or Psychotic Disorders. *Brain Sci.* **2023**, *13*, 881. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Harvey, P.D.; Keefe, R.S. Studies of cognitive impairment in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **2001**, *27*, 459–476. [\[CrossRef\]](#)
22. Chong, S.A.; Subramaniam, M.; Lee, I.M.; Pek, E.; Cheok, C.; Verma, S. Academic attainment: A predictor of psychiatric disorders? *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* **2009**, *44*, 999–1003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Marwaha, S.; Johnson, S. Schizophrenia and employment—A review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* **2004**, *39*, 337–349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Castro-Mondragon, J.A.; Riudavets-Puig, R.; Rauluseviciute, I.; Lemma, R.B.; Turchi, L.; Blanc-Mathieu, R.; Lucas, J.; Boddie, P.; Khan, A.; Pérez, N.M.; et al. JASPAR: The 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D165–D173. [\[CrossRef\]](#)
25. Goetz, J.J.; Martin, G.M.; Chowdhury, R.; Trimarchi, J.M. Onecut1 and Onecut2 play critical roles in the development of the mouse retina. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110194, reprinted in *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115786. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Wang, J.; Li, H.; Xue, B.; Deng, R.; Huang, X.; Xu, Y.; Chen, S.; Tian, R.; Wang, X.; Xun, Z.; et al. IRF1 Promotes the Innate Immune Response to Viral Infection by Enhancing the Activation of IRF3. *J. Virol.* **2020**, *94*, e01231–20. [\[CrossRef\]](#)
27. Squassina, A.; Meloni, A.; Chillotti, C.; Pisanu, C. Zinc finger proteins in psychiatric disorders and response to psychotropic medications. *Psychiatr. Genet.* **2019**, *29*, 132–141. [\[CrossRef\]](#)
28. Presnyak, V.; Alhusaini, N.; Chen, Y.H.; Martin, S.; Morris, N.; Kline, N.; Olson, S.; Weinberg, D.; Baker, K.E.; Graveley, B.R.; et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* **2015**, *160*, 1111–1124. [\[CrossRef\]](#)
29. Forrest, M.E.; Pinkard, O.; Martin, S.; Sweet, T.J.; Hanson, G.; Collier, J. Codon and amino acid content are associated with mRNA stability in mammalian cells. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0228730. [\[CrossRef\]](#)
30. McManus, J.; Cheng, Z.; Vogel, C. Next-generation analysis of gene expression regulation—comparing the roles of synthesis and degradation. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 2680–2689. [\[CrossRef\]](#)
31. Jiang, P.; Collier, H. Functional interactions between microRNAs and RNA binding proteins. *Microna* **2012**, *1*, 70–79. [\[CrossRef\]](#)
32. Mockenhaupt, S.; Makeyev, E.V. Non-coding functions of alternative pre-mRNA splicing in development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *47–48*, 32–39. [\[CrossRef\]](#)
33. Eisen, T.J.; Eichhorn, S.W.; Subtelny, A.O.; Lin, K.S.; McGeary, S.E.; Gupta, S.; Bartel, D.P. The Dynamics of Cytoplasmic mRNA Metabolism. *Mol. Cell* **2020**, *77*, 786–799. [\[CrossRef\]](#)
34. Liu, Y.; Elmas, A.; Huang, K.L. Mutation Impact on mRNA Versus Protein Expression across Human Cancers. *arXiv* **2023**, arXiv:2023.11.13.566942. [\[CrossRef\]](#)

35. Li, Z.; Korhonen, E.A.; Merlini, A.; Strauss, J.; Wihuri, E.; Nurmi, H.; Antila, S.; Paech, J.; Deutsch, U.; Engelhardt, B.; et al. Angiopoietin-2 blockade ameliorates autoimmune neuroinflammation by inhibiting leukocyte recruitment into the CNS. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 1977–1990. [\[CrossRef\]](#)
36. Gurnik, S.; Devraj, K.; Macas, J.; Yamaji, M.; Starke, J.; Scholz, A.; Sommer, K.; Di Tacchio, M.; Vutukuri, R.; Beck, H.; et al. Angiopoietin-2-induced blood-brain barrier compromise and increased stroke size are rescued by VE-PTP-dependent restoration of Tie2 signaling. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 753–773. [\[CrossRef\]](#)
37. Bošković, M.; Vovk, T.; Kores Plesničar, B.; Grabnar, I. Oxidative stress in schizophrenia. *Curr. Neuropsychopharmacol.* **2011**, *9*, 301–312. [\[CrossRef\]](#)
38. Bitanhirwe, B.K.; Woo, T.U. Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, *35*, 878–893. [\[CrossRef\]](#)
39. Vallée, A. Neuroinflammation in Schizophrenia: The Key Role of the WNT/ β -Catenin Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2810. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Chaves, C.; Dursun, S.M.; Tusconi, M.; Hallak, J.E.C. Neuroinflammation and schizophrenia – Is there a link? *Front. Psychiatry* **2024**, *15*, 1356975. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Hoirisch-Clapauch, S.; Amaral, O.B.; Mezzasalma, M.A.; Panizzutti, R.; Nardi, A.E. Dysfunction in the coagulation system and schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **2016**, *6*, e704. [\[CrossRef\]](#)
42. Kutz, S.M.; Higgins, C.E.; Higgins, P.J. Novel Combinatorial Therapeutic Targeting of PAI-1 (SERPINE1) Gene Expression in Alzheimer's Disease. *Mol. Med. Ther.* **2012**, *1*, 106. [\[CrossRef\]](#)
43. Jeffries, C.D.; Perkins, D.O.; Fournier, M.; Do, K.Q.; Cuenod, M.; Khadimallah, I.; Domenici, E.; Addington, J.; Bearden, C.E.; Cadenhead, K.S.; et al. Networks of blood proteins in the neuroimmunology of schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **2018**, *8*, 112. [\[CrossRef\]](#)
44. Rasmussen, L.J.H.; Petersen, J.E.V.; Eugen-Olsen, J. Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) as a Biomarker of Systemic Chronic Inflammation. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 780641. [\[CrossRef\]](#)
45. Bigseth, T.T.; Engh, J.A.; Egeland, J.; Andersen, E.; Andreassen, O.A.; Bang-Kittilsen, G.; Falk, R.S.; Holmen, T.L.; Lindberg, M.; Mordal, J.; et al. Exploring low grade inflammation by soluble urokinase plasminogen activator receptor levels in schizophrenia: A sex-dependent association with depressive symptoms. *BMC Psychiatry* **2021**, *21*, 527. [\[CrossRef\]](#)
46. Karlsgodt, K.H.; Sun, D.; Cannon, T.D. Structural and Functional Brain Abnormalities in Schizophrenia. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* **2010**, *19*, 226–231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Staal, W.G.; Pol, H.E.H.; Schnack, H.G.; Hoogendoorn, M.L.; Jellema, K.; Kahn, R.S. Structural brain abnormalities in patients with schizophrenia and their healthy siblings. *Am. J. Psychiatry* **2000**, *157*, 416–421. [\[CrossRef\]](#)
48. Ihim, S.A.; Abubakar, S.D.; Zian, Z.; Sasaki, T.; Saffarioun, M.; Maleknia, S.; Azizi, G. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 919973. [\[CrossRef\]](#)
49. Szabo, A.; O'Connell, K.S.; Ueland, T.; Sheikh, M.A.; Agartz, I.; Andreou, D.; Aukrust, P.; Boye, B.; Bøen, E.; Drange, O.K.; et al. Increased circulating IL-18 levels in severe mental disorders indicate systemic inflammasome activation. *Brain Behav. Immun.* **2022**, *99*, 299–306. [\[CrossRef\]](#)
50. Guan, X.; Leng, W.; Hu, Q.; Xiu, M.; Zhang, X. Association between cognitive function and IL-18 levels in schizophrenia: Dependent on IL18–607 A/C polymorphism. *Psychoneuroendocrinology* **2023**, *158*, 106386. [\[CrossRef\]](#)
51. Ojala, J.O.; Sutinen, E.M. The Role of Interleukin-18, Oxidative Stress and Metabolic Syndrome in Alzheimer's Disease. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 55. [\[CrossRef\]](#)
52. Frangie, C.; Daher, J. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). *Biomed. Rep.* **2022**, *16*, 53. [\[CrossRef\]](#)
53. Mosyagin, I.; Dettling, M.; Roots, I.; Mueller-Oerlinghausen, B.; Cascorbi, I. Impact of myeloperoxidase and NADPH-oxidase polymorphisms in drug-induced agranulocytosis. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2004**, *24*, 613–617. [\[CrossRef\]](#)
54. Bloom, J.; Sun, S.; Al-Abed, Y. MIF, a controversial cytokine: A review of structural features, challenges, and opportunities for drug development. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 1463–1475. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Okazaki, S.; Hishimoto, A.; Otsuka, I.; Watanabe, Y.; Numata, S.; Boku, S.; Shimmyo, N.; Kinoshita, M.; Inoue, E.; Ohmori, T.; et al. Increased serum levels and promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2018**, *83*, 33–41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. McGeachy, M.J.; Cua, D.J.; Gaffen, S.L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity* **2019**, *50*, 892–906. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Chenniappan, R.; Nandeesha, H.; Kattimani, S.; Nanjaiah, N.D. Interleukin-17 and Interleukin-10 Association with Disease Progression in Schizophrenia. *Ann. Neurosci.* **2020**, *27*, 24–28. [\[CrossRef\]](#)
58. Huppert, J.; Closhen, D.; Croxford, A.; White, R.; Kulig, P.; Pietrowski, E.; Bechmann, I.; Becher, B.; Luhmann, H.J.; Waisman, A.; et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* **2010**, *24*, 1023–1034. [\[CrossRef\]](#)
59. Wang, M.; Liang, P. Interleukin-24 and its receptors. *Immunology* **2005**, *114*, 166–170. [\[CrossRef\]](#)

60. Stone, W.S.; Phillips, M.R.; Yang, L.H.; Kegeles, L.S.; Susser, E.S.; Lieberman, J.A. Neurodegenerative model of schizophrenia: Growing evidence to support a revisit. *Schizophr. Res.* **2022**, *243*, 154–162. [[CrossRef](#)]
61. Deshmane, S.L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **2009**, *29*, 313–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Saoud, H.; Inoubli, O.; Ben Fredj, S.; Hassine, M.; Ben Mohamed, B.; Gaha, L.; Jrad, B.B.H. Protective Effect of the MCP-1 Gene Haplotype against Schizophrenia. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 4042615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Widera, D.; Holtkamp, W.; Entschladen, F.; Niggemann, B.; Zänker, K.; Kaltschmidt, B.; Kaltschmidt, C. MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 381–387. [[CrossRef](#)]
64. World Health Organisation ASSIST Working Group. The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): Development, reliability, and feasibility. *Addiction* **2002**, *97*, 1183–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Fuss, I.J.; Kanof, M.E.; Smith, P.D.; Zola, H. Isolation of whole mononuclear Cells from peripheral blood and cord blood. *Curr. Protoc. Immunol.* **2009**, *85*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. GraphPad Prism (Version 5). La Jolla, CA: GraphPad Software, Inc. Available online: <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/> (accessed on 15 August 2022).
67. Rao, X.; Huang, X.; Zhou, Z.; Lin, X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.* **2013**, *3*, 71–85. [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Análisis molecular de TLR1, TLR2 y TLR6 en monocitos de sangre periférica de pacientes con esquizofrenia.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 31 del mes de marzo del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DR. JOSE DE JESUS ARGUETA DONOHUE
DR. RAUL IVAN ESCAMILLA OROZCO
DRA. MARCELA VALDES TOVAR




CARLO ESTEBAN SOTELO RAMIREZ
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaría la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: CARLO ESTEBAN SOTELO RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. JOSE DE JESUS ARGUETA DONOHUE

VOCAL

DR. RAUL IVAN ESCAMILLA OROZCO

SECRETARIA

DRA. MARCELA VALDES TOVAR