

La unión de la 3H-espiperona a linfocitos en pacientes con esquizofrenia y familiares de primer grado: en busca de un marcador genético

Gerardo Heinze,* Gloria Benítez King,* Lourdes Huerto,* Héctor Ortega,* José Cortés* y Jaime Raull Ariza*

Resumen

Se ha estudiado y propuesto la unión de la 3H-espiperona como un marcador de vulnerabilidad para ciertos subgrupos de esquizofrenia. Se estudió la unión 3H-espiperona a linfocitos en 22 esquizofrénicos, 19 familiares sin sintomatología clínica así como ocho voluntarios sanos. Para el ensayo de unión se incubaron los linfocitos con 3H-espiperona (0.04 a 0.4 mM). La unión inespecífica se terminó en presencia de 10 mM. Al final los linfocitos fueron homogenizados. Los resultados muestran una significativa ($p < 0.01$) baja en la afinidad (altos valores de Kd) en los pacientes esquizofrénicos vírgenes de tratamiento comparados con los controles sanos. No se encontraron diferencias en la capacidad de unión (Bmax) en ninguno de los dos grupos de esquizofrénicos al compararlos con los sujetos controles. Los resultados no nos ofrecen evidencia de la existencia de un marcador biológico confiable para esquizofrenia. Se sugiere aumentar el número de la muestra estudiada.

Palabras clave: Esquizofrenia, linfocitos, 3H-espiperona, capacidad-unión.

Summary

3H-spiroperone binding of lymphocytes has been studied and proposed to be a useful vulnerability marker for certain subtypes of schizophrenia. The binding of 3H-spiroperone into lymphocytes was studied in 22 schizophrenics, 19 unaffected relatives and 8 healthy subjects. Binding assay was performed, incubating lymphocytes with 0.04 to 0.4 mM of 3H-spiroperone. Non-specific binding was measured with 10 mM haloperidol. At the end the lymphocytes were homogenized. The results show a significant ($p < 0.01$) lower affinity (high Kd values) in drug naive schizophrenics compared with the controls. No differences were found in the binding capacity (Bmax) of both schizophrenic groups compared with control subjects. The results cannot offer us a reliable biological marker for schizophrenia. The increase of the number of subjects is suggested.

Key words: Schizophrenia, lymphocytes, 3H-spiroperone, binding-capacity.

Introducción

La esquizofrenia sigue presentándose en aproximadamente uno por ciento de la población mundial. La hipótesis dopaminérgica continúa siendo uno de los abordajes más válidos y estimulantes dentro de la biología de la esquizofrenia. Se ha postulado la disfunción de prácticamente todos los sistemas de neurotransmisión, pero la hipótesis de la dopamina sigue siendo la base para explicar la posible etiología bioquímica en la esquizofrenia.¹

La hiperactividad dopaminérgica puede ser el resultado de una alteración de la síntesis de dopamina, un incremento en la liberación o una disminución en la degradación a nivel de las terminales nerviosas, o un aumento en el número o la

sensibilidad de los receptores. Los hallazgos más prometedores que apoyan esta hiperactividad provienen de los estudios recientes sobre el aumento en la densidad de los receptores tipo D2 en los cerebros postmortem de los pacientes con esquizofrenia, tratados con neurolepticos.²

El punto de discusión es si este hallazgo refleja una alteración propia del padecimiento o es una consecuencia del tratamiento con neurolepticos que recibieron en vida.

Recientemente, Seeman y cols³ reportaron que la distribución de los valores de densidad de los receptores D2 en el cuerpo, estimada en una muestra de 57 cerebros de pacientes esquizofrénicos, es de tipo bimodal; es decir, en un grupo de pacientes aumentó discretamente el número de receptores D2

* División de Servicios Clínicos e Investigación. Instituto Mexicano de Pediatría, Calz. México-Xochimilco 101, México, D.F., 14370

en comparación con los controles, en tanto que otro grupo de esquizofrénicos muestra densidades muy por encima de los valores control.

El gran avance tecnológico de los últimos años ha permitido cuantificar la densidad de los receptores a neurotransmisores encefálicos *in vitro* con métodos poco invasivos mediante la tomografía por emisión de positrones.

Wong⁴ confirma los hallazgos de los estudios *postmortem*; es decir, la densidad de receptores dopaminérgicos D2 a nivel de los ganglios basales fue significativamente mayor en los sujetos esquizofrénicos que habían recibido o que no habían recibido tratamiento, que en los sujetos normales. Las técnicas empleadas para este tipo de investigaciones con sujetos vivos, son complicadas y costosas.

Uno de los modelos alternos es el estudio de las células periféricas que poseen algunas características estructurales o funcionales a las de las neuronas. Por esto, es deseable, contar con un modelo más accesible, en este sentido, los linfocitos parecen constituir un apropiado modelo. De hecho, los pocos estudios que han cuantificado la densidad de sitios de unión (B_{max}) y de afinidad (K_d) para neurolépticos (que por lo menos en su comportamiento en ensayos de unión, se parecen a los receptores D2 neuronales) en linfocitos de pacientes esquizofrénicos encuentran resultados similares, con aquellos obtenidos en los estudios *postmortem* y en los realizados por tomografía por emisión de positrones.

Le Fur⁵ encontró que los linfocitos de los pacientes con esquizofrenia, en comparación con los de los controles sanos, mostraban un incremento en la densidad de los sitios de unión para neurolépticos.

Bondy⁶ encontró un aumento en la densidad de sitios de unión para la espiperona en linfocitos en los esquizofrénicos y en alguno de sus familiares, comparados con los voluntarios sanos. Lo proponen como un posible marcador de vulnerabilidad para la esquizofrenia.

En cambio, Itzchaky⁶ no confirmó los hallazgos del grupo de Bondy.⁷ Esto se debió, probablemente, a que no pudo repetir el método de laboratorio propuesto por el grupo de investigadores de la Universidad de Munich.

Al estudiar a 22 sujetos esquizofrénicos y a sus familiares, el grupo de Griffiths,⁸ tampoco consideró que la técnica de la unión de 3H-espiperona a linfocitos fuera un marcador de vulnerabilidad para la esquizofrenia.

Los objetivos en nuestra investigación fueron: determinar si hay diferencias en la densidad de los sitios de unión para neurolépticos en los linfocitos, entre un grupo de pacientes con esquizofrenia paranoide (vírgenes de tratamiento y previamente medicados con neurolépticos), sus familiares sin sintomatología clínica y un grupo control de voluntarios sanos, observar si existen datos para hablar de un posible marcador de vulnerabilidad.

Material y métodos

Estudio clínico:

La muestra consistió en 22 pacientes con el diagnóstico de esquizofrenia paranoide de acuerdo con los criterios del DSM-III-R¹⁰ y el RDC¹¹ con un tiempo de evolución menor de 5 años y una puntuación mayor a 3 en cualquiera de los reactivos 1, 3, 4, 7, 11 y 12 al 15 de la escala BPRS.¹²

Para formular el diagnóstico se aplicó una entrevista no estructurada en presencia de dos psiquiatras.

Un grupo de once pacientes, de una edad media de 29.3 ± 8.4, nunca había recibido tratamiento con neurolépticos.

El grupo restante de 11 pacientes, de una edad media de 28.2 ± 6.4, sí había recibido tratamiento neuroléptico pero no había recibido medicamentos desde hacía más de tres meses.

El grupo de los familiares lo constituyeron 7 de sus hermanos de una edad media de 23.7 ± 4.4, 8 madres de una edad media de 49.6 ± 7.4, y 4 padres de una edad media de 50.7 ± 6.5

En el grupo control se incluyó a 8 sujetos sanos (2 mujeres y 6 varones) de una edad media de 26.5 ± 1.9.

Se excluyó a los pacientes que tuvieran alguna enfermedad física concomitante o anomalías electroencefalográficas

Todos los sujetos que participaron en el estudio otorgaron su consentimiento por escrito de acuerdo con las normas éticas internacionales.

Método de laboratorio

Materiales. La 3H-espiperona (40-70 Ci/mMole) se obtuvo de NENDupont, el ficoll-hyaque fue de Pharmacia, los filtros de fibra de vidrio, de Brandel, y el resto de los reactivos, de Sigma.

Las muestras de sangre se obtuvieron de pacientes y voluntarios sanos en ayunas, entre las 8:00 y las 10:00 A.M. A cada 60 ml de sangre venosa se le adicionaron 0.6 ml de heparina y un volumen igual de solución amortiguadora de fosfatos (PBS = NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 26.7 mM y KH₂PO₄ 0.4 mM) La muestra así diluida se centrifugó sobre ficoll-hyaque a 15 000 r.p.m. durante 20 min, para aislar a los linfocitos. Posteriormente, estas células se lavaron tres veces con un PBS que contenía sacarosa (87.64 mM) y glucosa (41.6 mM). Los linfocitos se contaron en un hematocitómetro y se verificó su vialidad por exclusión de azul de tripano. Para el ensayo de unión ligando-receptor se incubaron 1 000 000 de linfocitos con 3H-espiperona (0.04 a 0.4 mM) durante una hora, a 37°C, en una solución amortiguadora que contenía MgCl₂ 0.983 mM, KCl 5.2 mM, sacarosa 41.6 mM. La unión inespecífica se determinó en muestras en paralelo incubadas en 10 mM de haloperidol. Al final del tiempo de incubación los linfocitos se homogenizaron durante 15 segundos en un homogenizador de tejidos de Teckman, y los homogenizados se

filtraron a través de filtros de fibra de vidrio GF/B en un cosechador automático de Brandel. Los filtros se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 1 mM pH 7.4. Posteriormente se secaron y la radiactividad se contó en un contador de centelleo líquido de Beckman.

Análisis de resultados

Utilizamos el programa Enzfitter,¹³ ajustando los datos obtenidos del contador de centelleo al siguiente modelo de ligando:

$$\text{Unido} = B_{\max} (\text{Libre}) / (K_d + \text{Libre})$$

Los datos de B_{\max} y K_d así obtenidos fueron contrastados entre grupos a través de las pruebas de U de Mann-Whitney y del análisis de varianza de Kruskal-Wallis.

Resultados

En los cuadros 1, 2 se presentan las medias y desviaciones obtenidas para los grupos y el resumen de los contrastes efectuados entre los mismos. En la comparación de los pacientes esquizofrénicos que nunca habían recibido medicamento neuroléptico alguno con los sujetos controles, no se encontraron diferencia en el número de sitios de unión ($B_{\max} = 11.03 \pm 7.06$ fmol/cel $\times 10^6$ para los pacientes, $B_{\max} = 14.95.03 \pm 6.31$ fmol/cel $\times 10^6$ para los controles, $[U(11,8) = 59; n.s.]$, pero sí hubo diferencias para la afinidad ($K_d = 0.187$ para los pacientes, $K_d = 0.077$ para los controles, $[U(11,8) = 76; p < 0.01]$).

controles, $[U(11,8) = 52; n.s.]$. Para la afinidad sí se encontraron diferencias ($K_d = 0.230$ para los pacientes, $K_d = 0.077$ para los controles, $[U(11,8) = 65; p < 0.05]$).

En la comparación de todos los pacientes, previamente medicados y los no medicados, con los controles se confirmaron las diferencias antes indicadas, para los sitios de unión $[U(22,8) = 95; n.s.]$ y para la afinidad $[U(22,8) = 141; p < 0.02]$.

Los pacientes nunca medicados mostraron tendencia a ser diferentes de los sí medicados en el número de sitios de unión $[U(11,11) = 89; p < 0.10]$, pero no resultaron diferentes en la afinidad $[U(11,11) = 61.5; n.s.]$. Gráficas 1 y 2.

Los pacientes no mostraron diferencias con sus familiares. $[H(22,8,4,7) = 1.61; n.s.]$ para B_{\max} y $[H(22,8,4,7) = 4.09; n.s.]$ para K_d . Las medias y desviaciones para los padres, madres y hermanos se observan en el Cuadro 1. Al comparar los familiares de los pacientes con los controles no se obtuvieron diferencias.

Discusión

En los resultados encontramos que los pacientes que nunca han sido tratados y los que sí han recibido tratamiento muestran una afinidad más elevada que los controles. Este aumento en los valores de K_d se traduce en una menor afinidad por el sitio de unión.

Al comparar a los pacientes con los demás grupos no se encontraron diferencias significativas en el número de sitios

Cuadro 1. Unión de 3H-espiiperona en linfocitos de esquizofrénicos, sus familiares y controles. Resumen de contrastes estadísticos.

Contraste	Sitios de unión (B_{\max})			Afinidad (K_d)		
A1 vs C	U(11,8)	= 59	n.s.	U(11,8)	= 76	p < 0.01
B1 vs C	U(11,8)	= 52	n.s.	U(11,8)	= 65	p < 0.05
(A1+B1) vs C	U(22,8)	= 95	n.s.	U(22,8)	= 141	p < 0.02
A1 vs B1	U(11,11)	= 89	p < 0.10	U(11,11)	= 61.5	n.s.
(A1+B1) vs D vs E vs F	H(22,8,4,7)	= 1.61	n.s.	H(22,8,4,7)	= 4.09	n.s.
C vs D vs E vs F	H(8,8,4,7)	= 1.22	n.s.	H(8,8,4,7)	= 4.61	n.s.
C vs D				U(11,8)	= 38	n.s.
C vs E				U(8,4)	= 24	n.s.
C vs F				U(8,7)	= 45	n.s.

En este cuadro se señalan los contrastes estadísticos efectuados y sus significancias.

A1: Pacientes nunca medicados, B1: Sin medicación por 3 meses o más, C: Control, D: Madre, E: Padre, F: Hermanos, U: Prueba Mann-Whitney, H: Prueba Kruskal-Wallis

Al comparar a los pacientes previamente medicados con los controles tampoco se presentaron diferencias en el número de sitios de unión ($B_{\max} = 28.91 \pm 27.13$ fmol/cel $\times 10^6$ para los pacientes, $B_{\max} = 14.95.03 \pm 6.31$ fmol/cel $\times 10^6$ para los

de unión, pero sí se obtuvo una tendencia a la diferencia entre los pacientes que habían recibido neurolépticos y los que no los habían recibido, siendo los pacientes vírgenes a tratamiento los que presentaron menor número de sitios de unión.

Cuadro 2. Unión de 3H-espiperona en linfocitos de esquizofrénicos paranoides, sus familiares y controles

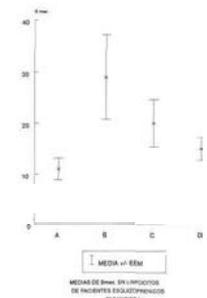
GRUPO	N		B_{max}	K_d	Edad
PACIENTES NUNCA MEDICADOS	11	x	11.03	0.187	29.3
		s	7.06	0.087	8.46
		max	25.88	0.351	
		min	3.02	0.028	
		x	28.91	0.230	28.2
AL MENOS 3 MESES NO MEDICADOS	11	s	27.13	0.201	6.4
		max	75.56	0.516	
		min	3.65	0.021	
CONTROLES	8	x	14.95	0.077	26.5
		s	6.31	0.050	8.9
		max	28.18	0.163	
		min	5.33	0.009	
		x	23.87	0.099	49.6
MADRES	8	s	24.32	0.064	7.4
		max	77.48	0.231	
		min	4.14	0.026	
PADRES	4	x	16.09	0.161	50.7
		s	10.63	0.131	6.5
		max	32.92	0.303	
		min	6.23	0.008	
HERMANOS	7	x	19.37	0.234	23.7
		s	7.00	0.144	4.4
		max	33.55	0.388	
		min	12.18	0.049	

En este cuadro se presentan las medias, desviaciones estándar, valores máximos y valores mínimos para el número de sitios de unión y la afinidad a 3H-espiperona en linfocitos para cada uno de los grupos del estudio.

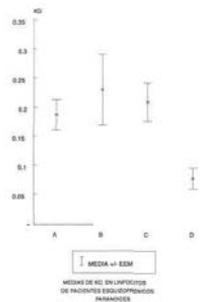
El hecho de que los pacientes y los hermanos sigan un comportamiento biológico semejante, aunque no significativo, al compararse con los controles y con el resto de los familiares, apoyaría la hipótesis de un posible componente genético en la esquizofrenia. Será necesario corroborar esto con un estudio más extensivo y con la participación de un mayor número de sujetos y de familiares de primer grado.

Los resultados de Bondy y cols.^{6,7} muestran un incremento significativo en el número de sitios de unión en los pacientes esquizofrénicos, así como una discreta disminución de la afinidad, la cual no alcanza significancia, nuestros resultados sí muestran diferencias significativas en la afinidad, pero no en el número de sitios de unión.

El método que utilizamos para cuantificar la unión de espiperona marcada en linfocitos, fue el incubar las células con la marca durante una hora y, posteriormente romperlas con un homogeneizador de Teckman durante 30 segundos. Esta es la diferencia con respecto al método de Bondy.¹³ De esta manera se puede descartar que la espiperona marcada que pudiera haber sido capturada al interior de las células, por lo que las determinaciones de K_d y B_{max} son más precisas.



Se presentan en esta gráfica las medias y errores estándar para los sitios de unión (B_{max}). A pacientes nunca medicados, B pacientes no medicados en los últimos 3 meses, C ambos grupos de pacientes, D controles.



Se presentan en esta gráfica las medias y errores estándar para la afinidad (K_d). A pacientes nunca medicados, B pacientes no medicados en los últimos 3 meses, C ambos grupos de pacientes, D controles.

Por ahora no podemos hablar de un posible marcador de vulnerabilidad para la esquizofrenia que tenga utilidad clínica. Sería conveniente continuar con esta línea de investigación, con un mayor número de sujetos, familiares y controles, observando si persiste el comportamiento antes descrito.

Referencias

1. Carlsson, A Antipsychotic drugs, neurotransmitter and schizophrenia. Am J Psychiat 1978; 1: 135.
2. Rupnik, NMJ, Jenner P, Marsden CD. The effect of chronic neuroleptic administration on cerebral dopamine receptor function. Life Sci 1983; 32: 289.
3. Seeman P, Ulpain C, Bergeron C. Biomodal distribution of dopamine receptor densities in brain of schizophrenics. Science 1984, 225: 728.

4. Wong DF, Wagner H, Tune LE y cols. Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science* 1986; 234: 1558.
5. Le Fur G, Zaritani E, Phant T y cols. (3H) spiperone binding in lymphocytes: change in two different groups of schizophrenics and effect of neuroleptic treatment. *LifeSci* 1983;32:249.
6. Bondy B, Ackenheil M, Frohler M. Biochemical classification of schizophrenia subtypes. *Pharmacopsychiat* 1984;19:52.
7. Bondy B, Ackenheil M (3) H-spiperone binding sites in lymphocytes as possible vulnerability marker in schizophrenia *J Psychiatr Res* 1987;21:521.
8. Itzhaky S, Lerer B, Ebstein RP. (3) H-spiperone by lymphocytes in schizophrenia *J Psychiatric Res* 1989; 23/3-4:221.
9. Griffiths RS, Chung A-On-KO, Griffiths KD, Payne JW, Dravies JI. The sequestration of (3 H) spiperone by lymphocytes in schizophrenics and their first-degree relatives: A limited vulnerability marker? *J Psychiatric Res* 1992;26:77.
10. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 3a ed. revisada APA. Washington, D.C: 1987.
11. Spitzer R, Endicott J, Robinson E. *Research Diagnostic Criteria (RDC) for a selected Group of Functional Disorder*. Tercera Edición. New York State Psychiatric Institute, 1981.
12. Overall J, Gorham D. Brief psychiatric rating scale. *Psychol Rep* 1962;10:799.
13. Leatherbarrow RJ A non linear regression data analysis program V.1.03. Los Angeles, U.S.A.: Elsevier Biosoft, 1987.
14. Bondy B, Ackenheil M, Engel RR. Methodology of (3) H-spiperone binding to lymphocytes. *J Psychiatr Res* 1990;24:83.

Comentario oficial al trabajo de ingreso que presenta el doctor Gerardo Heinze, por el académico numerario Héctor Pérez-Rincón, leído el 11 de agosto de 1993.

Señor Presidente,

Señores Académicos:

Hemos escuchado un interesante trabajo sobre uno de los temas centrales de la investigación psiquiátrica contemporánea: el relativo a los marcadores biológicos de diferentes trastornos. En esta comunicación se ha presentado un modelo periférico de marcador que se inscribe dentro de los métodos no invasivos que la moderna tecnología brinda a la medicina mental para el estudio de cuadros nosológicos bien establecidos. El trabajo del doctor Heinze y de su grupo enriquece la nutrida bibliografía aparecida en los últimos veinte años referente a la presencia de tales marcadores en las dos principales entidades kraepelinianas: la esquizofrenia y las psicosis afectivas.

Por otro lado, los estudios sobre marcadores en probandos y familiares han dado nueva luz sobre uno de los temas constantes a lo largo de la evolución histórica de la psiquiatría: el del papel de la herencia y la transmisión genética de los comportamientos patológicos.

En diferentes momentos de esa evolución, la psiquiatría ha intentado explicaciones y teorías de acuerdo al nivel de

avance de las ciencias en que se apoya y de la ideología que las sostenía y las legitimaba. Baste recordar la teoría de la *dégénérescence* de Magnan y Morel. Por otro lado, la genética estuvo presente desde la fundación de la psiquiatría moderna, como lo muestra el hecho de que el instituto de Kraepelin en Munich contaba desde su fundación con un laboratorio de genética. En el Ier. Congreso Mundial de Psiquiatría de 1950 se dio un gran paso con la presentación de Kallmann sobre los primeros resultados a partir del estudio de gemelos, línea de investigación que habría de proseguir hasta nuestros días, aunque hasta la fecha permanece desconocido el modo de transmisión genética de la vulnerabilidad. En clínica, la herencia sigue siendo -como expresaba mi maestro Jean Delay- "la cruz de la psiquiatría".

El trabajo del doctor Heinze, que se apoya sobre todo en las investigaciones de Bondy sobre el incremento de sitios de unión para neurolepticos en linfocitos de esquizofrénicos y de algunos familiares, es un buen ejemplo del grado de complejidad al que se ha llegado en algunos campos de la psiquiatría. Esta es una línea de investigación muy prometedora y estamos seguros que el recipiendario nos comunicará próximamente los resultados de una muestra de casos y de familiares más amplia. El establecimiento de la delicada técnica que hoy se ha presentado es una muestra del nivel de excelencia que ha alcanzado el Instituto Mexicano de Psiquiatría. La Academia Nacional de Medicina, dentro de la que la psiquiatría ha estado siempre tan bien representada, recibe ahora a un clínico e investigador que sabrá ilustrarla en este campo de avanzada. Doctor Heinze: sea usted bienvenido a este arcópagó.