

Densidad de probables receptores dopaminérgicos en los linfocitos de los pacientes con esquizofrenia paranoide. Resultados preliminares

Gerhard Heinze*
Héctor Ortega*
Gloria Benítez-King*
Carlos Forray*
Lourdes Huerto-Delgadillo*
Gisela Galván*
Juan Ramón De la Fuente*
Carlos Salas*

Abstract

PET and postmortem studies indicate that at least a group of schizophrenic patients have increased density of D_2 dopaminergic receptors at a central level. Recently, Bondy et al. (3) reported that this increase could also be observed in the lymphocytes of patients and that this could be a marker of vulnerability, that is, a characteristic inherited together with the tendency to suffer this illness. If confirmed, this would constitute a significant advance in the study of such a devastating disorder.

However there is a controversy about the existence of dopaminergic sites in lymphocytes since dopaminergic binding to these cells could not be reproduced by other authors (12). Therefore in this report we study the 3H -spiperone binding to lymphocytes from schizophrenic patients and healthy volunteers.

Subjects

Six healthy volunteers without personal or familiar history of mental illness, evaluated by means of an unstructured interview; 9 patients who met the DSM-III-R schizophrenia diagnostic criteria, in two independent interviews, according to independent investigators, and 19 patients' first-degree relatives. From 60 ml. blood samples, lymphocytes were purified according to Bondy's method, and a radioreceptor assay was carried out in order to quantify B_{max} and K_D with 3H -spiperone in concentrations from 0.04 to 0.4 nM. The non specific binding is determined by adding 10 μM haloperidol, according to Richelson's technique. Parameters are calculated by the LIGAND program. Our preliminary results suggest that patients with schizophrenia were different when compared to the healthy volunteers, but similar to the group of family members. This difference was present only in the variability but not in the mean value.

Resumen

Los estudios con tomografía por emisión de positrones y los estudios postmortem indican que por lo menos un grupo de pacientes esquizofrénicos experimentan un aumento en la densidad de los receptores para la dopamina (tipo D_2) a nivel

central. Recientemente Bondy y cols. (3) informaron que este incremento también podría observarse en los linfocitos de estos pacientes y que, además, pudiera ser un marcador de vulnerabilidad, es decir, una característica que se hereda junto con la propensión a padecer la enfermedad. Es evidente que, de ser esto cierto, constituiría un hallazgo trascendental en el estudio de tan devastadora enfermedad. Sin embargo, la evidencia sobre los sitios de unión dopaminérgicos en los linfocitos es muy controvertida ya que algunos autores (12) no han podido demostrar la unión específica de ligandos dopaminérgicos en estas células, por lo que en este trabajo estudiamos la unión de 3H -espiperona en linfocitos de pacientes esquizofrénicos y en voluntarios sanos.

Sujetos

Seis voluntarios sanos, sin historia personal ni familiar de enfermedad mental, evaluados mediante una entrevista no estructurada; nueve pacientes que en dos entrevistas satisficieron los criterios diagnósticos de esquizofrenia del DSM-III-R, según evaluadores independientes, y 19 familiares de los pacientes.

De una muestra sanguínea de 60 ml. se extrajeron los linfocitos según el método de Bondy, y se llevó a cabo un ensayo de radioreceptor para determinar la B_{max} y la K_D con 3H -espiperona, en concentraciones que iban de 0.04 a 0.4 nM. La unión no específica se determinó mediante la adición de haloperidol 10 μM según la técnica descrita por Richelson. Los parámetros se calcularon con el programa LIGAND. Nuestros resultados preliminares sugieren que los pacientes con esquizofrenia son diferentes de los sujetos control y similares al grupo de padres y hermanos. Esta diferencia se presenta únicamente en la variabilidad pero no en la tendencia central.

La enfermedad denominada esquizofrenia continúa siendo hoy en día una entidad tan controvertida como lo fue hace varias décadas en cuanto a sus etiología y diagnóstico. La esquizofrenia tiene una incidencia de cerca de 0.05% y una prevalencia de cerca del 1% de la población, tanto entre los hombres como entre las mujeres. Actualmente contamos con varias hipótesis etiopatogénicas para explicar la esquizofrenia. La más adecuada parece ser la que postula que se debe a una alteración en los sistemas dopaminérgicos de neurotransmisión y principalmente en el área mesolímbica y

* División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, Tlalpan, 14370, México, D.F.

mesocortical del sistema nervioso central (4). La hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia sugiere que hay un exceso de función dopaminérgica en el sistema nervioso central, para lo cual se basa fundamentalmente en dos evidencias: Primera: Se encuentra bien documentado que tanto las anfetaminas como otras drogas liberadoras de dopamina, son capaces de inducir estados psicóticos paranoides, semejantes a los observados en la esquizofrenia paranoide (1, 6). La segunda evidencia en favor de la hipótesis dopaminérgica es que los fármacos denominados neurolépticos tienen la particularidad de bloquear el receptor dopaminérgico postsináptico, desplazando los ligandos de alta afinidad de los receptores dopaminérgicos (16), o que inhiben la actividad de la adenilciclase estimulada por la dopamina (13).

En 1979, Keblavian y Caine (8) describieron dos tipos de receptores cerebrales sensibles a la dopamina; D₁ y D₂. Los receptores D₁, se localizan en las neuronas intrínsecas del estriado, están relacionados con la adenilciclase y no se ligan a las butirofenonas como el espiroperidol, es decir, son menos sensibles a los fármacos neurolépticos. Los receptores D₂ no están relacionados con la adenilciclase, se ligan con alta afinidad a las butirofenonas y se encuentran en las neuronas intrínsecas del estriado, así como en la glándula pineal. Estos últimos, por ser sensibles a los neurolépticos, son los que están involucrados en la acción de las drogas psicomotoras. Los receptores D₃, recientemente descubiertos, son relativamente insensibles a los neurolépticos y parecen estar involucrados en la autorregulación de las neuronas dopaminérgicas (8). La mayoría de los neurolépticos tienen cierta actividad sobre los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ en grado variable. Owen (15) informó haber observado un aumento significativo de unión a los receptores D₂ en el núcleo caudado, en el putamen y en el núcleo acumbens del espiroperidol y haloperidol, en los cerebros de los cadáveres de los pacientes que habían recibido el diagnóstico de esquizofrenia. Al estudiar los receptores dopaminérgicos en los cerebros de los cadáveres de los pacientes que tuvieron esquizofrenia, que no habían recibido tratamiento por lo menos durante el año anterior a su muerte, y utilizando la técnica de flupentixol tritiado, este mismo autor (15) observó un aumento significativo de la densidad de los receptores D₂, comparado con los de los voluntarios sanos. Posteriormente estos hallazgos fueron confirmados por Semann y cols. (17) en una muestra de 57 cerebros de los cadáveres de pacientes esquizofrénicos. Este autor describe un aumento bimodal de la densidad de los receptores dopaminérgicos D₂. Es decir, hay un grupo de esquizofrénicos en los que aumenta discretamente, y otro en los que aumenta considerablemente la densidad de los receptores D₂, comparada con el grupo control. Como los neurolépticos en general muestran poca acción terapéutica sobre los llamados síntomas negativos de la esquizofrenia (retramiento social, aplanamiento afectivo, etc.), se ha pensado en dos diferentes tipos de enfermedad (I y II). La hipótesis dopaminérgica puede estar relacionada con el tipo I, es decir, con los síntomas positivos de la enfermedad, asociados a un estado de hipersensibili-

dad dopaminérgica que responden al tratamiento con neurolépticos (5).

Le Fur, Phan y Uzan, A. (9) describieron hace unos años que había una gran afinidad de unión de la ³H-espiperona a los linfocitos en los seres humanos. Posteriormente, el mismo Le Fur y colaboradores (10) reportaron una disminución de unión de la ³H-espiperona en los linfocitos de los pacientes con enfermedad de Parkinson. Este hecho tiene una importancia potencial, ya que se puede contar con un posible índice periférico de receptores dopaminérgicos del SNC, aunque Maloteaux y colaboradores (12) no pudieron confirmar la presencia de receptores dopaminérgicos y muscarínicos en los linfocitos. Bondy y cols. (3) supusieron que los elementos celulares sanguíneos, como los linfocitos, son modelos accesibles y fáciles de analizar, para investigar las funciones de los receptores en el sistema nervioso central. Llevaron a cabo ensayos clínicos con ligandos marcados radioactivamente en plaquetas, linfocitos y granulocitos para estudiar los parámetros de unión (*binding*). También utilizaron la ³H-espiperona para determinar los sitios de unión de los receptores en los linfocitos. En cuanto a la capacidad de unión máxima, en los esquizofrénicos agudos que no habían sido tratados, hubo un incremento significativo en la unión de la espiperona a los linfocitos, comparados con el grupo de controles normales. Este aumento de sitios de unión permaneció en un nivel constante durante el periodo de remisión sin medicamentos, sugiriendo que se trata de una variable independiente de ese estado. Con excepción de una familia, en todas las demás, cuando menos uno de los padres de los pacientes esquizofrénicos, sin sintomatología esquizofrénica, y a los cuales también se les tomó una muestra sanguínea, tuvo un incremento significativo en la densidad de los sitios de unión para la espiperona. Todos estos datos hablan en favor de un posible marcador de rasgo para la esquizofrenia, determinado genéticamente, que revela menos la presencia de la enfermedad que la predisposición o la vulnerabilidad a contraerla (7).

En un estudio reciente de Wong y cols. (19) se empleó la tomografía por emisión de positrones (PET) para cuantificar *in vivo* la densidad de los receptores dopaminérgicos D₂ en dos grupos de pacientes con esquizofrenia (uno que nunca había recibido medicación neuroléptica y otro que había recibido tratamiento con neurolépticos), comparados con un grupo control de voluntarios sanos (sin historia de padecimientos psiquiátricos o neurológicos). Para ello utilizaron la ³H-espiperona marcada como radioligando. Los autores encontraron que la cantidad de dopaminérgicos D₂ había aumentado significativamente en ambos grupos de pacientes con esquizofrenia (medicados y no medicados), comparados con los sujetos normales. El hallazgo de que los receptores dopaminérgicos aumentan en los pacientes con esquizofrenia, nos lleva a pensar en la posibilidad de que los receptores dopaminérgicos estén involucrados en el proceso de la enfermedad esquizofrénica.

Wong y cols. (19) sugieren que se cuantifique la densidad de los receptores dopaminérgicos en otros tipos de psicosis, como los trastornos afectivos, antes

de poder afirmar que estas anomalías en los receptores dopaminérgicos son específicas de la esquizofrenia. Los principales objetivos de la investigación son:

1. Determinar si hay diferencias en la densidad de los sitios de unión para neurolépticos en un grupo de pacientes con esquizofrenia paranoide, que nunca habían recibido medicamentos, y en otros que sí los habían recibido, en comparación con un grupo de sujetos voluntarios sanos.
2. Determinar si entre los familiares de primer grado de los pacientes esquizofrénicos hay individuos con una elevada densidad de sitios de unión para neurolépticos en los linfocitos. En caso de que lo anterior sea específico de la esquizofrenia, se puede sospechar que hay un posible marcador biológico, ya sea de rasgos o de estado.

Método

Sujetos

En la tabla 1 se muestra el número de sujetos estudiados, su edad y su diagnóstico. En esta fase inicial de la investigación, se seleccionaron cuatro sujetos con esquizofrenia paranoide, de 30 ± 13 años como edad promedio, que nunca habían recibido medicamentos neurolépticos, así como 5 sujetos con el diagnóstico de esquizofrenia paranoide, de 33 ± 3 años como edad promedio, que estaban bajo tratamiento o habían recibido fármacos neurolépticos. También se incluyó un total de 19 familiares de primer grado (9 padres y 10 hermanos), que no presentaban ninguna manifestación de esquizofrenia, de los dos grupos de pacientes esquizofrénicos. El grupo control estuvo constituido por seis voluntarios sanos que no habían recibido medicamentos y que nunca habían padecido ninguna enfermedad psiquiátrica. La entrevista diagnóstica de tipo no estructurado la hicieron un entrevistador y un observador. Solamente se incluyeron aquellos casos en los que ambos evaluadores estaban de

acuerdo en que el paciente satisfacía los criterios diagnósticos del DSM-III-R (2) así como los del Criterio Diagnóstico de Investigación (RDC), de Spitzer (18). En la misma entrevista se les aplicó la escala de BPR (14) a los pacientes con esquizofrenia que habían sido aceptados en el estudio. A los sujetos aceptados en el estudio se les tomó en ayunas una muestra de sangre venosa.

Materiales y método de laboratorio

Materiales. La ^3H -espiperona (40-70 Ci/mMole) se obtuvo de Amersham; el Ficoll-Hypaque y los reactivos, de Sigma Chemical Co., y los filtros de fibra de vidrio, de Whatmann.

Método. Las fibras de muestra se obtuvieron de los pacientes y voluntarios sanos, en ayunas, entre las 8:00 y las 10:00 a.m. Se emplearon 60 ml. de sangre venosa heparinizada (0.6 ml de heparina 160 ml de sangre) que se diluyeron 1:1 con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) que contenía NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 26.7 mM, y KH_2PO_4 0.4 mM. Los linfocitos se aislaron por centrifugación, en gradientes de Ficoll-Hypaque a 1500 r.p.m., durante 20 minutos. Las células se lavaron tres veces con PBS-GS, se contaron en una cámara de Neubauer y se verificó la viabilidad con el método de exclusión de azul de tripano. El ensayo de unión ligando-receptor se llevó a cabo con los linfocitos intactos. Se incubaron 10^6 células con ^3H -espiperona en un rango de concentraciones de 0.04 a 0.4 nM, durante una hora, en una solución amortiguadora de fosfatos (MgCl_2 0.983 mM, KCL 5.2 mM, sacarosa, 87.64 mM, NaCl, 110 mM, Na_2HPO_4 2 mM, CaCl_2 1.8 mM y glucosa 41.60 mM). La unión no específica se determinó en presencia de 10 mM de haloperidol. Al final del tiempo de incubación, los linfocitos se homogeneizaron durante 15 segundos en un tissumizer de Tekman. Inmediatamente después los homogenizados se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio GF/B, en un cosechador automático Brandel. Los filtros se lavaron 5 veces con una solución amortiguadora de fosfatos 1 NM pH 7.4, se secaron perfectamente y se contaron en 10 ml de líquido de centelleo, en un contador LS 7800 de Beckman.

TABLA 1
Población estudiada y edades

Número de casos	Población	Edad
4	Esquizofrénicos paranoides que no han recibido medicamentos	20 - 49 años media 30 D.S. 13.1
5	Esquizofrénicos paranoides que reciben medicamentos	20 - 37 años media 33.4 D.S. 3.2
9	Padres	49 - 67 años media 58.9 D.S. 5.8
10	Hermanos	18 - 36 años media 27.6 D.S. 6.2
6	Controles	20 - 29 años media 26.3 D.S. 4.8

Resultados

La tabla 2 muestra los valores de la media, la desviación estándar y los valores máximo y mínimo de cada uno de los grupos. Estos valores corresponden tanto al B_{max} como al K_D . El grupo de pacientes se integró con 9 enfermos, 5 de los cuales recibían medicamentos y eran crónicos, y 4 no habían recibido medicamentos. El grupo que había recibido medicamentos obtuvo una media de $B_{\text{máx}}$ igual a $46.4 \text{ f mol}/10^6 \text{ cels.}$, y media de K_D igual a 0.048 nM. Las desviaciones estándar de este grupo fueron de 28.7 en el $B_{\text{máx}}$ y de 0.015 en el K_D . El grupo que recibía medicamentos obtuvo medias de $B_{\text{máx}}$ y K_D de 32.7 y 0.098, respectivamente, y desviaciones estándar de 21.5 en $B_{\text{máx}}$ y de 0.051 en K_D . El total de pacientes obtuvo

TABLA 2
Valores de media y desviación estándar de B_{máx} y K_D

Grupo	Núm.		B _{máx}	K _D
No recibe medicamentos	4	X	46.4	0.048
		S	28.7	0.015
		Máx	73.0	0.066
		Min	11.8	0.030
Recibe medicamentos	5	X	32.7	0.098
		S	21.5	0.051
		Máx	66.0	0.177
		Min	13.5	0.038
Total de pacientes	9	X	38.8	0.076
		S	24.4	0.046
		Máx	73.0	0.177
		Min	11.8	0.030
Padres	9	X	29.4	0.107
		S	20.1	0.066
		Máx	79.0	0.233
		Min	12.4	0.0135
Hermanos	10	X	22.9	0.126
		S	6.5	0.159
		Máx	34.6	0.553
		Min	14.3	0.009
Controles	6	X	18.8	0.059
		S	2.3	0.051
		Máx	21.9	0.153
		Min	16.3	0.016

una media de 38.8 en el B_{máx}, y una media de 0.076 en el K_D, así como desviaciones de 24.4 y 0.046, respectivamente. El grupo de familiares se formó con 4 de los padres y 5 de las madres de los sujetos; la media del B_{máx} de este grupo alcanzó el valor de 29.4, con desviación de 20.1, y en el K_D se obtuvo una media de 0.107, con desviación de 0.066. Otro de los

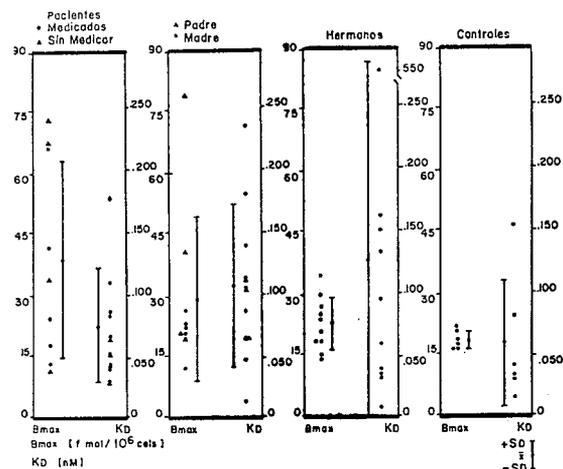


FIGURA 1. Unión de la ³H-espiperona a linfocitos en esquizofrénicos, familiares de primer grado y voluntarios sanos. Valores de B_{máx} y K_D

grupos se formó con 10 hermanos de los pacientes, que obtuvieron medias de B_{máx} y de K_D de 22.9 y 0.126, con desviaciones de 6.5 y 0.159, respectivamente. El grupo control estuvo formado por 6 sujetos sanos que obtuvieron una media de B_{máx} igual a 18.8 f mol/10⁶ cels., con desviación estándar de 2.3, y los valores de la media de K_D fueron de 0.059 nM con desviación de 0.051. En la figura 1 se presentan los valores de B_{máx} y de K_D de los diferentes grupos estudiados.

Al observar que había grandes diferencias en la desviación estándar (24.4 en el grupo de pacientes contra 2.3 en el grupo control) se decidió hacer una prueba de homogeneidad de **varianza**, escogiéndose para este propósito la prueba de **Bartlett**, con la que se obtuvieron diferencias muy **significativas** ($\chi^2(4)=25.91$;

TABLA 3
Resumen de los contrastes estadísticos de los diferentes grupos estudiados

Contraste	Variable	Prueba	Conclusión
Pacientes que no reciben medicamentos vs Controles	B _{máx}	U de Mann-Whitney	U (4, 6) = 6; N.S.
	K _D		U (4, 6) = 10; N.S.
Pacientes que reciben medicamentos vs Controles	B _{máx}	U de Mann-Whitney	U (5, 6) = 9.5; N.S.
	K _D		U (5, 6) = 8; N.S.
Pacientes vs Padres vs Controles	B _{máx}	H de Kruskal-Wallis	H = $\chi^2(2) = 3.22$; N.S.
	K _D		H = $\chi^2(2) = 3.25$; N.S.
Pacientes vs Hermanos vs Controles	B _{máx}	H de Kruskal-Wallis	H = $\chi^2(2) = 2.78$; N.S.
	K _D		H = $\chi^2(2) = 0.08$; N.S.

N.S. = no significativo

$p < 0.001$). Por ello se rechazó la hipótesis de que las varianzas son iguales entre los grupos y se prosiguió con el análisis estadístico, utilizando una estadística no paramétrica. Ninguna de las comparaciones entre los grupos (tabla 3) resultó significativa ni en las comparaciones de $B_{\text{máx}}$, ni en las de K_D . Las comparaciones que se calcularon usando la prueba U de Mann Whitney son: a) pacientes no medicados vs. controles; b) pacientes medicados vs. controles; c) pacientes vs. padres vs. controles, y d) pacientes vs. hermanos vs. controles. Las pruebas se procesaron usando el análisis de varianza de Kruskal-Wallis.

Discusión

La utilización de marcadores periféricos como indicadores del estado funcional del sistema nervioso central no es desacertado si se consideran algunos conceptos modernos de la biología molecular. El contenido genético de un organismo es el mismo en la totalidad de las células que lo constituyen. La diferenciación de cada uno de los tejidos se lleva a cabo por una

expresión diferencial de genes. Por lo tanto, si se postula que en algunas enfermedades mentales existen alteraciones en los receptores dopaminérgicos a nivel central, posiblemente debidas a defectos en la expresión genética, es probable que estas mismas alteraciones sucedan en las células periféricas. Los primeros resultados que hemos encontrado nos permiten inferir que el grupo de pacientes con esquizofrenia es diferente de las muestras de los sujetos control, y similar al grupo de padres y hermanos. Esta diferencia se presenta únicamente en la variabilidad y no en la tendencia central, es decir, no difieren en su media. El hecho de que difieran en la varianza significa que tanto algunos pacientes con esquizofrenia, como sus familiares, presentan valores extremos de la variable medida. Esto indica que son grupos muy heterogéneos, por lo cual será necesario aumentar el número de la muestra para poder determinar de qué variables dependen estas diferencias.

Agradecemos al Ing. José Cortés, la asesoría estadística que nos brindó.

REFERENCIAS

1. ANGRIST B, SATHANATHAN G, WILK S, GERSHON S: Amphetamine psychosis: behavioural and biochemical aspects. *J Psychiat Res*, 11:13-23, 1974.
2. APA: Diagnostic and Statistical Manual c/Mental Disorders (DSM-R). American Psychiatric Association, Washington, DC, USA, 1987.
3. BONDY B, ACKENHEIL M, BIRELEW: *Family Investigation with Respect to Altered (3H) Spiperone Binding to Lymphocytes to Schizophrenic Patients*. Burrows G.D. y cols. (Eds), 1985.
4. BOWER MB: Biochemical processes in shizophrenia: an update. *Schizophr Bull*, 4:186-209, 1978.
5. CREESE I: Dopamine receptors explained. *Trens Neurosci*, 5:40-44, 1982.
6. GRIFFITHS JD, CAVANAUGH J, HELD J, OATES JA: Dextramphetamine: evaluation of psychomimetic properties in man. *Arch Gen Psychiat*, 26:97-100, 1972.
7. HIPPIUS H, MULLER-SPAHN F: Los marcadores biológicos de la esquizofrenia y otras psicosis. *Salud Mental* 10(3):35-41, 1987.
8. KEBABIAN JW, CALNE DB: Multiple receptors for dopamine. *Nature* 227:93-6, 1979.
9. LE FUR G, PHAN T, UZAN A: Identification of stereospecific (3H) spiperidol binding sites in mammalian lymphocytes. *Life Sci*, 2:1139-1148, 1980.
10. LE FUR G, PHAN T, GERARD A, BAULAC M, UZAN A: Decrease in lymphocyte (3H) spiperidol binding sites in Parkinsonism. *Life Sci*, 27:1587-1591, 1980.
11. LEET T, SEEMAN P: Elevation of brain neuroleptic/dopamine receptors in schizophrenia. *Am J Psychiat*, 137, 191-7, 1980.
12. MALOTEAUX JM, WATERKEIN C, LAUDRON PM: Absence of dopamine and muscarinic receptors on human lymphocytes. *Arch Int Pharmacodyn*, 258:174-176, 1982.
13. MILLER RJ, HORN AS, IVERSEN LL: The action of neuroleptic drugs on dopamine-stimulated adenosine 3'5 monophosphate production in neostriatum and limbic forebrain. *Mol Pharmac*, 10, 759-66, 1974.
14. OVERALL J, GORHAM D: Brief psychiatric rating scale. *Psychol Rep*, 10:799-812, 1962.
15. OWEN F, CROSS AJ, CROW TJ: Increased dopamine-receptor sensitivity in schizophrenia. *Lancet*, 2:223-226, 1978.
16. SEEMAN P: Brain dopamine receptors. *Pharmac Rev*, 32:230-87, 1980.
17. SEEMAN P, ULPAIN C, BERGERON C y Cols: Bimodal distribution of dopamine receptor densities in brain of schizophrenics. *Science*, 225:728-751, 1984.
18. SPITZER R, ENDICOTT J, ROBINSON E: *Research Diagnostic Criteria (RDC) for a Selected Group of Functional Disorders*. Third edition. New York State Psychiatric Institute, 1981.
19. WONG DF, WAGNER HN, TUNE LE y cols: Positron emission tomography reveals elevated D₂ dopamine receptor in drug-naive schizophrenics. *Science*, 234: 1558-1563, 1986.