



EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

Segundo Mesa Castillo

Hospital Psiquiátrico de la Habana

segundo@infomed.sld.cu

esquizofrenia. Microscopía electrónica. Virus. Mitocondria. Cerebro. Fetos.

Schizophrenia. Electron microscopy. Virus. Mitochondria. Brain. Foetus

RESUMEN

Antecedentes. Cada vez hay más evidencias que favorecen el origen prenatal de la esquizofrenia. Estas evidencias apuntan hacia factores ambientales intrauterinos que actúan específicamente durante el segundo trimestre de embarazo produciendo un daño directo del cerebro del feto. La tecnología actual no permite observar que pasa a nivel celular ya que el cerebro humano no está expuesto a un análisis directo en esta etapa de la vida en sujetos en alto riesgo de desarrollar esquizofrenia. **Métodos.** En 1977 comenzamos una investigación directa del cerebro con técnicas de microscopía electrónica en el cerebro de fetos en alto riesgo de madres esquizofrénicas con el objetivo de encontrar diferencias a nivel celular en relación a controles. **Resultados.** En estos estudios hemos observado dentro del núcleo de las neuronas la presencia de partículas virales completas e incompletas que reaccionaron en una forma positiva con anticuerpos para el virus herpes simplex hominis tipo 1 [VHS1] y alteraciones mitocondriales. **Conclusión.** La importancia de estos hallazgos puede tener aplicaciones prácticas en la prevención de la enfermedad teniendo en cuenta su relación directa con la etiología y fisiopatología de la esquizofrenia. Un estudio de las células del líquido amniótico en mujeres en riesgo de tener una descendencia de esquizofrenia debe considerarse. De observar las mismas alteraciones a las observadas previamente en las células del cerebro en los fetos estudiados se intentaría para aquellas mujeres en riesgo de tener una descendencia de esquizofrenia, previa información de los resultados, la interrupción voluntaria del embarazo o un tratamiento antiviral anti VHS1 como medida preventiva del desarrollo posterior de la enfermedad.

ABSTRACT

Background. There are increasing evidences that favor the prenatal beginning of schizophrenia. These evidences point toward intra-uterine environmental factors that act specifically during the second pregnancy trimester producing a direct damage of the brain of the fetus. The current available technology doesn't allow observing what is happening at cellular level since the human brain is not exposed to a direct analysis in that stage of the life in subjects at high risk of developing schizophrenia. **Methods.** In 1977 we began a direct electron microscopic research of the brain of fetuses at high risk from schizophrenic mothers in order to finding differences at cellular level in relation to controls. **Results.** In

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

these studies we have observed within the nuclei of neurons the presence of complete and incomplete viral particles that reacted in positive form with antibodies to herpes simplex hominis type I [HSV1] virus, and mitochondria alterations. **Conclusion.** The importance of these findings can have practical applications in the prevention of the illness keeping in mind its direct relation to the aetiology and physiopathology of schizophrenia. A study of amniotic fluid cells in women at risk of having a schizophrenic offspring is considered. Of being observed the same alterations that those observed previously in the cells of the brain of the studied foetuses, it would intend to these women in risk of having a schizophrenia descendant, previous information of the results, the voluntary medical interruption of the pregnancy or an early anti HSV1 viral treatment as preventive measure of the later development of the illness.

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

INTRODUCCIÓN

Hay dos aspectos del desarrollo que pueden estar implicados en la patogénesis de la esquizofrenia: a) La presencia de factores no presumiblemente genéticos (desarrollo inestable) y b) cualquier insulto experimentado durante el desarrollo. Los insultos que están asociados con el período crítico del desarrollo del cerebro son los que más probablemente se asocien con el desarrollo de la esquizofrenia. El hecho de que gemelos idénticos puedan ser discordantes de esquizofrenia sugiere un mecanismo no genético o un mecanismo en el que participen factores genéticos y medioambientales. Una exposición diferenciada a tales factores de riesgo temprano puede contribuir al fenómeno de discordancia en los trastornos psicóticos. La hipótesis de que los virus causen esquizofrenia y otros trastornos neurológicos fue propuesta en el Siglo XVIII y aún es aceptada como una de las asociaciones más comunes.[1] En muchos estudios, la infección por el virus de la influenza y la fiebre, particularmente durante el segundo trimestre de embarazo, ha sido implicada como factores en el desarrollo de esta condición.[2,3] Sin embargo, estudios recientes han mostrado falta de evidencia de invasión directa del feto por el virus de la influenza. Una invasión directa del embrión o del feto es poco probable que sea la causa. Aunque se ha encontrado evidencias serológicas de infección por el virus de la influenza en mujeres cuya descendencia ha padecido esquizofrenia no hay evidencias microbiológica ni histopatológica de que el virus haya infestado el feto en estos casos.[4] Una presuntiva evidencia de etiología viral de la esquizofrenia requiere de la demostración del virus, del antígeno o de anticuerpos virales. En trabajos anteriores hemos obtenido resultados que constituyen una evidencia directa en dos de tres de estos requerimientos, virus y antígeno: a) en estudios post-mortem del cerebro de pacientes esquizofrénicos adultos jóvenes b) en el cerebro de animales experimentalmente inoculados con líquido céfalo raquídeo [LCR] de pacientes esquizofrénicos c) en el lóbulo temporal de fetos de madres esquizofrénicas. Hasta nuestro reciente reporte, las evidencias que sustentaran el concepto de interacción virus-célula en la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia habían sido indirectas. Las partículas virales nunca habían sido demostradas. En nuestros estudios de fetos de madres esquizofrénicas también hemos observado anomalías estructurales en las mitocondrias. En los últimos años las mitocondrias han sido objeto de estudio en la esquizofrenia por diferentes investigadores. Los virus se pueden localizar en las mitocondrias e irrumpir en su integridad. De esta forma, su acción, en cooperación con otros productos celulares, ya virales o inducidos, son capaces de comprometer la funcionalidad de las membranas mitocondriales de las células infectadas. El presente trabajo se relaciona con nuestros hallazgos en el lóbulo temporal en fetos procedentes de madres esquizofrénicas con fuertes antecedentes familiares de esquizofrenia. La presencia de anomalías estructurales de las mitocondrias ha sido también el objeto de este artículo.

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

MATERIALES Y MÉTODOS. VER PRESENTACIÓN CON DIAPOSITIVAS

Previo consentimiento informado y con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Psiquiátrico de la Habana, se obtuvieron muestras de la punta del lóbulo temporal izquierdo de cinco fetos de 16 semanas de tiempo de gestación, abortados por indicaciones médicas, de madres esquizofrénicas y 3 fetos de madres sin antecedentes de enfermedades psiquiátricas [**diap.9**]. Las muestras, una vez obtenidas, se fijaron en glutaraldehído-paraformaldehído siendo transportadas al laboratorio de microscopía electrónica para la realización de las técnicas de microscopía electrónica: técnica general para microscopía electrónica de transmisión e inmuno-electromicroscopía. Posteriormente se fijaron durante 1 hora en glutaraldehído-paraformaldehído, lavándose en buffer fosfato (PBS) durante 5 minutos en cada lavado. Posteriormente se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con metanol más peróxido de hidrógeno durante treinta minutos a la temperatura ambiente. Se procedió al lavado con varios volúmenes de PBS durante 15 minutos. Lavados con TRIS, tres volúmenes de 5 minutos cada vez. Se utilizó suero normal de carnero diluido 1:5. Se añadió el antisuero anti-herpes simplex hominis tipo [HSV1] durante 24 horas, lavándose posteriormente con TRIS (tres volúmenes, cinco minutos cada uno. Se añadió DAB (diamino-bencidina), durante 8 minutos a temperatura ambiente, lavándose con TRIS. Se realizó la post-fijación con tetróxido de osmio al uno por ciento durante treinta minutos, lavándose con buffer fosfato (3X15 minutos), etanol al 30 por ciento durante 5 minutos, al 50 por ciento durante 5 minutos, al 70 por ciento durante 10 minutos y etanol absolute (3X20 minutos). Oxido de propileno (3X15 minutos): procediéndose a la inclusion en Epon I durante 60 minutos, Epon II durante toda la noche, terminándose la inclusion definitivamente para bloques con dilución del antisuero 1/10 y 1/20, bloques controles de cada dilusión, bloques de los controles más control de los bloques controles en cada dilusión y técnica general.

RESULTADOS: VER PRESENTACIÓN CON DIAPOSITIVAS EVIDENCIA DIRECTA

[Diap.11]

Entre los fetos estudiados se estudiaron 2 gemelos monocigóticos, monocoriónicos y biamnióticos [**Diap.10**]. En uno de los fetos gemelares estudiados [que presentaba criptorquidismo] se observó dentro del núcleo de las neuronas la presencia de partículas esféricas vacías de 100 nm ocupando el centro de un área electrón lúcida (Fig.1). Las inclusiones con partículas aparecieron en número de 2 a 8 por núcleo, con gran incidencia en su aparición [**Diap.12 y 13**]. En el estudio inmuno-electromicroscópico una reacción positiva se observó contra el virus herpes simplex hominis tipo I en el núcleo y en el citoplasma de las neuronas (Fig. 2) [**Diap.15 y 16**]. Las partículas virales no se observaron en el resto de las células del sistema nervioso, tampoco la reacción

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

inmunológica **[Diap.11]**. Alteraciones similares relacionadas con la presencia de partículas virales se observaron en el resto de los fetos estudiados **[Diap.14]**. No se observó ninguna alteración en los estudios controles.

Mitocondria. Se observó un número incrementado de mitocondrias en el citoplasma de las neuronas correspondientes a la capa granular de la corteza temporal (Fig. 3). El aspecto general de las mitocondrias afectadas mostraron pérdida de las membranas internas dando la apariencia de mitocondrias vacías **[Diap.17 y18]** Estas anomalías estructurales observadas en las mitocondrias fueron observadas solo en el feto afectado.

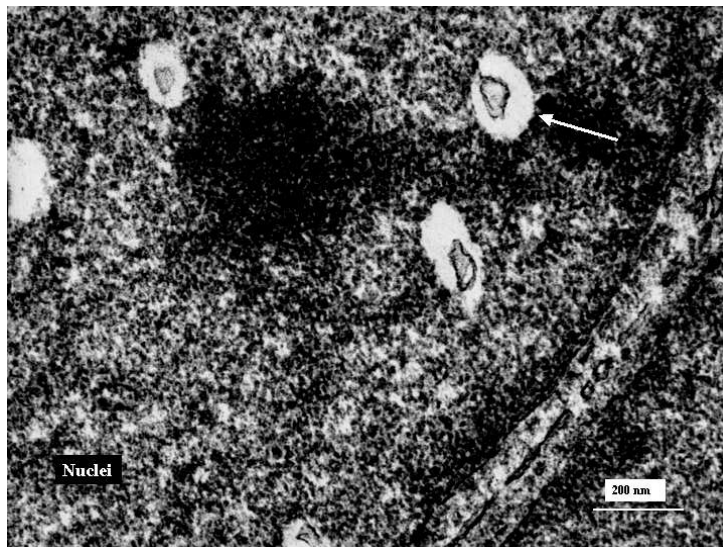


Fig. 1 Partículas virales incompletas [flecha blanca] dentro del núcleo de una neurona de un feto gemelar monocigótico de una madre y abuela esquizofrénica paranoide.

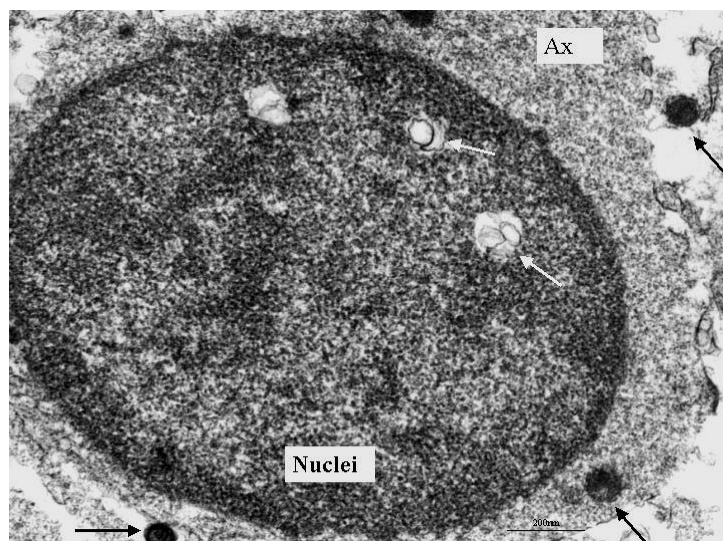


Fig. 2 Partículas virales incompletas [flechas blancas] e intracitoplasmáticas completas [flechas negras] marcadas con anticuerpo para el virus anti-herpes simplex hominis tipo I unido a peroxidasa. Ax=axon. Feto monocigótico.

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

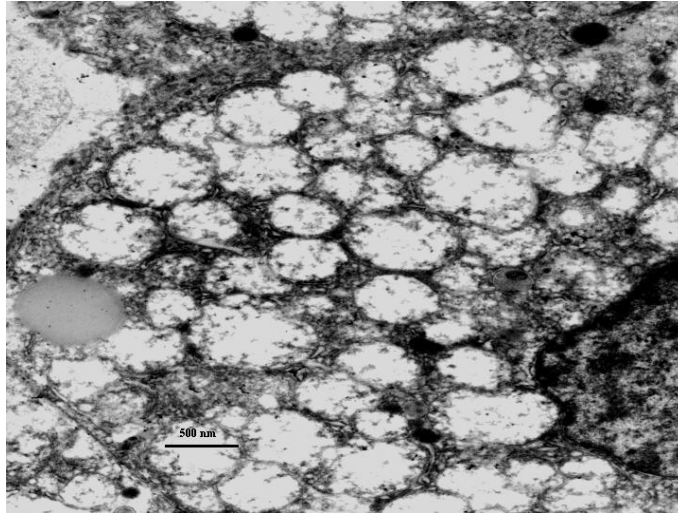


Fig. 3 Neurona granular con el citoplasma completamente lleno de mitocondrias gigantes, la mayor parte vacías de crestas.

DISCUSION

La hipótesis del neurodesarrollo en la etiología y fisiopatología de la esquizofrenia se considera una de las más consistentes en estos momentos. Se basa en una serie de evidencias que guían hacia una afectación del feto en el período crítico del desarrollo del ser humano debido a complicaciones del embarazo y del parto, particularmente relacionadas con un impacto presunto o conocido sobre el desarrollo neurológico del feto que resulta en un incremento de riesgo de psicosis esquizofrénica. Entre los posibles candidatos etiológicos de impacto están las infecciones virales **[Diap.3]**. Un virus actuando en este importante y crítico estadio de desarrollo, interactuando o no con factores genéticos **[Diap.4]** puede ser responsable de la cascada de eventos biológicos que aparecen posteriormente y pudiera explicar el período de relativa quietud que existe entre el nacimiento y la aparición de los síntomas en la pubertad lo que pudiera estar relacionado con la reactivación de una infección viral latente.

Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo son compatibles con una infección viral activa del sistema nervioso central por el virus herpes simplex hominis tipo I [HSV1] durante el segundo trimestre de embarazo en los fetos estudiados **[Diap.20 y21]**. Hasta nuestro reciente reporte las evidencias que sustentaran el concepto de interacción virus-célula en la hipótesis del neurodesarrollo en la esquizofrenia, habían sido indirectas. Las partículas virales nunca habían sido demostradas. Este trabajo es la primera evidencia directa que demuestra la presencia de partículas virales en el sistema nervioso central en fetos de madres esquizofrénicas en el período crítico del segundo trimestre de desarrollo fetal. La importancia de este hallazgo y las alteraciones mitocondriales pueden dar lugar a aplicaciones prácticas en la prevención de la enfermedad teniendo en mente su relación

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

directa con la etiología y fisiopatología de la esquizofrenia. Se sugiere la posibilidad de estudiar las células del líquido amniótico por medio de técnicas virológicas o de microscopía electrónica en mujeres a riesgo de tener una descendencia de esquizofrenia con el objetivo, previo consentimiento informado, de aplicar medidas preventivas, interrupción del embarazo o tratamiento antiviral temprano, si se demuestra una infección viral en las células del líquido amniótico en estos estadios tempranos del neurodesarrollo **[Diap.23]**.

Las evidencias acumuladas en la última década sugieren el rol de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la esquizofrenia, del trastorno bipolar y de otras enfermedades psiquiátricas; [5] sin embargo no hay estudios de las mitocondrias mediante técnicas de microscopía electrónica. La mayor parte de los estudios han utilizado métodos indirectos en la búsqueda de disfunción mitocondrial en la esquizofrenia y los trastornos bipolares. Entre estos métodos se destaca la cuantificación total del DNA mitocondrial y la depleción normal con resultados contradictorios. [6,7] La mayor parte de estos estudios se limitaron a la corteza frontal. [8] En relación a métodos de análisis directo hay pocas publicaciones. Los únicos estudios de microscopía electrónica que ofrecieron detalles en la ultraestructura del sistema nervioso en la esquizofrenia comenzaron en la década del 70. Especialmente en el estudio de embriones de madres esquizofrénicas casi todos los estudios fueron realizados por investigadores rusos. [9,10] En estos estudios ellos destacaron las alteraciones encontradas en cerebros de embriones en diferentes estadios de evolución, desde 7 hasta 12 semanas. Las características de los cambios celulares en los cerebros de embriones consistieron en un mayor desarrollo del sistema de membranas. Las alteraciones mitocondriales fueron muy evidentes con aumento en su número, en su tamaño y con destrucción de las crestas. Ellos señalaron también la presencia de estructuras laminares que denominaron "lamelomas". [11,12] Las alteraciones mitocondriales han sido interpretadas como parte de un proceso general de alteraciones de membrana en la esquizofrenia.[13] Los lamelomas y la proliferación de membranas han sido observados en nuestros estudios en adultos esquizofrénicos, en embriones inoculados con LCR de pacientes esquizofrénicos y en el sistema nervioso de fetos de madres esquizofrénicas.[14]

El rol fisio-patológico de las alteraciones mitocondriales en la esquizofrenia pudiera estar relacionado no solo con el proceso oxidativo sino también con el sistema de conducción celular debido al compromiso de las membranas. Los virus pueden interactuar con las mitocondrias. Hay diversos reportes en este sentido. [15-18] La mayor parte se relacionan con el virus herpes. Particularmente el virus herpes simplex elimina el DNA mitochondrial. [19] Nosotros hemos observado partículas y antígeno de herpes simplex en las tres experiencias ya citadas: adultos esquizofrénicos, animales inoculados y fetos de madres esquizofrénicas.

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

CONCLUSIONES. [Diap.22]

EN TODOS LOS AGENTES INFECCIOSOS OBSERVADOS EN LAS ENFERMEDADES SE PLANTEA SIEMPRE LO MISMO: SI EL AGENTE DESCUBIERTO SE RELACIONA O NO CON LA ENFERMEDAD EN CUESTIÓN. EN NUESTROS TRABAJOS:

1. Puede ser una infección viral en la paciente que afectó al feto no relacionada con la etiología de la enfermedad.
2. Puede ser una infección viral en el feto relacionada con la etiología de la enfermedad.
En este sentido concurren varias circunstancias favorables:
 - A. Segundo trimestre de embarazo
 - B. Antecedentes familiares de esquizofrenia y de trastornos severos del neurodesarrollo
 - C. Presencia de una forma viral incompleta
 - D. Afectación de las neuronas y del núcleo principalmente
 - E. Discordancia de infección en los gemelos monocigóticos
 - F. Madre y abuela esquizofrénicas, dos tías esquizofrénicas
 - G. No signos ni síntomas clínicos de infección en la madre ni en el feto
 - H. No reacción inflamatoria en el tejido cerebral
 - I. Hallazgos previos semejantes en adultos esquizofrénicos y en animales de experimentación
 - J. Muestra de la punta del lóbulo temporal izquierdo
 - K. Relación con el virus herpes simplex hominis tipo 1
 - L. Hallazgos similares en otros fetos de madres esquizofrénicas no en controles
 - M. Hallazgos similares en la placenta en un estudio **[Diap.19]**.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yolken RH, Torrey EF. Viruses, schizophrenia and bipolar disorders. Clin Microbiol Rev 1995;8(1):131-45.
2. Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M et al. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 2004;61(8):774-80.
3. Irving WL, James DK, Stephenson T, Laing P, Jameson C, Oxford JS et al. Influenza virus infection in the second and third trimesters of pregnancy : A clinical and seroepidemiological study. BJOG 2000;107(10):1282-9.

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

4. Shi L, Tu N, Patterson PH. Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: The virus is not detected in the fetus. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 299-305.
5. Shao L, Martin MV, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM et al. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Ann Med* 2008;40(4):281-95.
6. Karry R, Klein E, Ben Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a post-mortem study. *Biol Psychiatry* 2004 April 1;55(7):676-84.
7. Munakata K, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Mitochondrial DNA 3243A>mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia *Biol Psychiatry* 2005 Mar 1;57(5):525-32.
8. Sabunciyani S, Kirches E, Krause G, Bogerts B, Mawrin C, Llenos IC, et al. Quantification of total mitochondrial DNA and mitochondrial common deletion in the frontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *J Neural Transm* 2007;114(5):665-74.
9. Orlovskaya DD, Solov'eva ZhV, Zimina IS. Ultrastructural features of brain cells from embryos of schizophrenic women. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 1975;75(7): 1041-4.
10. Orlovskaya DD, Solov'eva ZhV. Changes in the ultra-fine structure of capillaries of the embryonic brain in the presence of schizophrenia in the mother. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 1976;76(7):1043-6.
11. Orlovskaya DD, Solov'eva ZhV. Relationship between ultrastructural pathology of the embryonic brain and features of the course and treatment of schizophrenic mothers. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 1980;80(11):1682-7.
12. Solov'eva ZhV. Lamellar formations in the brain cells of embryos of schizophrenic mothers. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 1980;80(7):1055-8.
13. Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V, et al. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 2001 Jul 15;55(5):597-610.
14. Mesa CS. An ultrastructural study of the temporal lobe and peripheral blood in schizophrenic patients. *Rev Neurol* 2001 Oct 1-15; 33(7):619-23.
15. Alesci S, Abu-Asab M, Perera SM, Tsokos M, Morris JC, Pakac K. Mitochondrial localization of human recombinant adenovirus: from evolution to gene therapy. *Neuroimmunomodulation* 2007;14(5):221-3.
16. McCormick AL. Control of apoptosis by human cytomegalovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:281-295

EVIDENCIA DIRECTA DE INFECCIÓN VIRAL Y ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO DE FETOS DE MADRES ESQUIZOFRÉNICAS EN ALTO RIESGO DE ESQUIZOFRENIA

17. Tsao CH, Su HL, Lin YL, Yu HP, Kuo SM, Shen CI, et al. Japanese encephalitis virus infection activates caspase-8 and -9 in FADD-independent and mitochondrion-dependent manner. *J Gen Virol* 2008;89(Pt 8):1930-41.
18. Clippinger AJ, Bouchard MJ. Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mitochondrial membrane potential. *J Virol* 2008; 82: 6798-6811.
19. Saffran HA, Pare JM, Corcoran JA, Weller SK, Smiley JR. Herpes simplex virus eliminates host mitochondrial DNA. *EMBO* 2007;8(2):188-93.