

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**BÚSQUEDA DE MARCADORES PERIFÉRICOS Y GENÉTICOS
PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LA
DEPRESIÓN MAYOR CON VENLAFAXINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

Paulina Soledad Rojas Domínguez

Profesora Patrocinante
Dra. Jenny Fiedler Temer

Directoras de Memoria
Dra. Jenny Fiedler Temer **Dra. Amalia Sapag Muñoz de la Peña**

Laboratorio de Neurobioquímica
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular

Laboratorio de Farmacoterapia Génica
Dpto. de Química Farmacológica y Toxicológica

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Lugar de Realización
Laboratorio de Neurobioquímica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile
2007

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto FONDECYT 1040937 y ha dado origen a las siguientes comunicaciones.

Artículo científico

Araya AV, **Rojas P**, Fritsch R, Rojas R, Herrera L, Rojas G, Gatica H, Silva H y Fiedler JL. Early response to venlafaxine antidepressant and remission are correlated with lower ACTH levels previous to the pharmacological treatment. *Endocrine* 30(3), 2006.

Presentaciones en congresos científicos

Rojas R, **Rojas P**, Fritsch R, Rojas G, Herrera L, Fiedler JL.
Análisis de asociación entre polimorfismos de genes relacionados al control del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, depresión mayor y respuesta a antidepresivos.
XXVIII Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile. Olmué, Chile, 2006.

Rojas P, Araya V, Fritsch R, Silva H, Herrera L, Fiedler JL.
Response to arginine-vasopressin analogue challenge in major depressive patients predicts the late response to venlafaxine.
II Reunión de la Sociedad Chilena de Neurociencia. Curicó, Chile, 2006.

Rojas P, Sapag A, Araya V, Fritsch R, Silva H, Herrera L, Lara H, Cordero M, Fiedler J.
La eficacia de la terapia con antidepresivos no se relaciona con polimorfismos en el receptor de glucocorticoides.
I Congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencia. Santiago, Chile, 2005.

Rojas P, Sapag A, Araya V, Fritsch R, Silva H, Herrera L, Lara H, Fiedler J.
Eficacia de la terapia antidepresiva con venlafaxina no se relaciona con polimorfismos en el receptor de glucocorticoides.
XXVII Congreso Sociedad de Farmacología de Chile. Santiago, Chile, 2005.

Rojas P, Sapag A, Araya V, Silva H, Herrera L, Lara H, Fiedler J.
Búsqueda de marcadores periféricos y genéticos que sirvan como elementos predictivos de la eficacia del tratamiento con antidepresivos.
VI Jornada de Investigación en Ciencia y Tecnología "Integración del Campus Norte de la Universidad de Chile en investigación en salud y tecnología". Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile, 2005.

Rojas P.
Búsqueda de marcadores periféricos y genéticos que sirvan como elementos predictivos de la eficacia del tratamiento con antidepresivos.
Primer Simposio de Alumnos Tesistas de Bioquímica de Chile. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso, Chile, 2004.

*Dedicado con todo mi corazón a mi familia
y a todos mis seres queridos,
en especial a aquellos que ya no están con nosotros.*

Amor y paz

Agradecimientos

De manera muy especial, agradezco a mis padres y a mi hermana Bárbara por entenderme, apoyarme y darme tanto amor, que para mí es lo más importante. Yo sin ustedes no soy nada.

Estoy infinitamente agradecida de la Dra. Jenny Fiedler, a la cual admiro por su constancia, dedicación y su gran corazón, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por apoyarme en cada momento durante mi estadía en el laboratorio. Gracias Profe Jenny por sus enseñanzas, consejos y por estar a mi lado en momentos difíciles.

También quiero agradecer a la Dra Amalia Sapag, por su paciencia, consejos y todos los conocimientos que me entregó durante la realización de mi memoria, que sin duda me acompañarán durante toda mi carrera profesional.

Además quiero agradecerles al Dr. Hernán Lara y a sus alumnos Mónica, Mauricio, Pablo, Manuel, Ramón, Eric, Claudio y también a Alfonso y Gabriel, por entregarme su amistad y consejos. Siempre recordaré los gratos momentos vividos en cada celebración que he tenido la oportunidad de compartir.

Agradezco a las lindas personas que he conocido en el laboratorio, a mis amigos Karina, José Luis (Coto), Sergio, Daniela, Romina, Patricia, Javier y Claudio que han hecho de mi estadía en el laboratorio gratos momentos y recuerdos que con mucho cariño guardo en mi corazón.

También agradecer a Patty, Mily y Jorge por su amistad y compañía durante la carrera. A Rodrigo por estar a mi lado, ser mi amigo, compañero y confidente y ocupar un lugar muy importante en mi vida.

Le doy gracias a Dios por permitirme terminar esta etapa, conocer a tantas personas de buen corazón, aunque no fue fácil, ha sido un período de gran aprendizaje y sin duda cada experiencia vivida me ha hecho crecer.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
SUMMARY	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Adaptaciones neuroanatómicas en la depresión mayor	1
1.2 Depresión mayor y eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (HHA)....	2
1.3 Receptor de glucocorticoides	4
1.4 Polimorfismos del receptor de glucocorticoides y susceptibilidad a la depresión mayor.....	5
1.5 Mecanismo de acción de fármacos antidepresivos y regulación de la expresión génica	8
1.6 Fármacos antidepresivos y el factor neurotrófico derivado del cerebro	9
1.7 Fármacos antidepresivos y el receptor de glucocorticoides	10
1.8 Estudios del receptor de glucocorticoides en pacientes con depresión mayor	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo general	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Reactivos generales	13
4.2 Sujetos	13
4.3 Caracterización endocrinológica de pacientes depresivos y sujetos controles	14
4.3.1 Ensayo de la activación de la hipófisis con desmopresina	14
4.3.2 Ensayo de la supresión de la secreción del cortisol mediante dexametasona	16
4.4 Tratamiento con el antidepresivo venlafaxina	17
4.5 Genotipificación del receptor de glucocorticoides	18
4.5.1 Extracción de ADN genómico	19
4.5.2 Oligonucleótidos	20
4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
4.5.4 Genotipificación de los codones 22 y 23 mediante PCR usando partidores específicos	22
4.5.5 Genotipificación del codón 641 mediante PCR con pares de partidores confrontados (PCR-CTPP)	22
4.5.6 Genotipificación de los codones 363 y 729 mediante PCR y	

	digestión con enzimas de restricción	23
4.5.7	Secuenciación	24
4.6	Determinación de marcadores periféricos durante el tratamiento.....	24
4.6.1	Extracción de linfocitos de sangre periférica	25
4.6.2	Homogeneización de los linfocitos y cuantificación de las proteínas	26
4.6.3	Determinación de GR , CREB fosforilada y CREB total en extractos de linfocitos mediante análisis de Western	27
4.6.4	Determinación de los niveles del BDNF en suero	29
4.6.5	Análisis estadístico	29
5.	RESULTADOS.....	30
5.1	Caracterización clínica y endocrinológica de sujetos sanos y con depresión mayor	30
5.1.1	Evaluación de la función tiroidea	30
5.1.2	Evaluación del eje HHA en sujetos sanos y depresivos.....	30
5.2	Respuesta clínica al tratamiento con venlafaxina y su correlación con parámetros endocrinos	32
5.2.1	Evolución de la respuesta clínica	32
5.2.2	Relación entre la respuesta a DDAVP y la remisión clínica	38
5.3	Búsqueda de marcadores periféricos que se correlacionen con la respuesta al tratamiento con venlafaxina.....	42
5.3.1	Isoforma del receptor de glucocorticoides (GR) en linfocitos	42
5.3.2	CREB fosforilada y CREB total en linfocitos	44
5.3.3	Niveles séricos del BDNF	47
5.4	Estudio de polimorfismos del gen del receptor de glucocorticoides	49
5.4.1	Genotipificación de los codones 22 y 23 mediante PCR usando partidores específicos	49
5.4.2	Genotipificación del codón 363 mediante PCR y digestión con <i>Tsp509I</i>	51
5.4.3	Genotipificación del codón 641 mediante PCR con pares de partidores confrontados.....	51
5.4.4	Genotipificación del codón 729 mediante PCR y digestión con <i>HphI</i>	53
6.	DISCUSIÓN.....	56
6.1	Alteraciones en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal y su relación con la depresión mayor	56
6.2	Receptor de glucocorticoides y depresión mayor	57
6.3	Niveles de ACTH y cortisol en pacientes con depresión mayor y su relación con la respuesta clínica a antidepresivos	63
6.4	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico, factor neurotrófico derivado del cerebro y tratamiento con antidepresivos	65
7.	CONCLUSIONES	70
8.	BIBLIOGRAFÍA	71

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1 Estrés y depresión	3
Figura 2 Receptor de glucocorticoides	6
Figura 3 Evaluación de la función tiroidea y del eje HHA en sujetos controles y pacientes con depresión mayor	15
Figura 4 Evaluación de la respuesta a la terapia con venlafaxina	18
Figura 5 Procedimientos utilizados para la determinación del BDNF en suero, obtención del ADN genómico y de los linfocitos del plasma	25
Figura 6 Secreción de la ACTH y del cortisol en respuesta a la activación de la hipófisis con desmopresina (DDAVP)	33
Figura 7 Respuesta clínica de los pacientes depresivos al tratamiento con venlafaxina	35
Figura 8 Secreción temporal de la ACTH y del cortisol en respuesta a una inyección de DDAVP en pacientes respondedores tempranos y tardíos	39
Figura 9 Niveles del GR en extractos de linfocitos de pacientes con DM durante el tratamiento	43
Figura 10 Niveles de la CREB en extractos de linfocitos de pacientes con depresión mayor durante el tratamiento	45
Figura 11 Variaciones de los niveles de CREB-P durante el tratamiento en relación al nivel total de CREB y al de β -actina	46
Figura 12 BDNF en suero de pacientes con depresión mayor durante el tratamiento	48
Figura 13 Genotipificación de los codones 22 y 23 mediante PCR usando partidores específicos	50
Figura 14 Genotipificación del codón 363 mediante PCR y digestión con <i>Tsp509I</i>	52
Figura 15 Genotipificación del codón 641 mediante PCR con partidores confrontados.....	54
Figura 16 Genotipificación del codón 729 mediante PCR y digestión con <i>HphI</i>	55

ÍNDICE DE TABLAS		Página
Tabla 1	Oligonucleótidos usados para la generación de amplicones del ADN genómico del GR	21
Tabla 2	Condiciones usadas en las reacciones de PCR	21
Tabla 3	Condiciones para la determinación de proteínas por Western	28
Tabla 4	Características clínicas y endocrinológicas de sujetos sanos y pacientes con depresión mayor	31
Tabla 5	Composición de los grupos de pacientes con depresión mayor y clasificación según la respuesta clínica a la venlafaxina	36
Tabla 6	Características clínicas y endocrinológicas de sujetos sanos y de pacientes depresivos respondedores tempranos y tardíos	37
Tabla 7	Niveles del cortisol y la ACTH en respuesta a una inyección de DDAVP	40
Tabla 8	Niveles del cortisol y la ACTH en pacientes que remiten y no remiten durante el tratamiento con venlafaxina	41

ABREVIATURAS

ABC	: Área bajo la curva
ACTH	: Hormona adrenocorticotropa
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ARN m	: Ácido ribonucleico mensajero
AVP	: Péptido arginina vasopresina
BDNF	: Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	: Albúmina de suero de bovino
CREB	: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
CREB-P	: CREB fosforilada
CREB-T	: CREB total
CRH	: Hormona liberadora de corticotropina
DBD	: Dominio de unión al ADN
DEX	: Dexametasona
DDAVP	: Desmopresina
DM	: Depresión mayor
DMI	: Desmetilimipramina
DSM-IV	: Manual Estadístico y Diagnóstico de Desórdenes Mentales
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
GCs	: Glucocorticoides
GD	: Giro dentado
GR	: Receptor de glucocorticoides
GRE	: Elemento de respuesta a glucocorticoides
HAM-D	: Test de Hamilton de depresión
HHA	: Hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal
IMC	: Índice de masa corporal
ISRN	: Inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina
ISRS	: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
LBD	: Dominio de unión al ligando
MR	: Receptor de mineralocorticoides
PBS	: Tampón fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-CTPP	: PCR con pares de partidores confrontados
PVN	: Núcleo paraventricular
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SNC	: Sistema nervioso central
TAE	: Tris-Acetato-EDTA
TBE	: Tris-Borato-EDTA
TSD	: Test de supresión con dexametasona
TSH	: Hormona estimulante de la tiroides

RESUMEN

En la depresión se postula una reducción en la neurotransmisión serotoninérgica y/o noradrenérgica y en péptidos neuroprotectores como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Además del riesgo genético, existe una relación entre el estrés y el desarrollo de la depresión. En el estrés crónico y en la depresión se observa atrofia neuronal, reducción del BDNF y fallas cognitivas. Estos efectos se relacionan con el aumento de los glucocorticoides (GCs) circulantes debido a una sobreactivación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (HHA). La actividad del eje HHA se controla por la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) hipotalámica, la cual estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) de la hipófisis; este efecto es potenciado por el péptido arginina-vasopresina (AVP) durante el estrés. La ACTH estimula la secreción de los GCs adrenales los que se unen a su receptor (GR) a nivel del eje HHA inhibiendo su activación, efecto que está reducido en la depresión quizás debido a variaciones polimórficas funcionales del GR. Los fármacos antidepresivos que son inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (ISRN) y no de serotonina (ISRS) normalizan el eje HHA y aumentan el número del GR en linfocitos. Los fármacos antidepresivos aumentan la expresión de genes neuroprotectores como el gen del BDNF y el de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB): los sujetos depresivos tienen niveles séricos del BDNF menores que los pacientes tratados farmacológicamente.

En esta memoria se determinó si los niveles periféricos del BDNF, la CREB y el GR, así como si ciertas variantes polimórficas del GR, sirven como marcadores predictivos de la respuesta clínica de pacientes con depresión mayor tratados con venlafaxina, un fármaco antidepresivo de acción dual (ISRS/ISRN). La severidad y evolución de la depresión se determinó por el test de Hamilton de depresión (HAM-D). Los sujetos depresivos (n=18) y sanos (n=10) presentaron niveles similares del cortisol en orina de 24 h y en el ritmo de secreción circadiana del cortisol salival indicando una actividad normal del eje HHA. Ambos grupos suprimieron la secreción de cortisol luego de la ingesta de dexametasona (agonista del GR). El 61% de los pacientes redujeron el puntaje del HAMD al 25% en la primera semana de tratamiento, considerándose

como respondedores tempranos. El 39% restante, respondedores tardíos, comenzaron a reducir el puntaje del HAM-D a la segunda semana de tratamiento. Estos últimos presentaron niveles mayores de la ACTH basal y de la inducida por la inyección de un análogo de AVP (DDAVP) que los respondedores tempranos y los sujetos sanos, indicando una mayor sensibilidad de los receptores de AVP. La DDAVP provocó una mayor secreción del cortisol en ambos grupos de pacientes con respecto al grupo control. El 44 % de los pacientes remitieron (HAMD = 7) y presentaron un nivel más bajo de la ACTH y del cortisol basal.

Se buscaron polimorfismos descritos en el gen del GR en los sujetos del estudio y en una muestra poblacional de Santiago (n=105) mediante la amplificación de ADN genómico por PCR. No se encontraron los polimorfismos de los codones 22, 23, 363, 641 y 729 salvo en el codón 22 en un paciente respondedor temprano y el del codón 363 en un sujeto del grupo poblacional. Los niveles del GR en relación a la β -actina en linfocitos no variaron durante el tratamiento con venlafaxina en los dos grupos de respondedores. La relación entre las isoformas del GR (A y B) aumentó en las primeras semanas de tratamiento en los respondedores tardíos; en contraste, esta razón disminuyó en los respondedores tempranos.

En ambos grupos de pacientes se observó un leve aumento de los niveles de la CREB total en las primeras semanas, aumento que en los respondedores tardíos se mantuvo hasta la tercera semana de tratamiento. Se observó un leve aumento, aunque no significativo, en los niveles de la CREB activa (fosforilada) en la primera semana de tratamiento en el grupo de respondedores tempranos. Este resultado se correlacionó con el aumento en los niveles séricos del BDNF y la respuesta clínica del grupo de respondedores tempranos a la semana de tratamiento.

Se concluye que la secreción de la ACTH basal e inducida por la DDAVP antes del tratamiento, y los niveles del BDNF durante la terapia con venlafaxina se correlacionan con la respuesta clínica. Este es el primer estudio en que se evalúan tanto potenciales marcadores periféricos y genéticos como la funcionalidad del eje HHA en relación a la respuesta al tratamiento con un solo antidepresivo en un período de seis semanas.

Summary

SEARCH FOR PERIPHERAL AND GENETIC MARKERS PREDICTIVE OF THE CLINICAL RESPONSE TO THE TREATMENT OF MAJOR DEPRESSION WITH VENLAFAXINE

Depression, a disorder for which there is a recognized genetic risk, may be due to a reduction of noradrenergic and/or serotonergic neurotransmission and diminished levels of neuroprotective factors such as the brain derived neurotrophic factor (BDNF). There is a relationship between stressful events and the development of depression. Neuronal atrophy, a reduction in BDNF and cognitive deficiencies are observed in both chronic stress and depression. These effects correlate with an increase in circulating glucocorticoids (GCs) due to hyperactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. HPA activity is driven by the secretion of corticotropin-releasing hormone (CRH) from the hypothalamus, which in turn stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the pituitary gland; this effect is potentiated by the arginine-vasopressin peptide (AVP) during stress. ACTH stimulates the secretion of GCs which interact with their receptors (GR) in the HPA axis inhibiting its activation; this effect is reduced in depression probably due to functional variants of the GR. Antidepressant drugs which act as selective inhibitors of the reuptake of noradrenaline (SNRI) but not of serotonin (SSRI) normalize the HPA axis and increase the GR density in lymphocytes. Antidepressant drugs increase the expression of genes for neuroprotective factors such as BDNF and cAMP response element binding protein (CREB): depressive patients have lower levels of serum BDNF than patients under pharmacological treatment.

In this study we determined if the peripheral levels of BDNF, CREB and GR, as well as if some GR polymorphic variants, are useful as predictive markers of the clinical response to venlafaxine, a dual (SSRI/SNRI) antidepressant, in patients suffering major depression. The Hamilton depression test (HAM-D) was applied to assess the severity of the disease and to perform the clinical follow-up. Depressive (n=18) and healthy (n=10) subjects had similar levels of urinary cortisol in 24 h and similar salivary cortisol circadian rhythms, indicating a normal activity of the HPA axis. Both groups suppressed

cortisol secretion after ingestion of dexamethasone (a GR agonist). During the first week of treatment 61 % of the patients reduced their HAM-D score 25 % and were considered early responders. The remaining 39 % started to reduce their HAM-D score in the second week of treatment and were considered late responders. The basal ACTH secretion of this group was higher than that of the early responders and healthy subjects, as was the ACTH secretion stimulated by an AVP analogue (DDAVP), suggesting a higher sensitivity of AVP receptors. The cortisol secretion stimulated by DDAVP was higher in both depressive groups than in controls. Remittance (HAM-D \leq 7) was observed in a group of patients (44 %) having lower levels of basal ACTH and cortisol.

The existence of well documented polymorphisms in the GR gene was investigated in patients and healthy individuals, as well as in a sample (n=105) of the general population of Santiago, by PCR amplification of genomic DNA. The polymorphisms in codons 22, 23, 363, 641 and 729 were not found, with the exception of that for codon 22 in an early responder patient and that for codon 363 in one individual of the general population. The lymphocyte GR levels in relation to β -actin did not change during treatment in both groups of responders. During the first weeks of treatment the ratio between the A and B isoforms of GR increased in the late responders, but decreased in the early responders.

In both groups of patients a slight increase in total CREB levels was observed during the first two weeks, effect that was maintained up to the third week of treatment in the late responders. In the early responders a slight increase was observed in the active (phosphorylated) form of CREB during the first week of treatment; although not statistically significant, this result correlated with the increase in BDNF levels in serum and with the clinical response.

It may be concluded that both basal and DDAVP-stimulated ACTH secretion prior to treatment and BDNF levels during treatment with venlafaxine correlate with the clinical response. This is the first study that evaluates both (a) peripheral and genetic markers and (b) the functionality of the HPA axis in relation to the clinical response to a single antidepressant during six weeks of treatment.

1. INTRODUCCIÓN

La depresión mayor es una enfermedad que adquiere día a día más importancia en Chile afectando al 9,5 % de la población general (Rojas y cols., 1997). Esta patología perturba el desarrollo del individuo y su capacidad laboral, constituyendo un problema serio de salud pública.

La mayor frecuencia de depresión se observa en las sociedades en desarrollo, como la nuestra, y que además sufren un alto nivel de estrés (Prado y Mena, 1999). Existen individuos más proclives que otros a presentar cuadros depresivos. Estudios epidemiológicos muestran que aproximadamente entre el 40 y el 50% de riesgo de presentar depresión es de origen genético. Además, la vulnerabilidad a la depresión también depende de factores como el estrés, el trauma emocional, las infecciones virales y las alteraciones durante el desarrollo cerebral, los cuales han sido implicados en la etiología de la depresión (Fava y Kendler, 2000).

Desde el punto de vista biológico, la depresión se asocia a cambios en la expresión génica y a adaptaciones anatómicas y neurobioquímicas. Estos cambios, que pueden ser producidos por el estrés, son los responsables de las adaptaciones sinápticas a largo plazo que determinan la susceptibilidad a episodios recurrentes de depresión (Prado y Mena, 1999).

En resumen, la depresión es un desorden relacionado con el estrés. Sin embargo, el estrés *per se* no es suficiente para causar depresión y, por lo tanto, la interacción entre la predisposición genética y algunos factores ambientales juega un rol importante (Nestler y cols., 2002).

1.1 Adaptaciones neuroanatómicas en la depresión mayor

Existen diversos mecanismos que pueden contribuir a la atrofia y la pérdida de neuronas observadas en respuesta al estrés y también en la depresión. El hipocampo

es una estructura del sistema límbico involucrada en el comportamiento. Diversos estudios han demostrado que, a causa del estrés, se produce atrofia y muerte de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo y a la vez una disminución de la génesis de neuronas granulares del giro dentado (GD) de animales adultos. Estos cambios pueden contribuir a la reducción del volumen hipocampal observada en pacientes con depresión o aquella observada luego del estrés postraumático (Duman y cols., 2000). Los pacientes con depresión mayor exhiben cambios anatómicos en ciertas regiones del cerebro como los ganglios basales, la amígdala y en regiones corticales, estructuras que están implicadas en el deterioro tanto afectivo como cognitivo observado en esta patología (Prado y Mena, 1999). En estudios postmortem se ha visto que el número de neuronas y glías está reducido en la corteza prefrontal de pacientes depresivos (Duman y cols., 2000). Esto sugiere que el daño y la pérdida celular observados en individuos depresivos afectan tanto a neuronas como a glías siendo estas últimas importantes para la mantención de poblaciones celulares en el sistema nervioso central porque son fuente de factores tróficos (Duman y cols., 2000). A pesar del amplio conocimiento que durante años han entregado los estudios de imagenología en pacientes con desórdenes psiquiátricos, estos estudios no dan información acerca de alteraciones en la bioquímica neuronal.

1.2 Depresión mayor y eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroidales de origen adrenal que afectan numerosos procesos en el cerebro y en el organismo. Su secreción es mediada vía el eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (HHA) (Figura 1) y es estimulada, por ejemplo, por el estrés a través de la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) sintetizada en las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (Lucassen y cols., 2001). La CRH estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) de la hipófisis anterior, lo cual provoca la secreción de GCs (cortisol en humanos, corticosterona en ratas) de la corteza adrenal. Los GCs provocan una fuerte retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis y núcleos paraventriculares

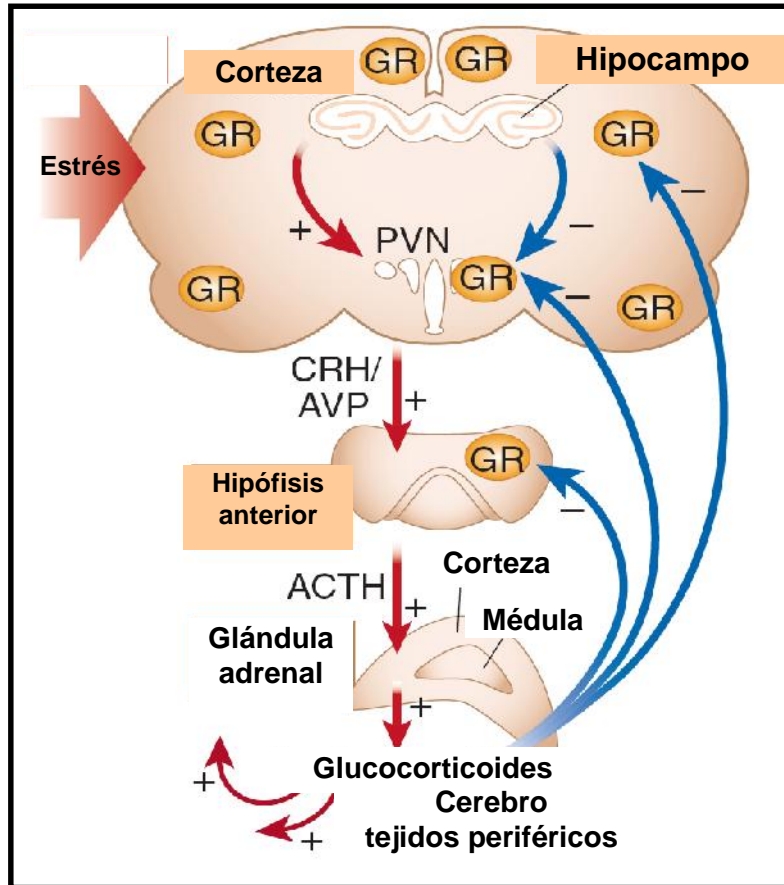


Figura 1. Estrés y depresión.

Activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal por el estrés (en rojo). Un estímulo estresante activa circuitos neuronales que convergen sobre una región del hipotálamo, el núcleo paraventricular (PVN). Los neuropéptidos, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP) son liberados por el sistema porta hipofisiario ejerciendo su acción sobre la hipófisis. Esto produce un aumento de la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) hacia la circulación general provocando la síntesis y liberación de esteroides de la corteza de la glándula adrenal. Los glucocorticoides llegan al cerebro, y son detectados por el receptor de glucocorticoides (GR). El GR actúa como un sensor del estrés y su activación produce un comportamiento ansioso y una alteración en los procesos de memoria y aprendizaje. En azul se muestra la retroalimentación negativa del eje HHA. El aumento en GCs activa la regulación negativa del eje para limitar su sobre-activación durante el estrés. Así la activación del GR en la hipófisis, hipotálamo, hipocampo y corteza frontal limitan la respuesta al estrés. Modificado de Akil, 2005.

reduciendo la liberación de ACTH y CRH respectivamente. El efecto de los GCs se ejerce por la unión de la hormona a sus receptores de baja afinidad (Abraham y cols., 2001). Primariamente, la retroalimentación de GCs mantiene la actividad basal del sistema y facilita el término de la activación del eje HHA, tanto durante la secreción circadiana como durante la inducida por el estrés (Sapolsky y cols., 1984). Los GCs, además de sus efectos metabólicos, influyen en procesos relacionados con la emoción, el aprendizaje-memoria y están involucrados en la coordinación de eventos circadianos (Angelucci, 2000). Un desbalance agudo o crónico de la concentración de GCs puede amenazar directamente la función fisiológica neuronal y aumentar la vulnerabilidad neuronal bajo condiciones patológicas (Abraham y cols., 2001).

Varios estudios clínicos han demostrado que aproximadamente un 50% de pacientes con depresión mayor poseen una hipersecreción de GCs o exhiben una hiperactividad del eje HHA debido a que los mecanismos asociados a la retroalimentación negativa mediada por los GCs se encuentran alterados, quizás debido a un mal funcionamiento de los receptores de GCs (D'Sa y Duman, 2002).

1.3 Receptor de glucocorticoides

El cerebro es el mayor blanco para la acción de los GCs. Debido a su naturaleza lipofílica, los GCs traspasan la barrera hematoencefálica y se unen a receptores intracelulares que se han denominado receptor de mineralocorticoides (MR) y receptor de glucocorticoides (GR) y que están presentes en neuronas y glías (De Kloet y cols., 1998). Los MRs están predominantemente en áreas cerebrales límbicas, particularmente en el hipocampo, mientras que los GRs están ampliamente presentes en todo el cerebro (De Kloet y cols., 1998). Desde un punto de vista farmacológico, la corticosterona se une a los MRs con una afinidad diez veces mayor que a los GRs (Abraham y cols., 2001). Ambos receptores son factores transcripcionales diméricos que son activados por la hormona, siendo el GR esencial para la vida (Cole y cols., 1995). Los GRs y los MRs se unen a una secuencia específica de ADN, el elemento de

respuesta a GCs (GRE), localizada en la región promotora de genes blancos regulando positiva o negativamente la expresión de genes (Truss y Beato, 1993).

El gen del GR (*NR3C1*) se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (5q31) y tiene un total de 9 exones (Figura 2A) (Hollenberg y cols., 1985). El receptor de glucocorticoides posee tres dominios estructurales (Figura 2B) y cualquier cambio aminoacídico en estos tres dominios puede interrumpir la actividad normal del receptor. El primer dominio, codificado por los exones 1 y 2, corresponde al primer dominio de transactivación, importante en la actividad transcripcional del receptor (Giguere y cols., 1986; Bray y Cotton, 2003). El segundo dominio está codificado por los exones 3 y 4 que codifican separadamente los dos dedos de zinc del dominio de unión al ADN (DBD) que reconocen al GRE (Giguere y cols., 1986; Bray y Cotton, 2003). El tercer dominio, ubicado en el extremo C-terminal, contiene el sitio de unión al ligando (LBD), el segundo dominio de transactivación (codificado en los exones 5 a 9) y el sitio de unión para proteínas de shock-térmico (Giguere y cols., 1986).

Existen dos isoformas del GR originadas por procesamiento alternativo del exón 9: la variante GR α , que es completamente funcional, y la variante GR β , que carece del dominio LBD (Hollenberg y cols., 1985). La variante GR α tiene a su vez dos isoformas, A y B, que se generan por inicios distintos de la traducción (Yudt y Cilowski, 2001). Estas isoformas son capaces de formar homodímeros y heterodímeros. Sin embargo, se ha propuesto que el GR β , al carecer del LBD, actúa como un verdadero dominante negativo del GR α (Charmandari y cols., 2005; Oakley y cols., 1999).

1.4 Polimorfismos del receptor de glucocorticoides y susceptibilidad a la depresión mayor

Se han descrito diversos polimorfismos en genes asociados a la neurotransmisión serotoninérgica y noradrenérgica que se han asociado a una predisposición a la depresión mayor y/o a la respuesta clínica a fármacos antidepresivos que son inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y de noradrenalina (ISRN) (Duman y cols., 1997).

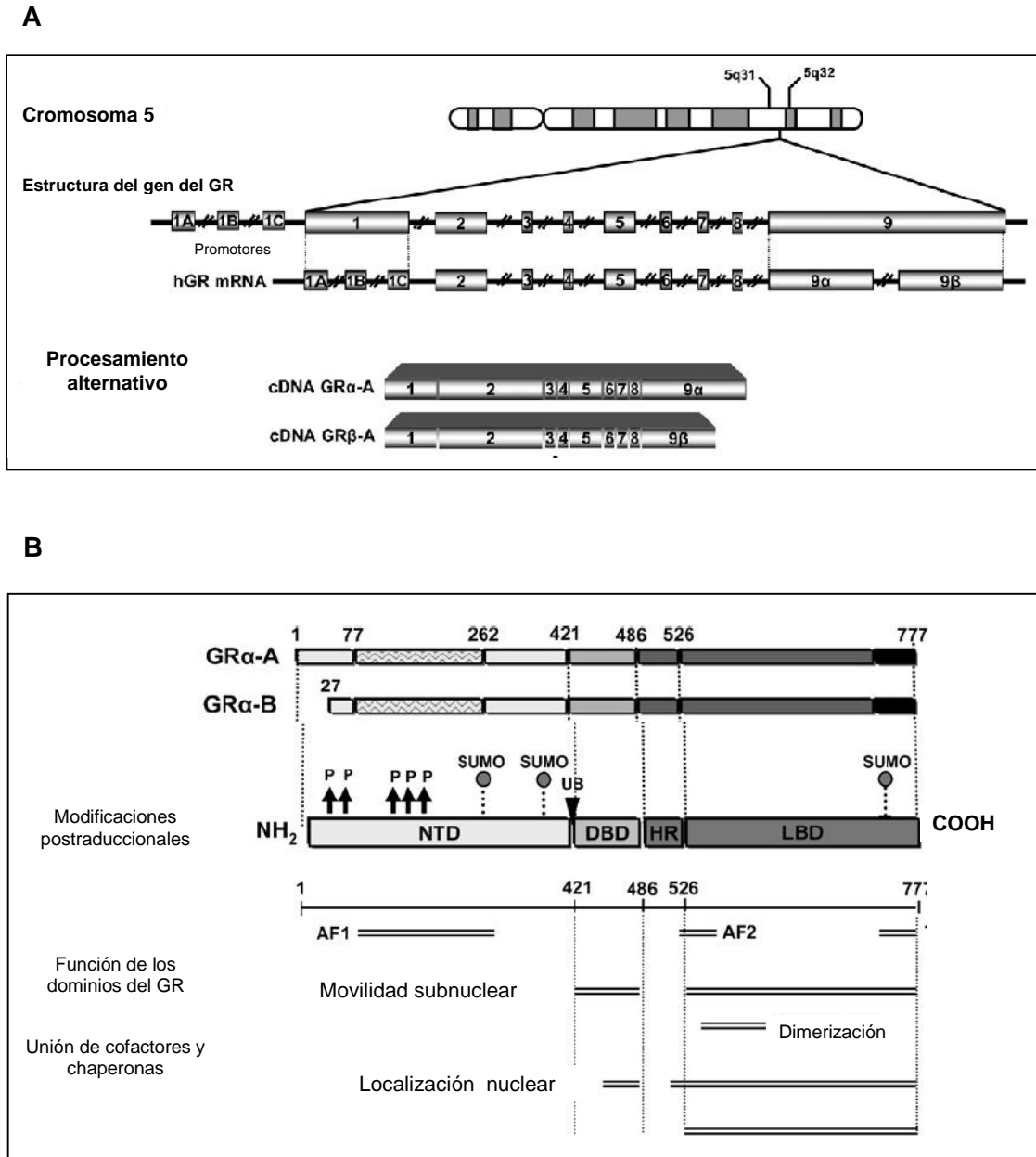


Figura 2. Receptor de glucocorticoides

A) Gen del receptor de glucocorticoides humano (hGR): localización genómica, estructura y transcritos que se obtienen por procesamientos alternativos. B) Estructura del monómero del GR y sus dominios funcionales. Se muestran las isoformas A y B generadas a partir de distintos sitios de inicio de la traducción. Se muestran las modificaciones postraduccionales en los dominios del GR: fosforilación (P), sumoilación (SUMO) y ubiquitinación (UB). Los dominios de activación transcripcional 1 (AF1) y 2 (AF2) se encuentran en el dominio N-terminal (NTD) y carboxilo terminal respectivamente. El dominio de unión a ligando (LBD) se encuentra en la porción carboxilo terminal. La región de bisagra (HR) se encuentra entre los dominios NTD y LBD. Adaptado de Duma y cols., 2006.

Uno de los propósitos de esta memoria de título es evaluar si existe relación entre la respuesta clínica a la venlafaxina (fármaco antidepresivo de acción dual: ISRS e ISRN) y polimorfismos funcionales en el GR. Los polimorfismos genéticos se definen como variaciones en un gen cuya frecuencia en la población general es mayor al 1%. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia del ADN entre los individuos de una población que puede corresponder, por ejemplo, a la sustitución, delección o inserción de un nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphism), a la repetición de una secuencia determinada del ADN, etc.

En relación al GR, se espera que cambios en la secuencia aminoacídica en cualquiera de sus dominios puedan alterar su capacidad transcripcional y, como consecuencia, provoquen alteraciones en el control negativo de la secreción de GCs (de Lange y cols., 1997). Se han descrito varias secuencias polimórficas en la región codificante del GR que alteran la función del receptor (Bray y Cotton, 2003). En el exón 2, que solamente codifica el primer dominio de transactivación, se han descrito dos cambios nucleotídicos que se presentan juntos, uno en el codón 22 y otro en el codón 23. El cambio nucleotídico en el codón 22 es silente, es decir, ambas variantes codifican el mismo aminoácido (ácido glutámico) (E22E). En cambio el polimorfismo del codón 23 da origen a un cambio aminoacídico: de arginina a lisina (R23K) (Bray y Cotton, 2003). Estos polimorfismos, conocidos como ER22/23EK, se asocian a una reducción en la supresión de la secreción de cortisol por la administración de 1 mg de dexametasona, que es un agonista sintético del GR, sugiriendo que esta resistencia se debe a una alteración del GR (van Rossum y cols., 2002). El polimorfismo N363S, codificado por el exón 2, ha sido asociado a una mayor sensibilidad a bajas dosis de dexametasona (0,25 mg) con respecto a la supresión de la secreción de cortisol (Huizenga y cols., 1998). Además, los sujetos heterocigotos presentan un mayor índice de masa corporal e ingesta de comida comparados con los homocigotos que presentan el alelo más frecuente (Di Blasio y cols., 2003). También se ha descrito el polimorfismo D641V, codificado en el exón 7, que está en el dominio de unión al ligando y en el segundo dominio de transactivación (Giguere y cols., 1986). En estudios *in vitro* se ha analizado la capacidad que tiene esta variante del GR para regular la transcripción de diferentes promotores, encontrándose una menor capacidad transactivadora, probablemente

debido a cambios en la afinidad del receptor por su ligando (de Lange y cols., 1997). En el exón 9, que también codifica el dominio de unión al ligando, se ha descrito una sustitución que codifica el polimorfismo V729I, el cual otorga al receptor una menor afinidad por la hormona con respecto a la isoforma más frecuente. Este polimorfismo se correlaciona con una menor actividad activadora de la transcripción *in vitro* (de Lange y cols., 1997).

Los antecedentes expuestos sugieren que estos polimorfismos alteran el control negativo del eje HHA ejercido por los GCs. Sin embargo, a la fecha no existe ningún estudio que relacione la respuesta farmacológica a medicamentos antidepresivos con la funcionalidad del eje HHA y algunos polimorfismos funcionales del GR.

1.5 Mecanismo de acción de fármacos antidepresivos y regulación de la expresión génica

A pesar de años de estudio, las bases biológicas de la depresión y el mecanismo preciso de la acción de los fármacos antidepresivos no están bien establecidos. Los estudios iniciales se focalizaron en cambios en la concentración de neurotransmisores y en los niveles de receptores de aminas biogénicas. Entre los antidepresivos más utilizados están los inhibidores selectivos de la recaptura de noradrenalina (ISRN) y serotonina (ISRS) en el terminal nervioso (Duman y cols., 1997). De esta manera estos fármacos inducen un aumento en los niveles de neurotransmisores en el espacio sináptico. Sin embargo, en diversos estudios se ha determinado que la acción antidepresiva de estos fármacos sólo se observa después de las tres semanas de tratamiento (D'Sa y Duman, 2002). Más recientemente se ha propuesto que los antidepresivos pueden intervenir regulando la expresión de diversos genes relacionados con la fisiología neuronal (Holsboer y Barden, 1996; Duman y cols., 1997; D'Sa y Duman, 2002).

1.6 Fármacos antidepresivos y el factor neurotrófico derivado del cerebro

Una vía importante involucrada en la sobrevida y la plasticidad celulares es la cascada cAMP-CREB, la cual es activada por tratamientos con antidepresivos mediante mecanismos aún no bien establecidos (Nibuya y cols., 1996). El factor neurotrófico derivado de cerebro BDNF (brain derived neurotrophic factor) juega un rol esencial en la regulación de la sobrevida, la diferenciación y la actividad de neuronas a través de la modulación sináptica y su expresión es controlada por la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB, cAMP response element binding protein) (Goggi y cols., 2003; Diogenes y cols., 2004). El tratamiento crónico con antidepresivos incrementa la fosforilación de CREB, activándola, y también aumenta la expresión del gen del BDNF (Nibuya y cols., 1996; Duman y cols., 1997; Duman y cols., 2000). Más aún, la administración exógena del BDNF en el hipocampo de ratas produce un efecto antidepresivo por lo cual se ha sugerido que los cambios en los niveles de esta neurotrofina son un efecto deseado en la respuesta farmacológica (Siuciak y cols., 1996). Por otro lado, el BDNF promueve la función, el crecimiento y la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas cuyos cuerpos neuronales conforman el núcleo del rafe y cuyas proyecciones se dirigen hacia regiones límbicas y corticales del cerebro (Neves-Pereira y cols., 2002). Interesantemente, uno de los principales tratamientos antidepresivos consiste en farmacoterapia con los ISRS, los que actúan justamente sobre las vías del rafe en cuyo desarrollo participa el BDNF (Neves-Pereira y cols., 2002). Finalmente, hay que destacar que los niveles del BDNF están disminuidos en diferentes tipos de estrés (Shirayama y cols., 2002) en que se ha precisado que este efecto está mediado por los GCs (Hansson y cols., 2006).

Aunque el BDNF es abundante en el sistema nervioso central, también está presente en el plasma de humanos y ratas (Radka y cols., 1996). Además está presente en el suero debido a su origen plaquetario (Yamamoto y Gurney, 1990). Sin embargo, el BDNF es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que sugiere que los niveles del BDNF en el suero pueden reflejar los niveles en el cerebro (Pan y cols., 1998). En pacientes depresivos los niveles séricos del BDNF son menores que en pacientes con terapia antidepresiva y sujetos controles (Karege y cols., 2002; Shimizu

y cols., 2003) y esta disminución se correlaciona con la severidad de la patología (Karege y cols., 2002), sugiriendo que los antidepresivos pueden incrementar los niveles del BDNF en el suero de pacientes depresivos. Interesantemente, los niveles del BDNF circulante se relacionan con la eficacia de la terapia farmacológica (Siuciak y cols., 1996).

1.7 Fármacos antidepresivos y el receptor de glucocorticoides

Los antidepresivos tricíclicos amitriptilina y desmetilimipramina (DMI) incrementan los niveles del GR en cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratas después de 2 días de tratamiento (Herr y cols., 2003). Se ha demostrado que el tratamiento crónico con el antidepresivo DMI, un ISRN, aumenta los niveles del ARNm del GR en el hipocampo de ratas (Rossby y cols., 1995).

También se ha observado una normalización funcional del eje HHA en pacientes depresivos sometidos a tratamientos farmacológicos adecuados, sugiriendo que a nivel central se recuperan los mecanismos de la retroalimentación negativa del eje mediada por los GCs (Herr y cols., 2003).

1.8 Estudios del receptor de glucocorticoides en pacientes con depresión mayor

El sistema nervioso central (SNC) se puede comunicar con el sistema inmune, y en particular con los linfocitos, mediante mecanismos neuroanatómicos, hormonales y moleculares (Gladkevich y cols., 2004). En desórdenes psiquiátricos las alteraciones observadas en los sistemas principales de neurotransmisión del SNC (dopaminérgico, noradrenérgico, serotoninérgico) así como en el eje HHA, son concomitantes con la alteración del funcionamiento y el metabolismo de los linfocitos (Gladkevich y cols., 2004). Esto sugiere que estas células son un buen medio indirecto para el estudio de desórdenes psiquiátricos y proveen una base para el entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades psiquiátricas (Gladkevich y cols., 2004). Se ha observado que los

niveles altos de cortisol en pacientes con depresión mayor, en comparación con sujetos sanos, pueden estar asociados a una disminución del GR en los linfocitos (Yehuda y cols., 1993). Destaca el hecho de que los tratamientos con antidepresivos aumentan el número de GR en los linfocitos; por lo tanto, este efecto podría constituir un elemento predictivo de su eficacia terapéutica (Calfa y cols., 2003).

De los antecedentes presentados, es pertinente destacar lo siguiente:

- En pacientes depresivos se ha observado una desregulación del eje HHA, reflejado en altos niveles de glucocorticoides circulantes.
- Diversas secuencias polimórficas en el gen de los GR están relacionadas con la actividad del receptor.
- La acción terapéutica de los antidepresivos requiere de su administración crónica, lo que sugiere su participación en cambios de plasticidad sináptica asociados a cambios en la expresión génica.
- El tratamiento crónico con antidepresivos incrementa la fosforilación de CREB y también aumenta la expresión del gen del BDNF que es regulado por CREB.
- El BDNF es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que sugiere que los niveles del BDNF en el suero pueden reflejar los niveles en el cerebro.
- Los antidepresivos regulan la expresión del gen del GR.
- El número de GR es significativamente más bajo en linfocitos de pacientes depresivos, nivel que se normaliza por el tratamiento con antidepresivos.

2 HIPÓTESIS

El tratamiento con venlafaxina (fármaco antidepresivo inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina), incrementa los niveles de los receptores de glucocorticoides (GR) y de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB) en linfocitos y los niveles sanguíneos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en pacientes con depresión mayor, cambios que se correlacionan con la respuesta clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si la respuesta clínica al tratamiento con el fármaco antidepresivo venlafaxina, se correlaciona con i) los niveles de los factores transcripcionales GR y CREB en linfocitos, ii) los niveles del BDNF en el suero y iii) las frecuencias alélicas de algunos polimorfismos del gen del GR que se sabe modifican su actividad.

Este estudio con pacientes depresivos permitirá evaluar si ciertos factores moleculares pueden contribuir a explicar la respuesta variable frente a una misma terapia farmacológica y, por lo tanto, si pueden servir como elementos predictivos de la respuesta clínica a ciertos fármacos antidepresivos.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de GR y CREB en células linfocitarias antes y durante el tratamiento con venlafaxina.
2. Determinar los niveles del BDNF en la circulación antes y durante el tratamiento con venlafaxina.
3. Determinar si ciertas variaciones polimórficas del gen del GR se encuentran con una mayor frecuencia en pacientes con depresión mayor y si existe una relación con la respuesta al tratamiento con venlafaxina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos generales

- **BioRAD Laboratories** (CA, EE.UU.): azul de bromo fenol, persulfato de amonio, Bis, *N,N'*-metilen-bis-acrilamida, acrilamida.
- **GIBCO BRL** (Carlsbad, CA, EE.UU.): suero fetal de bovino.
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): Tris-HCl, KCl, MgCl₂, NaCl, SDS, etanol absoluto (p.a.), Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, ditiotreitól, glicerol, acrilamida, glicina, Tween 20, ácido bórico.
- **Sigma-Aldrich** (Saint Louis, MO, EE.UU.): rojo Ponceau, bromuro de etidio, HEPES, EGTA, Tris-acetato, NaPPi, NaF, leupeptina, aprotinina, PMSF, NaVO₃, Triton X-100.
- **United States Biologicals** (Swampscott, MA, EE.UU.): Tris-base.
- **Invitrogen** (Carlsbad, CA, EE.UU.): TEMED, marcador de peso molecular para geles de proteínas (Bench Mark), agarosa ultra pura.

Para preparar las soluciones se utilizó agua destilada, obtenida de un equipo SCHOTT perteneciente al laboratorio.

4.2 Sujetos

En el estudio participaron 10 sujetos voluntarios sanos (4 hombres y 6 mujeres). El grupo de pacientes correspondió a veinticinco sujetos (9 hombres y 13 mujeres) entre 18 y 60 años, provenientes de la Unidad Siquiátrica del Hospital Clínico José Joaquín Aguirre de la Universidad de Chile. Se incluyeron sólo aquellos pacientes que presentaron una depresión severa de acuerdo al test de Hamilton de depresión (HAM-D), es decir, aquellos con un puntaje mayor o igual a 15 puntos en el HAM-D. Los sujetos con desórdenes siquiátricos adicionales diagnosticados por el Manual de Diagnóstico y Estadística de Desórdenes Mentales (DSM-IV) se excluyeron del estudio.

En ambos grupos de sujetos se midió la función tiroidea mediante la determinación de TSH y T4 libre y sólo se incluyeron en el estudio aquellos individuos eutiroideos (Figura 3). Se excluyeron los sujetos que presentaban otras patologías como enfermedades autoinmunes e infecciosas y enfermedades cardiovasculares y las mujeres embarazadas o con tratamiento de anticoncepción oral y reemplazo hormonal. El protocolo de este estudio clínico fue aprobado por el comité de ética del Hospital Clínico J.J. Aguirre de la Universidad de Chile. Todos los pacientes y aquellos sujetos sanos que participaron como controles firmaron un consentimiento informado.

4.3 Caracterización endocrinológica de pacientes depresivos y sujetos controles

4.3.1 Ensayo de la activación de la hipófisis con desmopresina

Los pacientes y sujetos controles se sometieron al ensayo de estimulación del sistema endocrino en el Laboratorio de Endocrinología y Reproducción del Hospital Clínico J.J. Aguirre (Dinan y cols., 2004). Este ensayo consiste en la activación de la secreción de la ACTH por la hipófisis mediante la administración sistémica de desmopresina (1-ácido-8-arginina vasopresina, abreviada como DDAVP) (Figura 3). Además, en respuesta a la ACTH, se determinó la liberación de cortisol de la corteza adrenal. Los sujetos se mantuvieron en posición de cúbito dorsal y en un ambiente tranquilo durante todo el ensayo. Se colocó un catéter en una vena del antebrazo aproximadamente a las 8:00 AM. Luego de 30 y 45 minutos se tomaron dos muestras de sangre para la determinación de ACTH y cortisol basal y posteriormente se administró un bolus de 8 mg de DDAVP. Se colectaron muestras de sangre cada quince minutos durante un período de dos horas. La presión sanguínea y el ritmo cardíaco se monitorearon durante todo el período del ensayo. La sangre colectada en ausencia de anticoagulante se centrifugó y se colectó el suero que se mantuvo a - 20°C hasta la determinación de las hormonas.

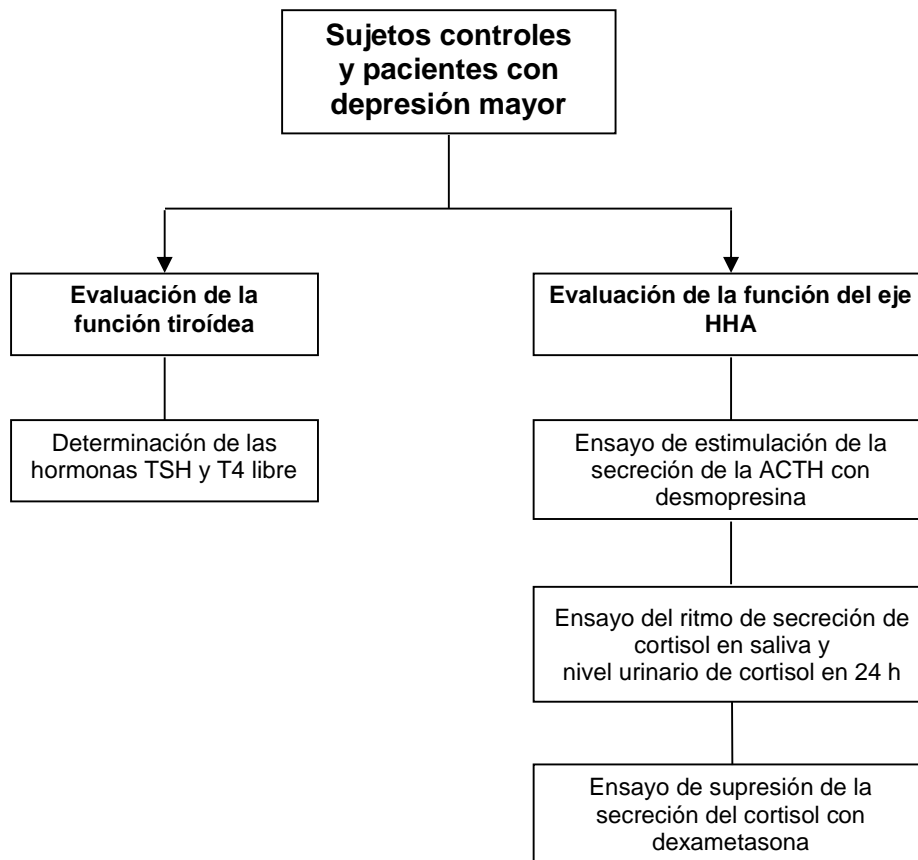


Figura 3. Evaluación de la función tiroídea y del eje HHA en sujetos controles y pacientes con depresión mayor.

Sujetos sanos y pacientes con depresión mayor, se sometieron a exámenes para medir la función tiroídea mediante la determinación de las hormonas TSH y T4 libre, de forma de incluir en el estudio sólo individuos eutiroides. Con el objetivo de examinar la funcionalidad del eje HHA, a los individuos se les practicó un ensayo de la activación de la hipófisis con desmopresina y un ensayo de supresión de la secreción del cortisol con dexametasona.

La medición del cortisol en suero se realizó en forma directa mediante un inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia competitivo en fase sólida en el equipo Inmunolite-DPC (Diagnostic Products Corporation, LA, EE.UU.). Brevemente, se incubó durante 30 min un cortisol conjugado con fosfatasa alcalina que compite con el cortisol presente en la muestra por unirse a un anticuerpo policlonal de conejo anti-cortisol adherido a una esfera de plástico. Luego de un lavado se incubó durante 10 min con un sustrato quimioluminiscente (éster de fosfato de adamantil de dioxetano). Para determinar la concentración de cortisol, la luminiscencia producida se cuantificó en un luminómetro y las cps se interpolaron en la curva de calibración provista por el sistema Inmunolite. La sensibilidad de este ensayo es 1,0 µg/dL. Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 7,3% y 6,7% respectivamente. Además se midió la concentración del cortisol urinario durante 24 horas. Las muestras de orina se trataron previamente con diclorometano y se resuspendieron en un tampón para ser procesadas de igual forma que el suero.

Los niveles de ACTH plasmática se midieron por un método quimioluminiscente inmuno-métrico (Immunolite 1000 ACTH Diagnostic Products Corporation, LA, EE.UU.). En este ensayo se tiene una esfera de plástico recubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACTH al cual se une la molécula de ACTH presente en la muestra de plasma. Posteriormente se agregó un anticuerpo policlonal anti-ACTH conjugado con fosfatasa alcalina y se incubó durante 60 min. Se lavó y se agregó el sustrato quimioluminiscente. Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 5,1% y 4,9% respectivamente.

Ambas determinaciones fueron realizadas por el personal estable del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción del Hospital Clínico J.J. Aguirre.

4.3.2 Ensayo de supresión de la secreción del cortisol mediante dexametasona

Para la determinación del ritmo circadiano de la secreción del cortisol, se realizó la medición de la hormona en saliva como un indicador del cortisol libre (Figura 3). Las

muestras de saliva se centrifugaron a 1.000 x g durante 2 min y se midió el cortisol en el sobrenadante en duplicado por el método Active Cortisol EIA (Diagnostic System Laboratories, Inc, Texas, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,01 µg/dL.

Esta determinación se realizó mediante un inmunoensayo enzimático que se basa en la competencia entre el cortisol conjugado con la peroxidasa de rábano y el cortisol presente en la saliva por la unión a un anticuerpo contra cortisol. El complejo cortisol anticuerpo es capturado por un anticuerpo anti-IgG de conejo presente en la placa de ELISA. Luego de un lavado se agregó un cromógeno y la concentración se obtuvo por la medición de la absorbancia a 450 nm. Las muestras salivales se tomaron a las 8 A.M., 3 y 11 P.M. Luego de la última toma de muestra, los sujetos ingirieron una dosis única de dexametasona (1 mg), un agonista sintético del receptor de glucocorticoides, con el objetivo de determinar la supresión de la secreción de cortisol matutino, determinado a las 8 A.M. Además se colectó una muestra de sangre postingesta de dexametasona para determinar si existe una correlación entre cambios hormonales sanguíneos con aquellos que se observan en la saliva (Figura 3). Las determinaciones fueron realizadas por el personal estable del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción del Hospital Clínico J.J. Aguirre.

4.4 Tratamiento con el antidepresivo venlafaxina

Los pacientes seleccionados recibieron una dosis de 37,5 mg/día de venlafaxina durante la primera semana, dosis que fue aumentada a 75 mg/día, durante los seis meses de tratamiento. En aquellos sujetos que no presentaron una mejoría clínica la dosis fue incrementada a 150 mg. Se realizó un seguimiento clínico durante las semanas 1, 2, 3 y 6 de tratamiento, evaluando cambios en el puntaje del HAM-D. El HAM-D utilizado considera 17 preguntas conducentes a pesquisar variaciones en el estado del ánimo, calidad del sueño, interés por realizar actividades, cambios en la actividad motora, presencia de ansiedad síquica y/o somática, cambios en la libido y en el peso. A cada respuesta se le asigna un puntaje, que indica la severidad de la depresión, y se espera que éste disminuya por el tratamiento farmacológico.

Profesionales clínicos aplicaron este test antes y durante el tratamiento (ver Figura 4). Se consideró como respuesta temprana una reducción de al menos un 25 % del puntaje inicial en el HAM-D en la primera semana de tratamiento con venlafaxina. La respuesta a la venlafaxina se definió como una reducción mayor o igual a un 50 % del puntaje inicial en el HAM-D a la sexta semana de tratamiento.

Semana	Condición	Evaluación siquiátrica
0	Sin tratamiento	Test de Hamilton HAM-D
1	Tratamiento con venlafaxina	
2		
3		
6		

Figura 4. Evaluación de la respuesta a la terapia con venlafaxina

Durante el seguimiento del tratamiento se realizaron evaluaciones siquiátricas mediante el HAM-D.

4.5 Genotipificación del receptor de glucocorticoides

Para determinar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos del GR a estudiar, se caracterizó una muestra de la población del sur de Santiago proveniente de muestras del banco de sangre del hospital Sótero del Río formada por 105 sujetos no emparentados (56 hombres y 49 mujeres). Las muestras del ADN genómico de estos sujetos fueron proporcionadas por la Doctora Luisa Herrera (Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

4.5.1 Extracción de ADN genómico

Se obtuvo ADN genómico de los pacientes y sujetos sanos de acuerdo al protocolo establecido por Lahiri y cols. (1991) a partir de 5 mL de sangre venosa colectada en presencia de 0,081 mL de EDTA 0,34 M como anticoagulante. La sangre se transfirió a un tubo plástico de 15 mL y se agregaron 5 mL del tampón de lisis TKM1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM) con 125 µL de Tritón X-100; esta solución se calentó aproximadamente unos 5 min a 55°C para disolver el detergente antes de agregarla a la sangre. Luego se mezcló por inversión para facilitar la interacción de la solución de lisis con la sangre. Se centrifugó a 384 x g (centrífuga Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) durante 10 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante por inversión y se conservó el sedimento nuclear.

El sedimento se lavó con 5 mL de tampón TKM1 y se resuspendió con una pipeta pasteur. Nuevamente se centrifugó a 384 x g durante 10 min a temperatura ambiente y el sedimento de color blanco se resuspendió suavemente en 800 µL de tampón TKM2 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 0,4 mM) y 50 µL de SDS al 10% con pipeta pasteur. Para disolver completamente el sedimento, se calentó a 55°C durante 30 min en un baño con temperatura regulada (Tetralab, Santiago, Chile) (el tiempo de resuspensión es variable y depende de la muestra). Una vez disuelto completamente el sedimento, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 300 µL de NaCl saturado (6M) y se mezcló con el fin de precipitar las proteínas, las cuales se sedimentaron por centrifugación a 1.547 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Se vertió el sobrenadante en un tubo de 15 mL y el ADN se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol al 100% a temperatura ambiente. El ADN precipitado se tomó con la ayuda de la punta de una pipeta, se transfirió a un criotubo de 2 mL y se lavó con 1 mL de etanol al 70% con el objeto de eliminar el exceso de sal. Luego de centrifugar a 1.430 x g durante 5 min a 4°C (centrífuga Biofuge 15 R, Heraeus, Alemania), el ADN sedimentado se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min y se resuspendió en 300 µL de tampón Tris-EDTA pH 7,4 (Tris-HCl 10

mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM pH 8). Se determinaron la concentración y la pureza del ADN midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Unicam, UV3, Cambridge, Inglaterra) y la integridad en un gel de agarosa 1% y bromuro de etidio 0,5 mg/mL.

4.5.2 Oligonucleótidos

Los partidores utilizados en las reacciones de PCR (Tabla 1), para el estudio de polimorfismos en el gen del receptor de glucocorticoides *NR3C1* humano, se diseñaron a partir de su secuencia genómica (GenBank NT_029289). Todos los partidores fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, EE.UU.).

4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc, EE.UU.). Se utilizó un programa consistente en: 5 min a 92°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a la temperatura de apareamiento y 1 min a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C (Tabla 2).

Las reacciones de PCR contenían dNTPs 1 mM (250 µM cada uno), MgCl₂ 3 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 0,1%, partidores 0,5 µM, 1,25 U DNA polimerasa Taq (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Los amplicones se resolvieron en geles de agarosa ultra pura con bromuro de etidio (0,25 µg/mL) en una cámara de electroforesis (Bio JSP, Santiago, Chile) con tampón TBE 1X (Tris-base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 0,5 M pH 8), conectada a una fuente de poder (Desatronic 500/500, DESAGA, Alemania). Las bandas se visualizaron en un transiluminador (Cole-Parmer Instruments, Francia) y se registraron en una cámara fotográfica digital (Power Shot S 500 Cannon, Japón).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la generación de amplicones del ADN genómico del GR

Partidor	Secuencia 5' 3'	Posición en el gen	T_m (°C)
F1	AGG GGA CAT GGC TTT TTA TTC	4278-4298	60
F3	AGG GTG CTT GCT CAG GAR AG	4517-4536	58
F3-1	AGT GTG CTT GCT CAG GAR AA	4517-4536	56
F4-1	<i>CTT</i> ACT GGG CAC AGT TTA CTG T	5356-5374	60
R1	GAA CAC TGG TCG ACC TAT TGA	4874-4854	62
R2	AGT CCA TCA CAT CTC CCY TC	4553-4534	58
R2-1	AGT CCA TCA CAT CTC CCY TT	4553-4534	56
R4-1	CCT GAA ATG GTT ACG TAC AGA T	5830-5809	62
F6	TGG CAT GCA TGA TAG AAA ATA A	109469-109490	58
F7	ACT CTA CCC TGC ATG TAC GA	109731-109750	60
F8-1	AAT GTG TTT TGT ACG GAA GTG	123112-123132	58
R6	GAT CAA AGG AAG GAA GGA GAA	110134-110114	56
R7	ACA GCA TGT GTT TAC ATT GGA	109770-109750	58
R8-1	ATT TCA CCA TCT ACT CTC CCA TCA	123650-123627	68

Los oligonucleótidos se utilizaron para la generación de amplicones del ADN genómico del GR mediante PCR. La ubicación de los oligonucleótidos está dada en base a la secuencia del gen del GR *NR3C1* (GenBank: AY436590). La temperatura de fusión (T_m) se calculó con la fórmula: $2*(A+T) + 4*(G+C)$. En cursiva se indican nucleótidos que no son complementarios al gen.

Codón	Partidores	Temperatura de apareamiento (°C)	Tabla 2. Condiciones usadas en las reacciones de PCR
22	F1, R1, R2, R2-1	62	
23	F1, R1, F3, F3-1	62	
363	F4-1, R4-1	56	
641	F6, R6, F7, R7	62	

4.5.4 Genotipificación de los codones 22 y 23 mediante PCR usando partidores específicos

Codón 22: La pareja de partidores F1-R1 (Tabla 1) permite amplificar un fragmento de 597 pb que incluye la posición de los SNPs de los codones 22 y 23 y sirve de control interno de la PCR (Tabla 2). Se realizaron dos reacciones independientes de PCR (Tabla 2) y a cada una se le agregó un partidor específico para el nucleótido (identidad) de interés (Tablas 1 y 2). El partidor R2 reconoce parte del codón 22 y en la última posición del extremo 3' lleva la C correspondiente al codón más frecuente (GAG) y, por lo tanto, se obtiene un amplicón de 276 pb sólo si la G complementaria está presente en el molde. En cambio, el partidor específico R2-1 posee la misma secuencia que R2 excepto que en su extremo 3' lleva la T complementaria a la base polimórfica de manera que sólo se obtiene un amplicón de 276 pb si está presente la A en el molde (GAA) (ver Figura 13 A).

Codón 23: Se utilizó, al igual que para el codón anterior, la pareja de partidores F1-R1 (Tablas 1 y 2). El partidor específico F3 reconoce parte del codón 23 y en la última posición del extremo 3' lleva la C correspondiente al codón más frecuente (AGG) y, por lo tanto, se obtiene un amplicón de 358 pb sólo si la G complementaria está presente en el molde. En cambio, el partidor específico F3-1 posee la misma secuencia que F3 excepto que en su extremo 3' lleva la T complementaria a la base polimórfica y, por lo tanto, sólo se obtiene un amplicón de 358 pb si está presente la A correspondiente en el molde (AAG) (ver Figura 13 A).

4.5.5 Genotipificación del codón 641 mediante PCR con pares de partidores confrontados (PCR-CTPP)

Codón 641: La PCR-CTPP (del inglés "polymerase chain reaction with confronting two-pair primers") es una estrategia de amplificación de fragmentos de ADN que utiliza en una misma reacción partidores específicos para los alelos de interés pero en direcciones opuestas y partidores comunes que delimitan la zona del ADN genómico elegido para el estudio (Hamajima y cols., 2001). La pareja de partidores F6-R6

(Tablas 1 y 2) amplifica un fragmento de 666 pb que incluye la posición del SNP y además sirve como control interno de la PCR. El partidor F7 lleva en su extremo 3' la base más frecuente (GAC). En combinación con R6, permite amplificar un fragmento de 404 pb sólo si está presente la base complementaria. En cambio, el partidor R7 posee en su extremo 3' la A complementaria a la base polimórfica (GTC) y, junto con el partidor F6, permite amplificar un amplicón de 302 pb sólo si está presente la T en la posición 2054 (ver Figura 14 A).

4.5.6 Genotipificación de los codones 363 y 729 mediante PCR y digestión con enzimas de restricción

Codón 363: La reacción de PCR de 60 µL se llevó a cabo con la pareja de partidores F4-1/R4-1 (Tablas 1 y 2) que origina un amplicón de 488 pb. Posterior a la verificación de la amplificación en un gel de agarosa al 1%, el ADN se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 6) y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Luego de una centrifugación (Biofuge 15 R, Heraeus, Alemania) a 17.860 x g durante 15 min, el ADN se resuspendió en 15 µL de agua. Se digirió con 1 U de la enzima de restricción *Tsp* 509I (New England BioLabs, Beverly, MA, EE.UU.) en bis Tris propano HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 1 mM durante 3 horas a 65°C en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc, EE.UU). Esta enzima reconoce tres secuencias AATT en el amplicón, dos que sirven como control positivo de la digestión enzimática y una correspondiente al sitio de interés. Cuando el alelo más frecuente está presente se originan fragmentos indicadores de 19 y 286 pb. Cuando el polimorfismo AGTT está presente, se pierde un sitio de corte y aparece un fragmento indicador de 305 pb (ver Figura 15 A).

Codón 729: La reacción de PCR con la pareja de partidores F8-1/R8-1 (Tablas 1 y 2) genera un fragmento de 506 pb. Luego de verificar la amplificación en un gel de agarosa al 1%, el ADN se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 6) y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Luego de una centrifugación (Biofuge 15 R, Heraeus, Alemania) a 17.860 x g durante 15 min, el ADN se resuspendió en 15 µL de agua. Se

digirió con 1 U de la enzima de restricción *HphI* (New England BioLabs, Beverly, MA, EE.UU.) en acetato de potasio 50 mM, Tris acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreitól 1 mM durante 3 horas a 37°C en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc, EE.UU.). Esta enzima reconoce la secuencia GGTGA, habiendo una presente en el amplicón que sirve como control positivo de la digestión enzimática generando fragmentos de 241 y 298 pb. Se produce un segundo corte cuando el alelo polimórfico está presente originando fragmentos de 68, 172 y 298 pb (ver Figura 16 A).

4.5.7 Secuenciación

Con el propósito de verificar los resultados de la genotipificación del GR, se secuenciaron algunos de los amplicones obtenidos por la PCR. Se purificaron los amplicones de un gel de agarosa en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 10 mM) mediante un sistema comercial de MO BIO Laboratories, Inc. (UltraClean 15 DNA Purification Kit) y se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Análisis de Biomoléculas del Centro de Equipamiento y Servicios de Apoyo Tecnológico (CESAT) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.6 Determinaciones de los marcadores periféricos durante el tratamiento

Se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero para la determinación de variaciones de los niveles del BDNF durante el tratamiento. También se colectó sangre para la obtención de linfocitos con el objeto de determinar cambios en proteínas que pudiesen servir como marcadores de la respuesta farmacológica (ver Figura 5).

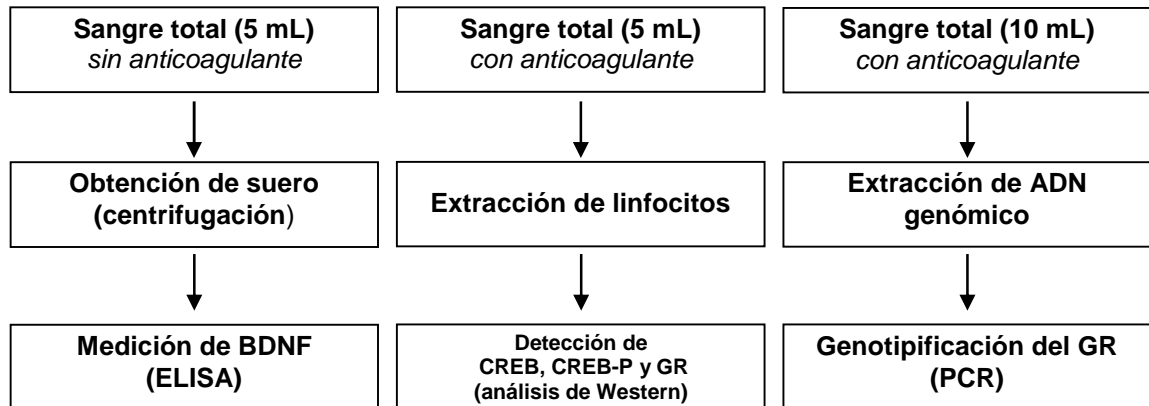


Figura 5. Procedimientos utilizados para la determinación del BDNF en suero, obtención del ADN genómico y de los linfocitos del plasma.

Las muestras de sangre se recolectaron entre las 8:00-10:00 A.M. el día 0 (antes del tratamiento) y las semanas 1, 2, 3 y 6 de tratamiento.

4.6.1 Extracción de linfocitos de sangre periférica

Se realizó según el protocolo descrito por Koch y cols. (2002). Los linfocitos se obtuvieron antes y durante el tratamiento farmacológico a partir de 10 mL de sangre periférica. La sangre se diluyó (1:1) con tampón fosfato salino PBS (NaCl 0,14 M, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4). La muestra diluida se dejó caer lentamente con una pipeta sobre 10 mL de Ficoll-Histopaque-1077 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un tubo plástico.

Se centrifugó (centrífuga Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) a 409 x g durante 20 minutos con aceleración lenta para formar un gradiente de Ficoll y sin desaceleración para no perturbarla. La fase superior obtenida corresponde a plasma y plaquetas, la inferior al Ficoll y los granulocitos, y el botón de células en el fondo del tubo corresponde a glóbulos rojos. La interfase correspondiente a la fracción

mononuclear (aproximadamente 5 mL) se retiró con pipeta automática y se diluyó en un tubo plástico con 10 volúmenes de PBS.

Luego de una centrifugación a 409 x g durante 10 min el sedimento de linfocitos se resuspendió en 10 volúmenes de tampón PBS 1X para lavar las células. El sedimento se resuspendió en 10 mL de medio completo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), NaHCO_3 24 mM, suero bovino fetal 10%, penicilina 50 U/mL y estreptomina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), glutamina 200 mM. Para separar los linfocitos de los monocitos, se sembraron las células en un frasco para cultivo celular de 50 mL (Falcon, NJ, EE.UU.) (los monocitos se adhieren al plástico). Las células se dejaron en un incubador (NUAIRE Plymouth, MN, EE.UU.) a 37°C con una corriente de CO_2 al 5% durante 3 horas. Se cosecharon las células no adheridas, se lavaron 2 veces con PBS y luego se resuspendieron en 3 mL de PBS. Para determinar la viabilidad y recuento celulares, una alícuota se diluyó 1:1 con azul de tripán 0,4 % en PBS, se colocó en una cámara de Neubauer y se contaron cuatro cuadrantes. Finalmente las células se traspasaron a criotubos, se centrifugaron a 257 x g durante 5 min a 4°C y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

4.6.2 Homogeneización de los linfocitos y cuantificación de las proteínas

Los linfocitos se homogeneizaron a 4°C en cinco volúmenes de tampón de lisis (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, ácido etilenglicol-bis-(b-aminoetil éter)-N, N, N', N'-2 etanosulfónico (EGTA) 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, ditioneitol (DTT) 0,5 mM, Na_3VO_4 0,1 mM, fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) 0,1 mM, aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NaF 0,02 mM, NaPP_i 0,025 mM y Triton X-100 1,0 %). Las muestras se sonicaron (Transsonic Digital D-78224 SinGen/HTW, ELMA, Alemania) a 4°C durante 5 min y se centrifugaron (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) a 17.860 x g durante 30 minutos a 4°C y el precipitado se desechó. En el sobrenadante se cuantificaron las proteínas mediante el método del ácido bicinonínico (Sapan y cols., 1999) usando BSA como estándar para la curva de calibración y se midió la absorbancia a 562 nm. Una vez conocida la concentración de proteínas, las muestras se desnaturaron con un tampón de carga en una relación 4:1 (Tris 250 mM pH 6,8,

SDS 5%, glicerol 6,7% v/v, DTT 0,512 mg/mL, azul de bromo fenol 13,33 mg/mL). Finalmente, las muestras se alicuotaron, se hirvieron durante 10 minutos en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc, EE.UU.) y se congelaron a -80 °C para su análisis posterior mediante Western.

4.6.3 Determinación de GR , CREB fosforilada y CREB total en extractos de linfocitos mediante análisis de Western

Se resolvieron 15 µg de proteínas y 5 µL de estándar preteñido de un rango de peso molecular de 6,0-181,8 kDa en un gel de poliacrilamida-SDS. El gel concentrador contenía 5% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1%, Tris 125 mM a pH 6,8 y el gel separador contenía Tris 375 mM pH 8,8; SDS 0,1% y 8% o 12% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) para la separación del GR y de la CREB respectivamente. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis (Mini Protean III, BioRad, EE.UU.) siendo el tampón de corrida Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, glicina 19 mM. Durante 2 a 3 horas se aplicó una diferencia de potencial de 80 V con una fuente de poder Desatronic 500/500 (DESAGA, Alemania). Luego se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.) de poro 0,2 µm en una celda de transferencia mini Trans-blot (BioRad, EE.UU.). Como tampón de transferencia se usó glicina 19 mM, Tris 2,5 mM, metanol 20%. La transferencia se llevó a cabo en una fuente con hielo (aproximadamente a 4°C); en el caso de CREB durante 2 horas a 250 mA mientras que para GR fue necesario realizar la electrotransferencia durante 10 horas a 90 mA. Como control de transferencia, las proteínas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 0,2%. Posteriormente se lavó la membrana exhaustivamente con PBS o PBS-Tween 20 (PBS-T) 0,05 o 0,1% dependiendo de las proteínas a evaluar (ver Tabla 3).

Para bloquear las uniones no específicas del anticuerpo a la membrana, ésta se incubó con agitación (agitador D56-304, Heidolph, Alemania) en leche descremada en polvo (Nestlé) al 3 % o al 5 % (dependiendo de la proteína a evaluar, Tabla 3), disuelta en PBS. Posteriormente la membrana se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo

primario diluído con la solución de bloqueo respectiva. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con una solución de PBS o PBS-T, de acuerdo al anticuerpo utilizado (ver Tabla 3), con agitación a temperatura ambiente. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante dos horas con agitación a temperatura ambiente. En todos los casos se utilizó un anti IgG de conejo (Pierce Biotechnology, IL, EE.UU.) diluído 1:10.000 en la solución de bloqueo respectiva. Nuevamente se sometió la membrana a tres lavados con una solución de PBS o PBS-T (Tabla 3) durante 5 minutos cada uno y luego se incubó con el reactivo de quimioluminiscencia durante 1 minuto (Perkin-Elmer, Boston, MA, EE.UU.). La membrana se puso en contacto con un film fotográfico BioMax (Kodak) durante distintos tiempos (entre 30 segundos y 30 minutos). El film se colocó en una solución de revelado durante 1 min y luego en una solución de fijado durante 5 min (AGFA-Gevaert, BA, Argentina).

Las bandas obtenidas en los films se analizaron mediante densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel, Automated Digitizing System Versión 4,1 Windows usando un escáner ColorPage-HR6X, Genius. Para determinar cambios semicuantitativos, los niveles de las proteínas se normalizaron respecto a la proteína constitutiva β -actina. Además los niveles de las proteínas de cada semana se normalizaron con respecto a los valores obtenidos en la semana 0.

Tabla 3. Condiciones para la determinación de proteínas por Western.

Proteína Peso Molecular	Anticuerpo 1° (conejo) Marca # Catálogo	Dilución Anticuerpo 1°	Solución de bloqueo e incubación	Solución de lavado
CREB-P 43 kDa	anti CREB-P Upstate Biotechnology 32683	1:250	Leche 3% PBS 1X	PBS 1X-0,05 %
CREB 43 kDa	anti CREB Cell Signalling 9192	1:500	Leche 3% PBS 1X	H ₂ O
GR 90 kDa	anti GR Santa Cruz SC-1002	1:200	Leche 5% PBS 1X-T 0,1%	PBS 1X-T 0,1%
Beta actina 42 kDa	anti β -actina SIGMA A 5066	1:3.000	Leche 5% PBS 1X-T 0,05%	PBS 1X-T 0,1%

4.6.4 Determinación de los niveles del BDNF en suero

Se extrajeron 5 mL de sangre venosa de los pacientes y sujetos controles en un tubo Vacutainer sin anticoagulante entre las 8:00 y 10:00 A.M. La sangre se centrifugó (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) a 1547 x g durante 15 min y el suero colectado se almacenó en tubos de polipropileno a -80°C . Los niveles del BDNF presente en el suero se determinaron mediante un sistema de inmunoensayo (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.). En este ensayo, el anticuerpo policlonal de conejo contra el BDNF humano está adherido a una micro placa que es parte del sistema comercial. Se agregaron a la placa, en duplicado, 100 μL de diluciones seriadas de solución estándar del BDNF (rango de sensibilidad entre 7,8 y 500 pg/mL) y de los sueros de los pacientes previamente diluidos con una solución provista por el sistema comercial. La placa se incubó a 4°C con agitación durante toda la noche.

Al día siguiente se realizaron cuatro lavados con el tampón de lavado provisto por el sistema comercial (100 μL en cada pocillo de la placa). Para detectar el BDNF se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BDNF biotinilado y posteriormente la placa se lavó cuatro veces. Luego se incubó durante una hora a temperatura ambiente con una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), la placa se lavó y se incubó con el sustrato de la peroxidasa durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se terminó con la adición de HCl 1N. La concentración del BDNF en las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 450 nm con un lector de ELISA automático (modelo Expert 96, Asys Hitech, Eugendorf, Austria). Para determinar la concentración del BDNF en las muestras, la absorbancia se interpoló en la curva estándar.

4.6.5 Análisis estadístico

Todos los valores corresponden al promedio \pm el error estándar de la media. Los datos se analizaron por el test ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se consideró una

significancia estadística con un $p < 0,005$. Se utilizó el programa computacional estadístico GraphPadPrisma versión 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis lo realizó la Dra. Rose Marie Fritsch, Clínica Siquiátrica, Universidad de Chile.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización clínica y endocrinológica de sujetos sanos y con depresión mayor

5.1.1 Evaluación de la función tiroídea

Existen antecedentes de que una hipofunción tiroídea puede generar una sintomatología semejante al cuadro depresivo, razón por la cual se realizó un examen clínico por un especialista endocrinólogo con el fin de descartar aquellos sujetos que presentasen anomalías en el tamaño de la glándula tiroides. Además, se midieron los niveles de las hormonas tiroideas T4 libre (T4_L) y hormona estimulante de la tiroides (TSH) en todos los sujetos invitados a participar en el estudio. Sólo se incorporaron al estudio aquellos sujetos que presentaron niveles de T4_L y de TSH en el rango normal (0,78-2,1 ng/dL; 0,465-4,68 μ UI/mL respectivamente).

5.1.2 Evaluación del eje HHA en sujetos sanos y depresivos

Se ha descrito que aproximadamente el 50 % de los pacientes que sufren de depresión presentan niveles elevados de cortisol que a veces se deben a una hiperactividad del eje HHA (D'Sa y Duman, 2002). Por este motivo, a los pacientes con depresión mayor (DM) se les realizó un estudio de la función del eje HHA antes de comenzar el tratamiento antidepresivo con venlafaxina.

En la Tabla 4 se observa que el promedio de la edad es similar en sujetos depresivos y sujetos del grupo control. El índice de masa corporal (IMC) también es similar en sujetos depresivos y del grupo control, estando los valores en el rango de normalidad

(<27 kg/m²). Además, el nivel de cortisol libre en la orina recolectada durante 24 horas es similar en ambos grupos, encontrándose en el rango normal (<100 µg/dL). Los

Tabla 4. Características clínicas y endocrinológicas de sujetos sanos y pacientes con depresión mayor.

Grupo	Edad (años)	T _{4L} ng/dL	TSH µUI/mL	IMC (kg/m ²)	Cortisol urinario 24 h (µg/dL)	Ritmo secreción cortisol salival (µg/dL)			TSD (µg/dL)
						8 AM	3 PM	11 PM	
Depresivo n=18	42,4±2,9	1,1	1,9	25,9±1,0	56,3±7,5	0,68±0,1	0,37±0,05	0,17±0,01 ^a	<0,1 (12/15)
Control n=10	37,3±3,1	1,2	1,8	24,7±0,5	56,3±9,2	0,85±0,1	0,32±0,04	0,14±0,02 ^b	0,1 (10/10)

La función tiroidea fue evaluada mediante la determinación de los niveles de las hormonas T4 libre (T_{4L}) y TSH. El rango normal de las hormonas tiroideas es de 0,78-2,1 ng/dL para la T_{4L} y 0,465-4,68 µUI/mL para la TSH. Se midieron los niveles de cortisol libre en la orina colectada durante 24 horas, mediante un método de inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia competitivo en fase sólida considerándose < 100 µg/dL como valores normales del cortisol urinario. El ritmo de secreción de cortisol libre se evaluó en la saliva haciendo mediciones a las 8, 15 y 23 horas, mediante la técnica de ELISA. En el test de supresión con dexametasona (TSD) se midió el cortisol salival a la mañana siguiente postingesta de 1 mg de dexametasona (11 PM), considerándose valores < 0,5 µg/dL como supresión de la secreción del cortisol. Los valores representan el promedio ± error estándar de la media. Se consideró que el valor normal para el índice de masa corporal (IMC) es < 27 kg/m².

sujetos con DM presentaron un ritmo de secreción de cortisol libre en la saliva similar al grupo control; en ambos grupos los niveles son altos en la mañana y declinan en la noche (Tabla 4). Además, los pacientes y sujetos controles suprimieron la secreción diurna del cortisol luego de la ingesta de 1 mg de dexametasona.

La secreción de cortisol de la corteza adrenal se inicia con la liberación de la hormona CRH de las células del PVN (Lucassen y cols., 2001). Ésta, a su vez, estimula la secreción de ACTH de la hipófisis anterior a través de sus receptores CRH1 (Lucassen y cols., 2001). Más aún, se ha descrito que la arginina vasopresina liberada del núcleo supraóptico y de neuronas del PVN, al ser transportada por la vía porta-hipofisiaria, estimula la secreción de ACTH al unirse a su receptor V3 (v1b) ubicado en la hipófisis anterior y actúa sinérgicamente con CRH en la liberación de la ACTH (Volpi y cols., 2004). En este estudio, se utilizó desmopresina (DDAVP), un análogo de la arginina vasopresina, para evaluar la función del eje HHA.

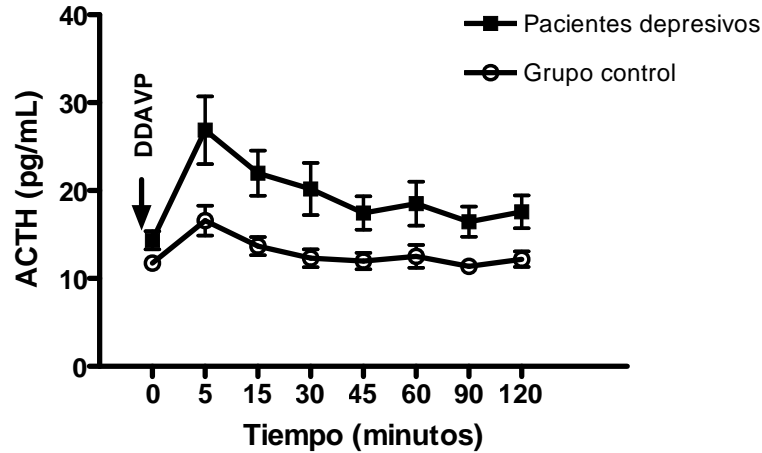
En la Figura 6 se observa el curso temporal de la secreción de la ACTH y del cortisol después de la infusión de DDAVP en un único bolus, en muestras obtenidas cada quince minutos durante un período de dos horas. En ambos grupos de sujetos se observa un aumento de la secreción de la ACTH luego de 15 min de la infusión de DDAVP. El aumento de la secreción del cortisol se observa luego de 30 min, lo que está de acuerdo con la liberación previa de la ACTH. Los pacientes presentan una mayor secreción inducida de la ACTH y del cortisol en comparación con el grupo control. Esto sugiere que los pacientes con DM tienen una mayor sensibilidad a DDAVP.

5.2 Respuesta clínica al tratamiento con venlafaxina y su correlación con parámetros endocrinos

5.2.1 Evolución de la respuesta clínica

Los pacientes ingresados al estudio sufrían una depresión severa, lo que significa que presentaban un puntaje mayor o igual a 15 puntos en el test de Hamilton.

A



B

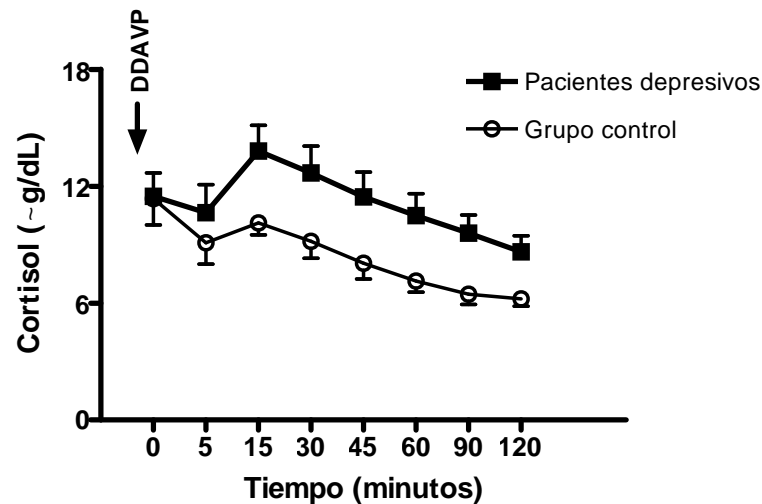


Figura 6. Secreción de la ACTH y del cortisol en respuesta a la activación de la hipófisis con desmopresina (DDAVP).

Los pacientes con DM (n=18) y los sujetos controles (n=10) recibieron una infusión sistémica de 8 mg de DDAVP. Las muestras de sangre se recolectaron cada 15 min durante 2 h. **A)** Respuesta temporal de la secreción de ACTH durante el ensayo. La determinación de los niveles de la ACTH se hizo en el plasma mediante un método quimioluminiscente inmunométrico. **B)** Respuesta temporal de la secreción del cortisol durante el ensayo. Los niveles del cortisol se midieron en suero por un método de inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia competitivo en fase sólida. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la media.

Durante el tratamiento con venlafaxina, se midió el grado de recuperación a través de la evolución en el puntaje del test de HAM-D. Aquellos pacientes que presentaron una reducción en el puntaje del HAM-D $\geq 25\%$ en la primera semana de tratamiento, fueron considerados como respondedores tempranos al tratamiento con venlafaxina.

En la Figura 7, se observa que los sujetos con DM responden con dos patrones diferentes a la terapia con el antidepresivo. El 61 % de los sujetos respondieron tempranamente a la venlafaxina; los restantes, considerados como respondedores tardíos al tratamiento, comenzaron a reducir significativamente su puntaje luego de la segunda semana de tratamiento. Las diferencias en la rapidez de la respuesta en ambos grupos no se deben a diferencias en la edad o el género y tampoco a diferencias en el puntaje inicial y final en el HAM-D (Tabla 5). Ambos grupos respondieron a la terapia luego de seis semanas de tratamiento considerándose como respuesta una reducción $\geq 50\%$ en el puntaje inicial del HAM-D. Por otro lado, ambos grupos de pacientes presentaron cuadros depresivos previos.

En la Tabla 6 se observa que ambos grupos de pacientes presentan valores similares del IMC, los que no difieren de los del grupo control. El IMC de estos sujetos indica ausencia de obesidad media a severa. Además, el cortisol en orina de 24 horas es similar en ambos grupos de respondedores, está en el rango normal y no difiere del grupo control (Tabla 6). El ritmo de secreción de cortisol determinado en la saliva fue similar en ambos grupos de pacientes y no difiere del registrado para el grupo control. Los pacientes con depresión mayor, tanto del grupo que responde tempranamente como del que responde tardíamente al tratamiento, suprimen la secreción del cortisol por dexametasona (Tabla 6).

Con el objetivo de pesquisar diferencias en la regulación del eje HHA entre los dos grupos de pacientes, se comparó la secreción de la ACTH y del cortisol inducida por la DDAVP entre respondedores tempranos y tardíos. En la Figura 8A y en la Tabla 7 se observa que la secreción de la ACTH basal es significativamente mayor en los sujetos respondedores tardíos al ser comparados con los respondedores tempranos y el grupo control. Además, frente a la infusión de DDAVP, se observa que los respondedores

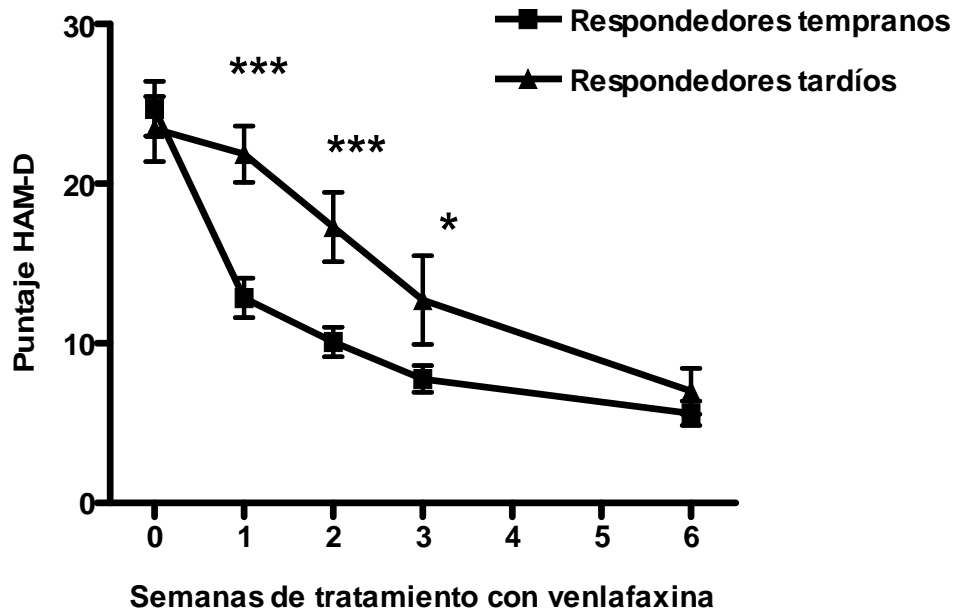


Figura 7. Respuesta clínica de los pacientes depresivos al tratamiento con venlafaxina.

Se muestran los cambios en el puntaje del HAM-D durante el tratamiento con venlafaxina. De 18 pacientes, 11 son considerados como respondedores tempranos por la reducción del puntaje del HAM-D en un 25% en la primera semana de tratamiento. Los 7 pacientes restantes se consideraron respondedores tardíos al tratamiento con venlafaxina porque reducen significativamente su puntaje inicial del HAM-D a la segunda semana de tratamiento. Ambos grupos se consideraron respondedores al tratamiento por la reducción del puntaje inicial en, a lo menos, un 50%. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la media.

*** $p < 0,008$; ** $p < 0,02$; * $p = 0,055$ vs respondedores tempranos.

Tabla 5. Composición de los grupos de pacientes con depresión mayor y clasificación según la respuesta clínica a la venlafaxina.

Parámetros	Respondedores tempranos	Respondedores tardíos	Estadística
Número	11	7	
Edad, años ^a	39,4 (24-57)	47,1 (23-59)	p=0,1999
Género ^b			
Mujeres	8	2	p=0,214
Hombres	3	5	
HAM-D inicial ^a	25,1 (16-31)	23,4 (16-30)	p=0,5188
HAM-D final ^a	8,4 (2-16)	7,0 (1-13)	p=0,5042

La respuesta temprana al tratamiento con venlafaxina fue definida como una reducción 25% del puntaje inicial en el HAM-D a la primera semana de tratamiento. ^aLos datos representan el valor promedio, en paréntesis se muestra el rango y los datos se analizaron mediante el test de Student de dos colas. ^bLos datos se expresan como porcentaje del número total de sujetos de cada grupo y fueron analizados con el test de probabilidad. Los valores con un p < 0,05 se consideran estadísticamente significativos.

Tabla 6. Características clínicas y endocrinológicas de sujetos sanos y de pacientes depresivos respondedores tempranos y tardíos.

Grupo	IMC (kg/m ²)	Cortisol urinario de 24 h (µg/dL)	Ritmo secreción cortisol salival (µg/dL)			
			8 AM	3 PM	11 PM	TSD
Respondedor temprano (n=11)	26,2±1,3	65,4±9,2	0,80±0,17	0,40±0,04	0,30±0,08 ^a	0,13±0,02 ^d
Respondedor tardío (n=7)	25,4±1,8	39,9±11,4	0,69±0,15	0,30±0,04	0,10±0,01 ^b	0,10±0,00 ^e
Control (n=10)	24,7±0,5	56,3±9,2	0,85±0,10	0,32±0,04	0,14±0,02 ^c	0,11±0,01 ^f

La función tiroidea fue evaluada mediante la determinación de los niveles de las hormonas T4 libre (T_{4L}) y TSH. El rango normal de las hormonas tiroideas es de 0,78-2,1 ng/dL para la T_{4L} y 0,465-4,68 µUI/mL para la TSH. Se midieron los niveles de cortisol libre en la orina colectada durante 24 horas, mediante un método de inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia competitivo en fase sólida considerándose < 100 µg/dL como valores normales del cortisol urinario. El ritmo de secreción de cortisol libre se evaluó en la saliva haciendo mediciones a las 8, 15 y 23 horas, mediante la técnica de ELISA. En el test de supresión con dexametasona (TSD) se midió el cortisol salival a la mañana siguiente postingesta de 1 mg de dexametasona (11 PM), considerándose valores < 0,5 µg/dL como supresión de la secreción del cortisol. Los valores representan el promedio ± error estándar de la media. Se consideró que el valor normal para el índice de masa corporal (IMC) es < 27 kg/m².

^ap<0,001 vs 8 AM; ^bp<0,01 vs 8 AM; ^cp<0,0002 vs 8 AM. Análisis con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

^dp<0,0003 vs 8 AM; ^ep<0,012 vs 8AM; ^fp<0,001 vs 8 AM. Análisis con el test de t para datos pareados.

tardíos presentan un δ -ACTH (pico máximo de secreción menos la basal) mayor que los sujetos respondedores tempranos y que el grupo control (Figura 8A y Tabla 7). Por otro lado, el cortisol basal no fue diferente en los tres grupos. Luego de la infusión de DDAVP, se observa un aumento de la secreción del cortisol a los 15 min, siendo el δ -cortisol significativamente más alto en los grupos con depresión con respecto al grupo control (Figura 8B y Tabla 7).

En la Tabla 7, al comparar sólo los grupos de pacientes depresivos, se observa que los sujetos respondedores tardíos presentan un nivel de ACTH basal significativamente más alto que los respondedores tempranos, un aumento, aunque no significativo, de δ -ACTH y un incremento significativo en el área bajo la curva (ABC) de ACTH luego de la infusión de DDAVP.

5.2.2 *Relación entre la respuesta a DDAVP y la remisión clínica*

De los 18 pacientes en el estudio, 8 remiten, es decir, a la sexta semana de tratamiento presentan un puntaje en el HAM-D ≤ 7 (Tabla 8). No existe relación entre la remisión y el género. Por otro lado, aquellos sujetos que presentan un puntaje en el HAM-D inicial menor son justamente los que remiten (Tabla 8); sugiriendo que los sujetos con mayor puntaje en el HAM-D presentan mayor sintomatología residual. Por otro lado, los sujetos que no remiten presentaron niveles basales más altos de ACTH y cortisol, estando estas diferencias cercanas a ser significativas ($p=0,054$).

En resumen, la respuesta al fármaco está relacionada con una alteración en la función del eje HHA. Esta anomalía, que ya se ha descrito en la DM (Calfa y cols., 2003), ha sido atribuída, en parte, al papel que cumplen los receptores de glucocorticoides encargados de medir los niveles del cortisol en el cerebro.

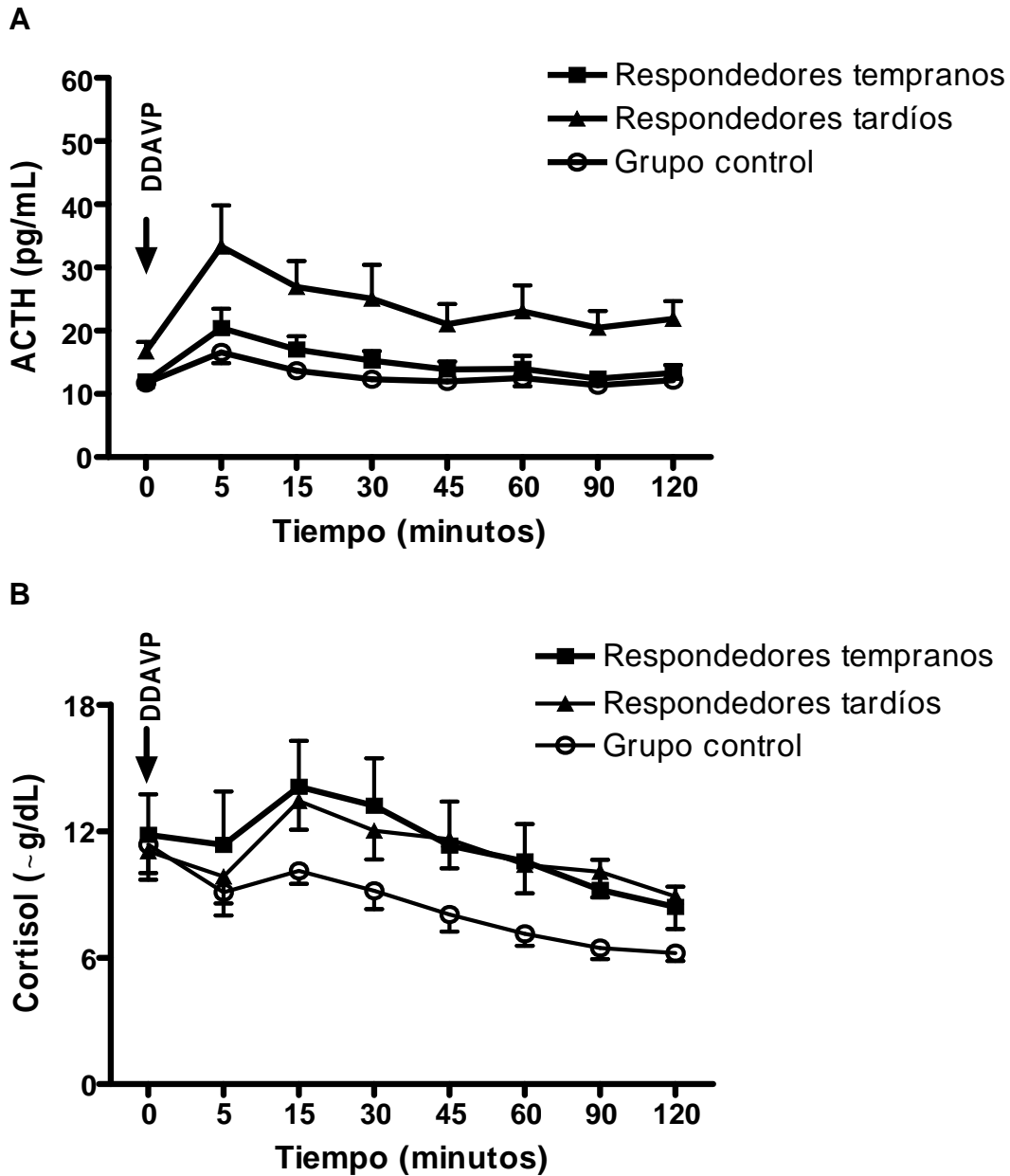


Figura 8. Secreción temporal de la ACTH y del cortisol en respuesta a una inyección de DDAVP en pacientes respondedores tempranos y tardíos.

Los pacientes fueron clasificados como respondedores tempranos y tardíos de acuerdo a la reducción en el HAM-D durante el tratamiento con venlafaxina. De acuerdo a esto, se comparó la secreción de la ACTH y del cortisol en respuesta a la infusión con DDAVP entre ambos grupos. **A)** Respuesta temporal de la secreción de ACTH durante el ensayo. La determinación de los niveles de la ACTH se hizo en el plasma mediante un método quimioluminiscente inmunométrico. **B)** Respuesta temporal de la secreción del cortisol durante el ensayo. Los niveles del cortisol se midieron en suero por un método de inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia competitivo en fase sólida. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la media.

Tabla 7. Niveles del cortisol y la ACTH en respuesta a una inyección de DDAVP.

Grupo	ACTH Basal pg/mL	ACTH ABC pg/mL/min	δ ACTH pg/mL	Cortisol Basal μ g/dL	Cortisol ABC μ g/dL/min	δ Cortisol μ g/dL
Respondedor temprano	11,8 (9-16,9)	1738 (1221-2445)	8,3 (0-27,5)	9,7 (6-17,5)	926 (620-1842)	2,7 ^a (0-7,8)
Respondedor tardío	16,7 ^b (9-22,9)	2846 ^{c,d} (1545-3938)	20,5 ^{e,f} (4,6-57,7)	11,0 (6,5-15,6)	1293 (663-1709)	2,9 ^g (0-6,1)
Control	11,7 (10-16,5)	1540 (1204-1862)	5,0 (0,1-10,7)	11,4 (5,5-15,3)	913 (772-1150)	0,2 (0-3,5)

Los datos representan los valores promedios y en paréntesis se muestra el rango. La diferencia entre los grupos respondedores tempranos y tardíos fue determinada mediante el análisis del test de Student de dos colas. El análisis de los dos grupos de pacientes respecto al grupo control, se realizó mediante el test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del análisis de Dunns. Se calculó el área bajo la curva (ABC) para la secreción de la ACTH y del cortisol correspondiente a los 20 min del ensayo. Además se calculó la diferencia entre el pico máximo de secreción y el nivel basal (δ) para la secreción de la ACTH (δ ACTH) y del cortisol (δ cortisol).

^ap < 0,01 vs grupo control; ^bp= 0,005 vs respondedores tempranos; ^cp<0,001 vs respondedores tempranos ; ^dp < 0,01 vs grupo control; ^ep < 0,05 vs grupo control; ^fp< 0,005 vs respondedores tempranos; ^gp<0,01 vs grupo control.

Table 8. Niveles del cortisol y la ACTH en pacientes que remiten y no remiten durante el tratamiento con venlafaxina.

Parámetros	Sin remisión	Con remisión	Estadística
	Media	Media	
Edad (años)	43,1 (24-59)	41,5 (23-58)	p=0,7933
^a Género			
Mujeres	6	4	p=0,914
Hombres	4	4	
HAM-D inicial	28,6 (22-31)	21,1 (16-23)	p=0,0003
HAM-D final	11,2 (8-16)	5,1 (1-6)	p=0,0002
ACTH basal (pg/mL)	15,1 (10-22,9)	11,9 (9-17,3)	p=0,0602
δ-ACTH (pg/mL)	7,2 (0-17,6)	20,3 (2,9-57,7)	p=0,0301
ACTH ABC (pg/mL/min)	1969 (1221-3938)	2458 (1572-4435)	p=0,1439
Cortisol basal (µg/dL)	11,4 (6,8-17,5)	8,7 (6-15,6)	p=0,0542
δ-Cortisol (µg/dL)	2,2 (0-5,3)	3,4 (0-7,8)	p=0,148
Cortisol ABC (µg/mL/min)	1140 (620-1709)	1191(662-1690)	p=0,3869

Los datos representan el valor promedio y en paréntesis se muestra el rango; los datos se analizaron mediante el test de Student de dos colas. ^aLos valores se expresan como el porcentaje del total de sujetos en el grupo y se analizaron con un test de probabilidad. Los valores con un p 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

ABC: área bajo la curva

5.3 Búsqueda de marcadores periféricos que se correlacionen con la respuesta al tratamiento con venlafaxina

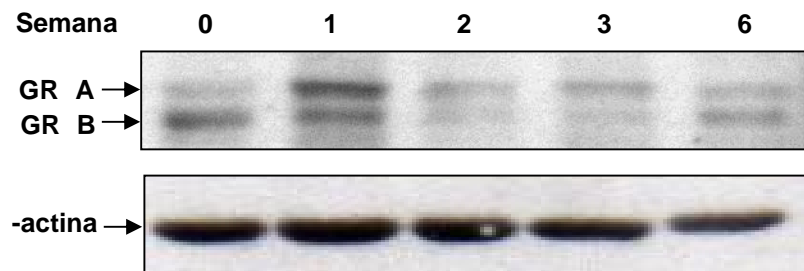
Existen antecedentes de que los glucocorticoides inhiben la expresión del gen del BDNF, la cual se ha implicado en neuroprotección. En los últimos años se han buscado tanto posibles marcadores periféricos y genéticos en pacientes depresivos que entreguen información acerca de la etiopatología del cuadro depresivo como variaciones durante la evolución clínica durante el tratamiento con antidepresivos (Koch y cols., 2002). Se ha observado que los niveles del GR en linfocitos (Herr y cols., 2003) y del BDNF en el suero se encuentran disminuidos en estos pacientes (Aydemir y cols., 2005). Además se ha descrito que los antidepresivos son capaces de restaurar los niveles de estas proteínas (Aydemir y cols., 2005; Herr y cols., 2003; Koch y cols., 2002). Por lo tanto, es pertinente determinar cambios en los niveles del GR y el BDNF durante el tratamiento con venlafaxina y correlacionarlos con la respuesta clínica.

5.3.1 *Isoforma del receptor de glucocorticoides (GR) en linfocitos*

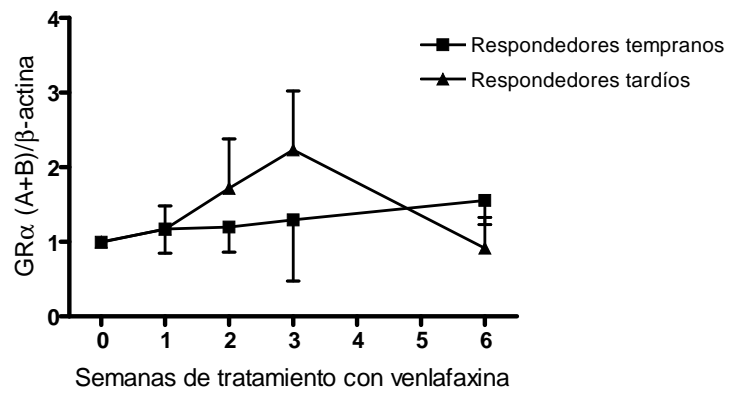
Se ha observado que en pacientes con DM los niveles altos de cortisol pueden estar asociados a una disminución del GR en linfocitos (Yehuda y cols., 1993) y, por lo tanto, el efecto producido por los antidepresivos sobre el GR de los linfocitos puede ser predictivo de la eficacia terapéutica.

En la Figura 9 se muestra la variación temporal de los niveles del GR en linfocitos antes y durante el tratamiento con venlafaxina. En la Figura 9A, se muestra un gel representativo de extractos totales de linfocitos de un paciente, en el que se observan dos bandas de alrededor de 90 kDa correspondientes a las isoformas A y B del GR que se generan por el inicio de la traducción en dos codones diferentes (Hollenberg y cols., 1985). Estas isoformas no fueron siempre distinguibles una de la otra en todos los sujetos. Por este motivo, para determinar cambios semicuantitativos en el GR, se consideró la suma de la intensidad de las bandas A y B como el nivel total para esta

A



B



C

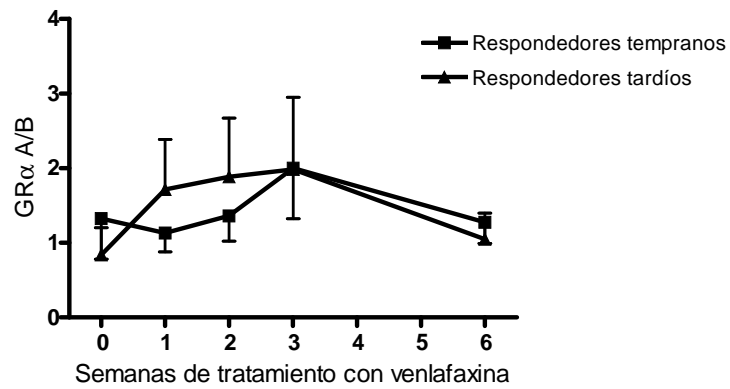


Figura 9. Niveles del GR en extractos de linfocitos de pacientes con DM durante el tratamiento.

A) Se muestra un gel representativo de las isoformas A y B de un paciente respondedor temprano al tratamiento mediante análisis de Western. **B)** Los datos se normalizaron respecto a la β -actina. Para cada paciente se realizó una normalización respecto al día 0 para visualizar variaciones durante el tratamiento. **C)** Razón de las intensidades de las isoformas A y B del GR .

proteína, el cual se normalizó respecto a la β -actina. Dado que estas mediciones son relativas, se realizó para cada paciente una normalización respecto al día 0, para visualizar variaciones durante el tratamiento.

En la Figura 9B se observa que en los pacientes respondedores tempranos a venlafaxina los niveles del GR se mantienen durante las semanas de tratamiento. En cambio, en los respondedores tardíos los niveles del GR tienden a aumentar a la segunda y tercera semanas, valores que declinan en la cuarta semana. Además, para los pacientes en que se pudieron determinar ambas isoformas del GR , se determinó la razón entre ellas ($GR\ A / GR\ B$). En la Figura 9C se observa que en los pacientes respondedores tardíos (n=4) esta razón aumenta en las semanas 1-3 de tratamiento. En cambio, en los pacientes respondedores tempranos (n=11) la razón disminuye durante estas tres semanas. En ambos grupos los valores vuelven a niveles basales a la sexta semana de tratamiento. Sin embargo, las diferencias mencionadas no logran una significancia estadística.

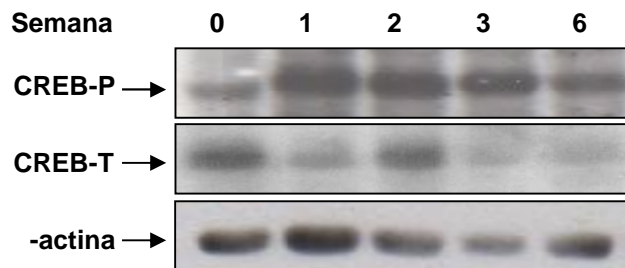
5.3.2 *CREB fosforilada y CREB total en linfocitos*

Se ha demostrado que la administración crónica de diferentes fármacos antidepresivos incrementa los niveles del factor transcripcional CREB y su activación por fosforilación por un mecanismo aún no bien establecido (Nibuya y cols., 1996). Ello sugiere que esta proteína es un blanco intracelular común de estos fármacos.

En la Figura 10A se muestra un gel representativo de muestras de un paciente en el que se observan las bandas correspondientes a CREB total (42 kDa) y a su forma

fosforilada (CREB-P). En la Figura 10B se observa, en ambos grupos de pacientes, un aumento, aunque no significativo, en los niveles de CREB total en relación a la β -actina en la primera semana, existiendo una tendencia a sostener este aumento en la segunda y tercera semanas sólo en los respondedores tardíos. En la Figura 11A se observa, en la primera semana de tratamiento, un aumento en la razón de CREB-P/CREB total sólo en los pacientes respondedores tempranos, valores que declinan hasta llegar a niveles semejantes a los

A



B

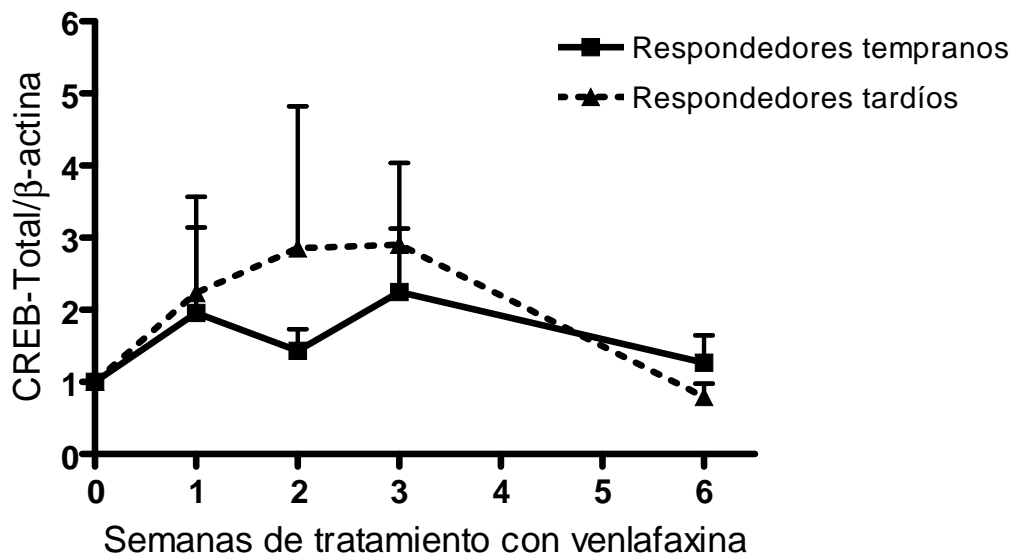
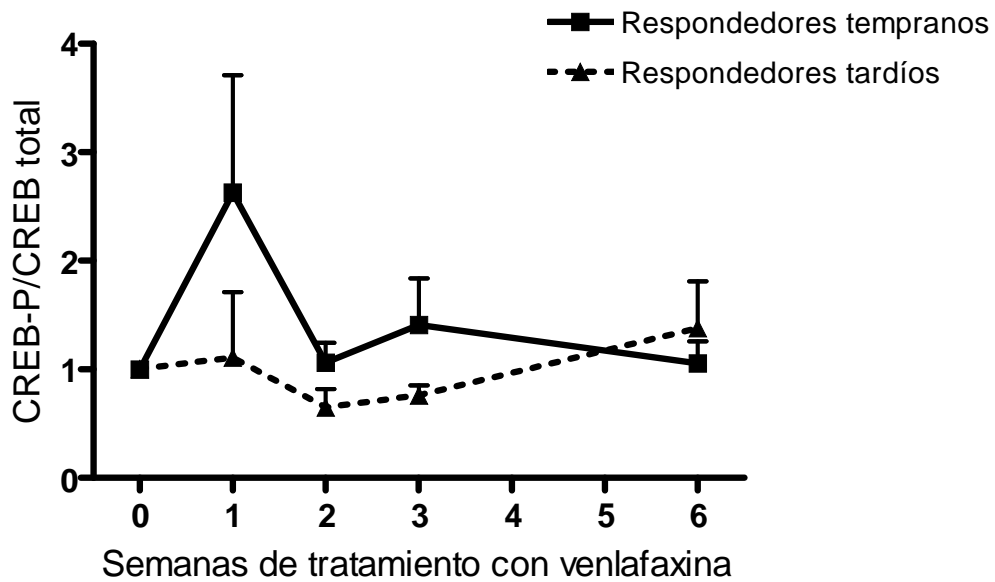


Figura 10. Niveles de la CREB en extractos de linfocitos de pacientes con depresión mayor durante el tratamiento.

A) Imágenes representativas de la detección de CREB fosforilada y total en extractos de linfocitos de un paciente respondedor temprano al tratamiento mediante análisis de Western. **B)** Cuantificación de las variaciones en la relación de CREB total/ β -actina. CREB-P: CREB fosforilada, CREB-T: CREB total

A



B

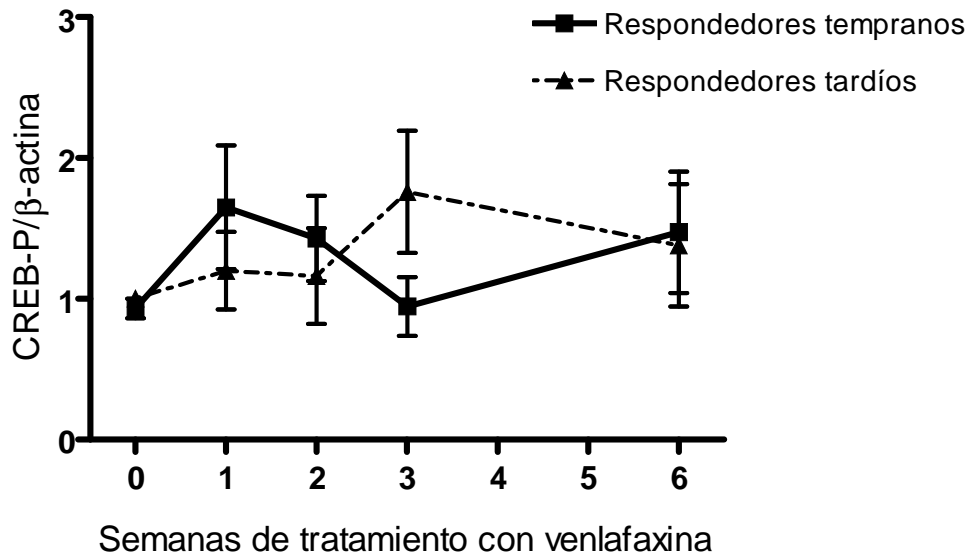


Figura 11. Variaciones de los niveles de CREB-P durante el tratamiento en relación al nivel total de CREB y al de β -actina.

A) Cuantificación de las variaciones de CREB-P en relación a CREB total y **B)** cuantificación de las variaciones de CREB-P en relación a la β -actina a partir de las señales detectadas por análisis de Western.

observados antes del tratamiento. No hay cambios durante el tratamiento en los niveles de CREB-P con respecto a la β -actina en ambos grupos de pacientes (Figura 11B).

Uno de los principales genes blancos de la acción de CREB-P es el gen del BDNF. El tratamiento crónico con algunos antidepresivos incrementa la fosforilación de la CREB y también aumenta la expresión del gen del BDNF (Nibuya y cols., 1996; Duman y cols., 1997; Duman y cols., 2000). Sin embargo, aunque no se observaron cambios en los niveles de CREB ni de su forma activa, se determinó la variación del BDNF durante el tratamiento, considerando el hecho de que los GCs median la disminución del BDNF (Hansson y cols., 2006).

5.3.3 Niveles séricos del BDNF

Se ha determinado que los pacientes que sufren de depresión mayor presentan niveles bajos de BDNF en el suero (Karege y cols., 2002; Shimizu y cols., 2003). Aunque el BDNF es producido fundamentalmente en el sistema nervioso central, puede ser detectado en el plasma y en el suero de humanos (Yamamoto y Gurney, 1990). El BDNF producido en el cerebro es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que sugiere que los niveles periféricos del BDNF pueden reflejar los niveles en el cerebro (Pan y cols., 1998). Además, se ha descrito que el tratamiento con antidepresivos puede incrementar los niveles del BDNF en el suero de pacientes depresivos (Siuciak y cols., 1996).

En la Figura 12 se observa que sólo en la segunda semana de tratamiento existen diferencias significativas en los dos grupos de pacientes. En los pacientes

respondedores tempranos se observa un aumento de los niveles del BDNF en la primera semana de tratamiento, valores que se mantienen durante la segunda semana. En cambio, en los pacientes respondedores tardíos se observa un aumento de los niveles del BDNF en la primera semana de tratamiento, los cuales declinan a la segunda semana, alcanzando valores semejantes a los observados sin tratamiento farmacológico.

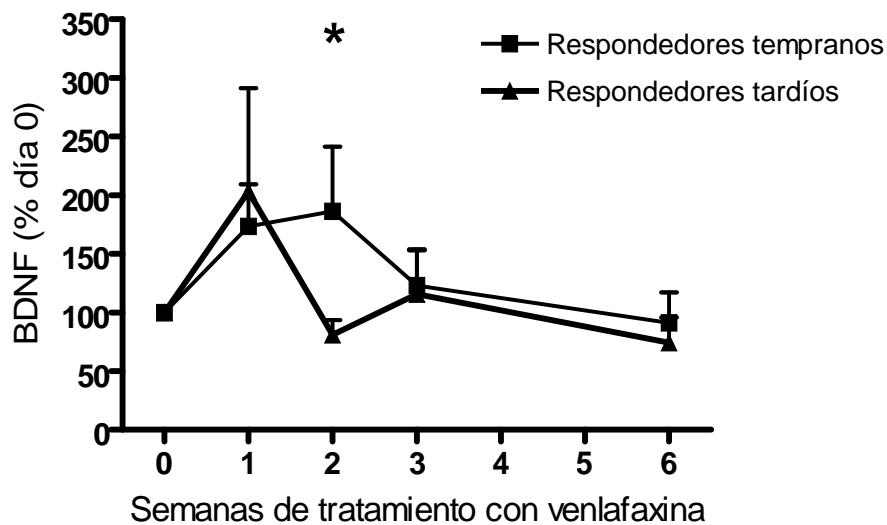


Figura 12. BDNF en suero de pacientes con depresión mayor durante el tratamiento.

Los niveles del BDNF se determinaron por inmunoensayo y se expresan como porcentaje del nivel observado antes del tratamiento (día 0).

* $p < 0,05$ vs respondedores tardíos.

5.4 Estudio de polimorfismos del gen del receptor de glucocorticoides

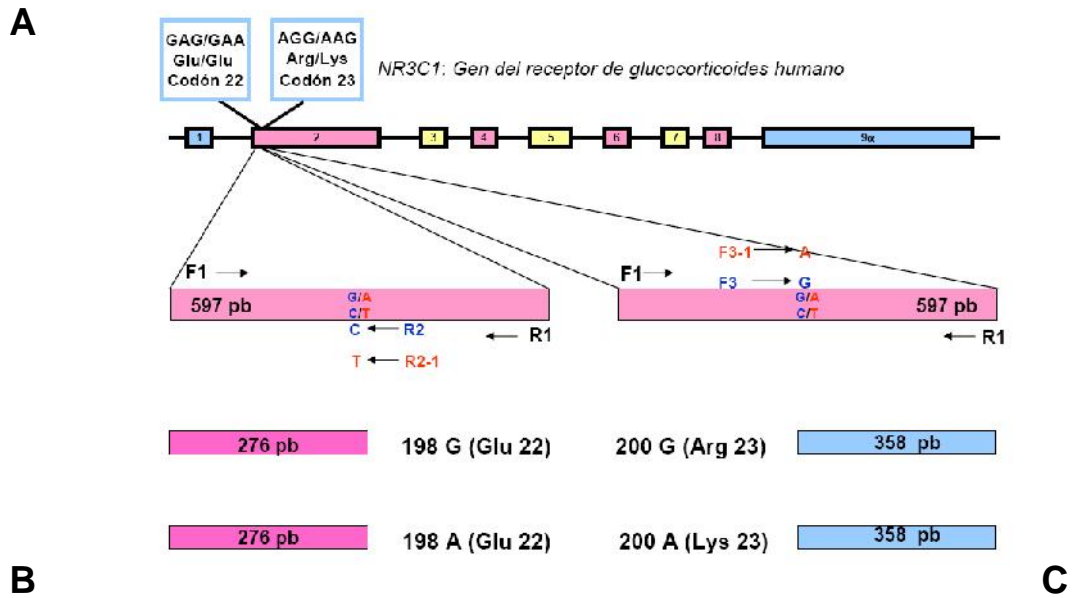
Uno de los factores de riesgo involucrados en la depresión mayor es la presencia de polimorfismos en ciertos genes. En las últimas décadas se han descrito varios polimorfismos en el gen *NR3C1*. Estos polimorfismos se encuentran en regiones codogénicas asociadas a los dominios funcionales del GR, alterando su actividad transcripcional. Debido a que aproximadamente un 50% de los pacientes con depresión mayor poseen una mayor actividad del eje HHA, es factible entonces que variaciones alélicas del gen del GR correspondan a un factor de riesgo genético de la DM, posiblemente al generar variantes del GR con una actividad alterada.

5.4.1 Genotipificación de los codones 22 y 23 mediante PCR usando partidores específicos

Los codones 22 y 23 están localizados en el exón 2. El cambio nucleotídico en el codón 22 es silente, esto quiere decir que ambas variantes, normal y polimórfica, codifican el mismo aminoácido, que es el ácido glutámico (GAG GAA). El polimorfismo del codón 23 origina un cambio aminoacídico de arginina a lisina (AGG AAG) (Koper, 1997). Ambos polimorfismos han sido asociados a la resistencia a los glucocorticoides (Van Rossum, 2002).

Al inicio de este estudio, la genotipificación de los codones 22 y 23 del GR se realizó mediante la técnica de PCR-CTPP. Las muestras analizadas resultaron ser todas heterocigotas. Al no tener ADNs de distintos genotipos para estandarizar la técnica se secuenciaron algunas muestras para confirmar el resultado, observándose que eran homocigotas para el alelo más frecuente. Por lo tanto, la técnica de PCR-CTPP no

resultó ser la más indicada para la genotipificación de estos codones, ya que entregó resultados falsos positivos. Se decidió continuar con el estudio de estos codones con una estrategia distinta, mediante el uso de partidores específicos para cada alelo para detectar los polimorfismos respectivos. En la Figura 13A se esquematiza la estrategia utilizada para el estudio de los codones 22 y 23. En la Figura 13B se muestra un gel



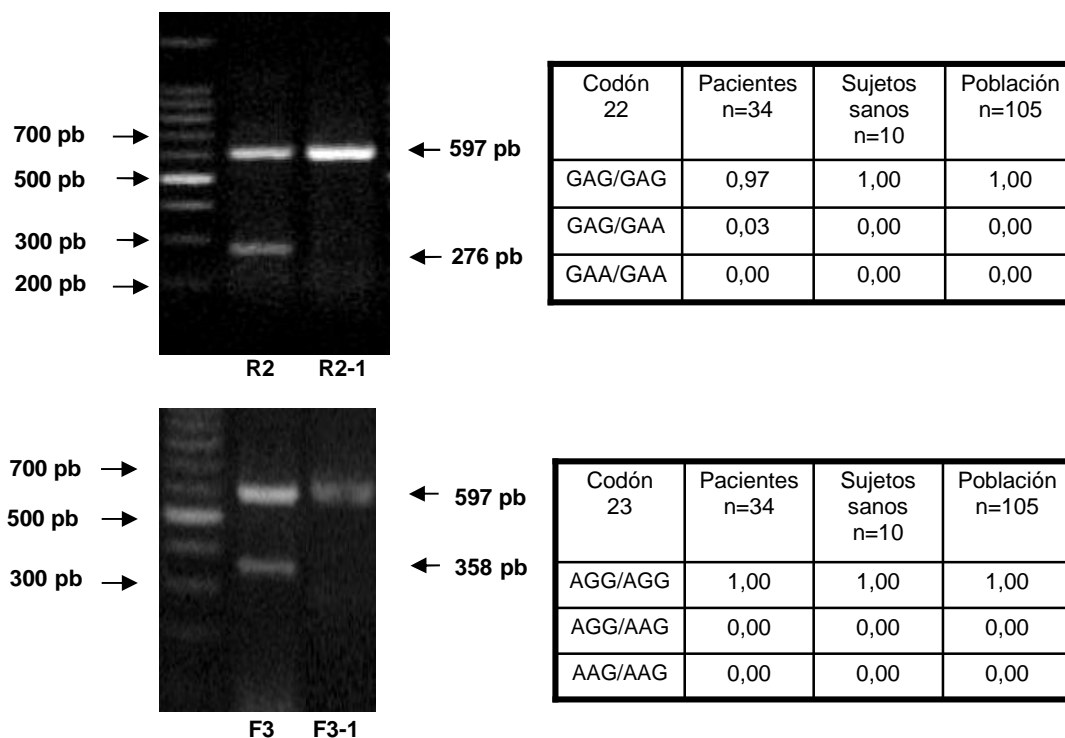


Figura 13. Genotipificación de los codones 22 y 23 mediante PCR usando partidores específicos.

A) La pareja de partidores F1-R1 permite amplificar un fragmento de 597 pb que incluye la posición de los SNPs y sirve de control interno de la PCR. Se realizaron dos reacciones separadas de PCR para cada codón y a cada una se le agregó un partidor específico para el nucleótido (identidad). **B)** Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TBE. En los codones 22 y 23 se muestra la condición homocigota para el alelo más frecuente. **C)** Resumen de las frecuencias genotípicas.

representativo de un paciente en el que se observan las bandas que reflejan la condición homocigota para el alelo más frecuente. En la Figura 13C se muestran los resultados de la genotipificación de los pacientes con DM, de los individuos sanos y de la muestra poblacional. Sólo se encontró el polimorfismo descrito para el codón 22 en el paciente número 5 siendo heterocigoto, lo cual representa una frecuencia genotípica de un 3 %. Para confirmar los resultados obtenidos en los pacientes se secuenciaron las muestras. Desafortunadamente, la calidad de los resultados no permitió esclarecer la identidad de las posiciones nucleotídicas de interés.

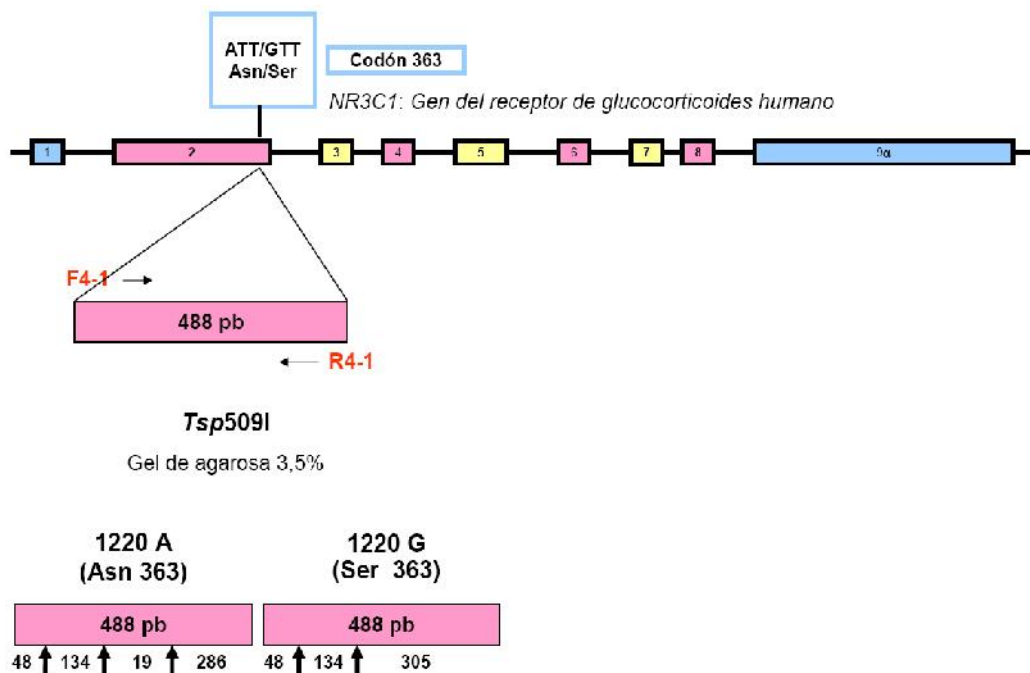
5.4.2 Genotipificación del codón 363 mediante PCR y digestión con *Tsp509I*

El polimorfismo descrito en el codón 363, localizado en el exón 2, resulta en un cambio aminoacídico de asparagina a serina (AAT → AGT) y está relacionado con una mayor sensibilidad a glucocorticoides (Huizenga y cols., 1998). En la Figura 14A se observa un esquema de la estrategia utilizada para el estudio del codón 363: PCR seguida de digestión con la enzima *Tsp509I*. En la Figura 14B se muestra un gel representativo de un paciente en el que se observan las bandas que reflejan la condición homocigota para el alelo más frecuente y de un individuo del estudio poblacional en el que se observan las bandas que reflejan la condición homocigota para el alelo menos frecuente. En la Figura 14C se muestra la genotipificación de los pacientes, de los individuos sanos y de la muestra poblacional. Sólo en la muestra poblacional p18 se encontró la variante polimórfica, siendo homocigota para el alelo G cuya frecuencia genotípica representa el 1 %.

5.4.3 Genotipificación del codón 641 mediante PCR con pares de partidores confrontados

Este polimorfismo está en el exón 7 y da origen a un cambio aminoacídico de asparagina a valina (GAC → GTC) que produce una disminución de la transactivación del GR (de Lange y cols., 1997).

A



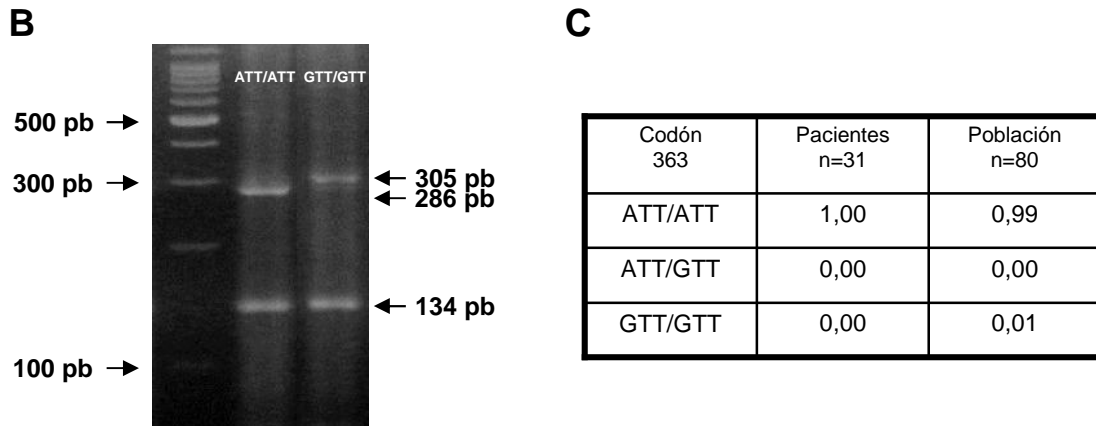


Figura 14. Genotipificación del codón 363 mediante PCR y digestión con *Tsp509I*.

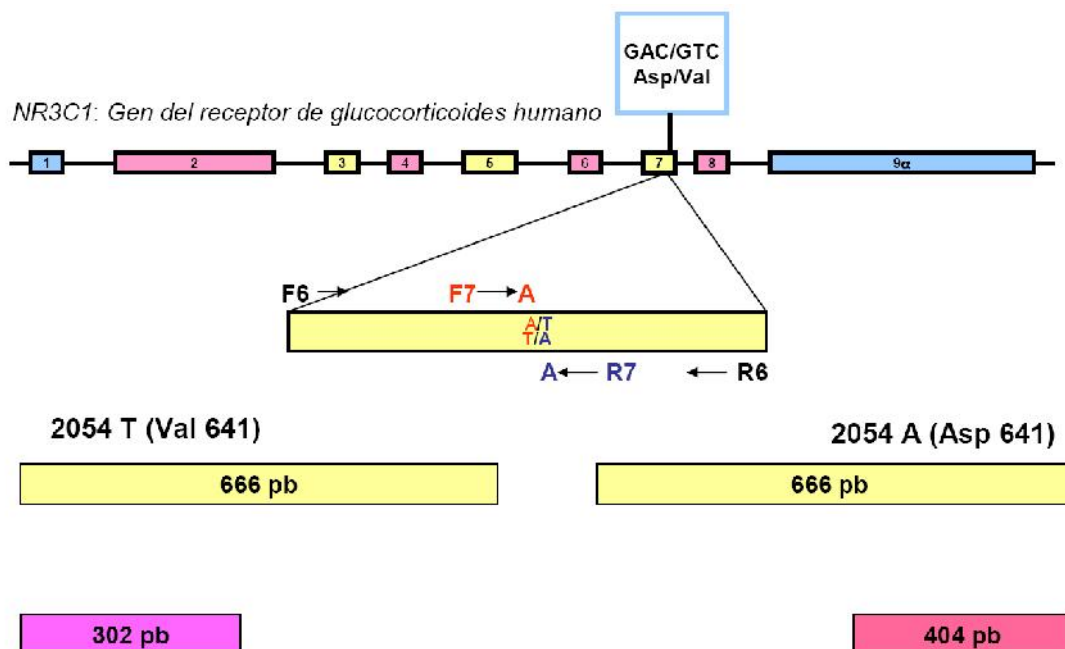
A) La reacción se llevó a cabo con la pareja de partidores F4-1/R4-1 que origina un amplicón de 488 pb. El producto de la PCR se digirió con la enzima de restricción *Tsp509I*. Esta enzima reconoce tres secuencias AATT, dos presentes en el amplicón que sirven como control positivo de la digestión enzimática y una correspondiente al sitio de interés: cuando el alelo más frecuente está presente se genera un sitio de corte originando fragmentos de 19 y 286 pb, mientras que cuando el polimorfismo AGTT está presente, se pierde un sitio de corte generando un fragmento de 305 pb. **B)** Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 3,5 % en tampón TBE. En la figura se muestra la condición homocigota para el alelo más frecuente y para el alelo polimórfico **C)** Resumen de las frecuencias genotípicas.

Al comienzo del estudio, para confirmar los resultados obtenidos por la PCR-CTPP, se secuenciaron las primeras muestras estudiadas para este codón. La secuenciación ratificó los resultados obtenidos por la reacción de PCR. En la Figura 15A se observa un esquema de la estrategia utilizada para el estudio del codón 641. En la Figura 15B se muestra un gel representativo de un paciente en el que se observan las bandas que reflejan la condición homocigota para el alelo más frecuente. En la Figura 15C se muestra la genotipificación de los pacientes, de los individuos sanos y de la muestra poblacional. Se observó la banda de 606 pb (control de la PCR) y la amplificación del fragmento de 404 pb en todas las muestras, siendo homocigotas GAC. No se observó la amplificación del fragmento de 302 pb (variante polimórfica GTC).

5.4.4 Genotipificación del codón 729 mediante PCR y digestión con *HphI*

El polimorfismo descrito en el codón 729, que se encuentra en el exón 9, da origen a un cambio aminoacídico de valina a isoleucina (**GTT ATT**). Se ha descrito que su presencia provoca una disminución de la afinidad del GR por su ligando (Brufsky y cols., 1990) y de su actividad transcripcional (Malchoff y cols., 1993). En la Figura 16A se observa un esquema de la estrategia utilizada para el estudio del codón 729: PCR seguida de digestión con la enzima *HphI*. En la Figura 16B se muestra un gel representativo de un paciente en el que se observan las bandas que reflejan la condición homocigota para el alelo más frecuente. En la Figura 16C se muestra la genotipificación de los pacientes, de los individuos sanos y de la muestra poblacional, siendo todas homocigotas GTT.

A



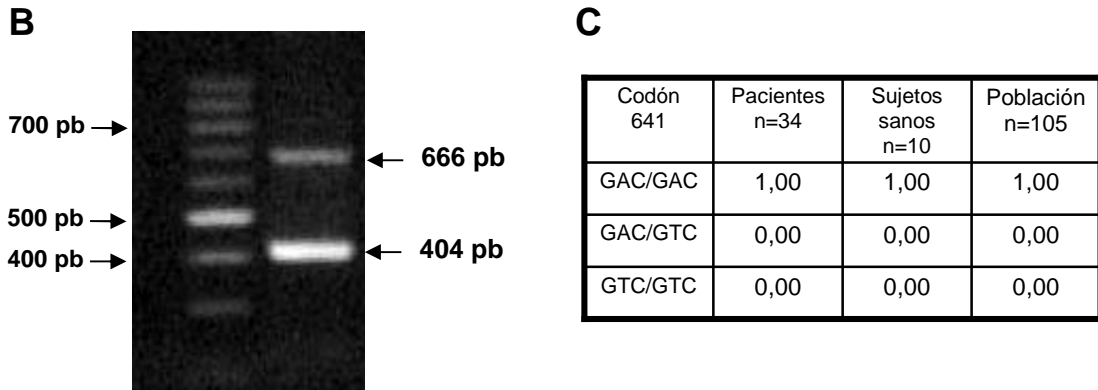
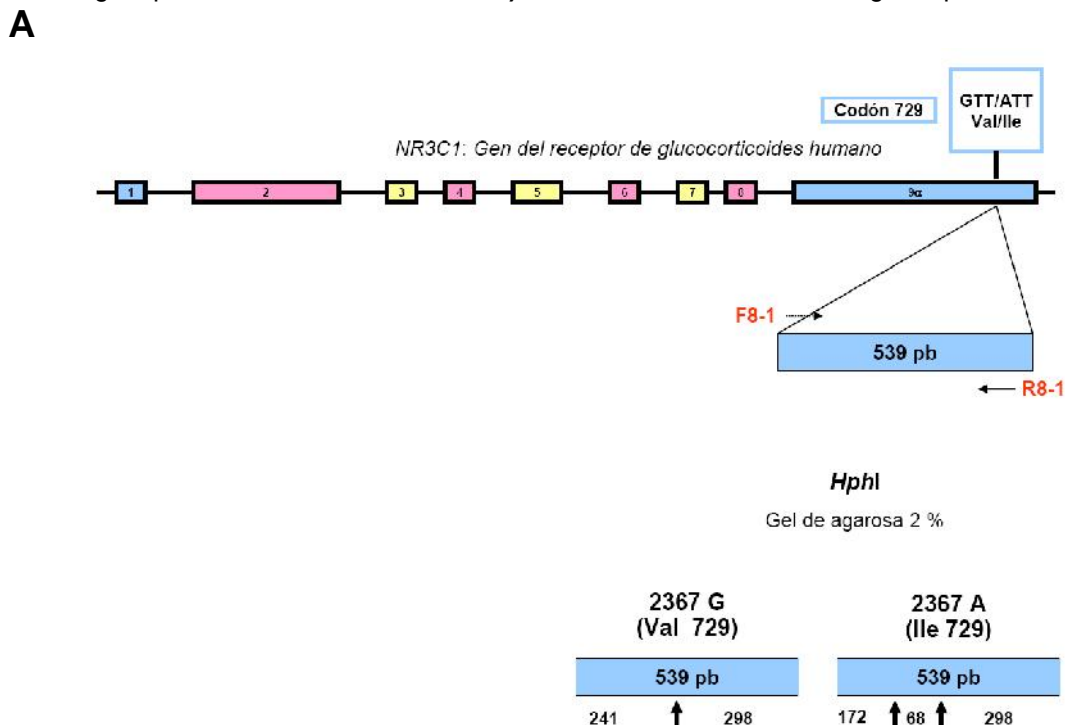


Figura 15. Genotipificación del codón 641 mediante PCR con pares de partidores confrontados (PCR-CTPP).

A) La pareja de partidores F6-R6 amplifica un fragmento de 666 pb que incluye la posición del SNP y sirve como control interno de la PCR. El partidor F7 lleva en su extremo 3' la T complementaria a la base más frecuente (GAC). En combinación con R6, permite amplificar un fragmento de 404 pb sólo si está presente la base complementaria. En cambio, el partidor F7 posee en su extremo 3' la A complementaria a la T menos frecuente (GTC), y junto con el partidor F6, permite amplificar un amplicón de 302 pb sólo si está presente la T en el molde. **B)** Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TBE. En la figura se muestra la condición homocigota para el alelo más frecuente. **C)** Resumen de las frecuencias genotípicas



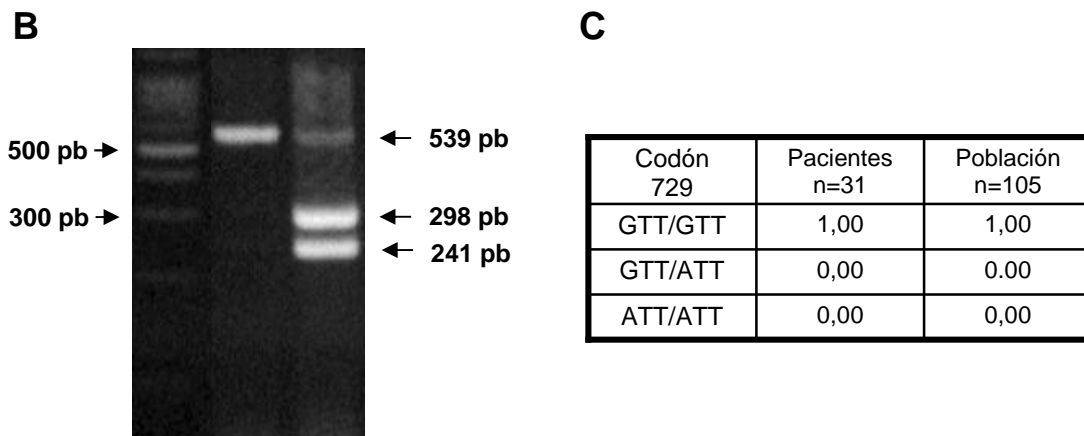


Figura 16. Genotipificación del codón 729 mediante PCR y digestión con *HphI*.

A) La reacción con la pareja de partidores F8-1/R8-1 genera un fragmento de 539 pb. El producto de la PCR se digirió con la enzima de restricción *HphI* que reconoce la secuencia GGTGA. En el amplicón existe esta secuencia que sirve como control positivo de la digestión enzimática generando fragmentos de 241 y 298 pb. Se produce un segundo corte cuando el alelo polimórfico está presente originando fragmentos de 68, 172 y 298 pb. **B)** Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2,0 % en tampón TBE. En la figura se muestra la condición homocigota para el alelo más frecuente. **C)** Resumen de las frecuencias genotípicas.

6. DISCUSIÓN

En la actualidad la depresión es considerada como “un problema grave y prioritario de salud pública” que afecta no sólo al individuo sino que también a todo el entorno familiar y social del paciente (WHO, 2006). En nuestro país se estima una frecuencia de 5 a 27,3 % (Simon, 1999, Vicente y cols., 2002). A partir de estudios epidemiológicos se ha estimado que la depresión es la segunda causa de discapacidad en mujeres y la tercera en varones, que afecta al 9% de la población mayor de 15 años y que 29,5% de las consultas de atención primaria en Chile son por depresión (Vicente y cols., 2002). Así mismo, la tasa anual de suicidio en Chile, de la cual la depresión es responsable en alrededor del 80 al 90 % de los casos, es de 6 por cien mil habitantes (Vicente y cols., 2002; Quiroz y cols., 2004).

En las últimas décadas ha existido un enorme interés por descubrir en patologías psiquiátricas posibles marcadores de riesgo genético que sirvan para el diagnóstico y la intervención temprana con el fin de reducir la probabilidad de la aparición de la patología o la gravedad de la sintomatología. El interés también se ha focalizado en la búsqueda de marcadores periféricos que puedan predecir la respuesta clínica durante el tratamiento farmacológico. De hecho, uno de los principales problemas en el tratamiento de la depresión es la heterogeneidad de la respuesta clínica a los medicamentos antidepresivos y la susceptibilidad a sus efectos adversos. De acuerdo a lo anterior, adquiere aún mayor relevancia el diagnóstico precoz de la depresión, considerando que en los individuos depresivos sin tratamiento aumenta la probabilidad de la recurrencia y la severidad de los cuadros depresivos.

6.1 Alteraciones en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal y su relación con la depresión mayor

El interés en el estudio de la depresión se ha centrado en el eje HHA, el cual ha sido ampliamente estudiado. En aproximadamente el 50% de los pacientes depresivos se han detectado niveles altos de la CRH en el líquido encéfalo raquídeo y del cortisol plasmático (Nemeroff y cols., 1984). La administración de CRH en sujetos depresivos induce menor secreción de la ACTH que en sujetos controles (Dinan y cols., 2005) sugiriendo una disminución de los receptores CRH1 hipofisarios. Sin embargo, la secreción de cortisol en estos sujetos es más elevada que en individuos controles lo que sugiere que debe existir otro componente que media la secreción de la ACTH (Abraham y cols., 2001). La regulación negativa del eje HHA está controlada por los niveles del cortisol circulante, hormona que se une a sus receptores GR a nivel del hipotálamo y de la hipófisis, inhibiendo la activación del eje y, como consecuencia, reduciendo la secreción de CRH y ACTH (Abraham y cols., 2001). En el 50% de los sujetos depresivos esta regulación está alterada, posiblemente debido a una reducción en los niveles y en la actividad del GR (Pariante y cols., 2001, D'Sa y Duman, 2002) y, como consecuencia, se observa un aumento de los niveles del cortisol plasmático con respecto a sujetos sanos. Se ha observado que animales knockout condicionales del

GR (Boyle y cols., 2005) o animales que presentan una disminución de los niveles del GR por medio de un ARN antisentido para el ARN del GR (Ridder y cols., 2005), presentan una elevación de los niveles circadianos de la corticosterona que se acompaña de un comportamiento depresivo. Estos antecedentes hacen que sea interesante evaluar cambios polimórficos del GR que podrían alterar su actividad y además asociarlo a la susceptibilidad a trastornos depresivos y a la respuesta clínica al tratamiento con fármacos antidepresivos.

6.2 Receptor de glucocorticoides y depresión mayor

Se han descrito polimorfismos en el gen del GR que provocan una alteración en la afinidad del receptor por su hormona, haciéndolo más sensible o más resistente a los GCs. Algunos de estos polimorfismos se han asociado más recientemente a la respuesta clínica de sujetos depresivos tratados con antidepresivos (Brouwer y cols., 2006).

Los polimorfismos del GR en los codones 22 y 23 (ER22/23EK) generan un cambio en la razón entre las isoformas A y B del GR (Russcher y cols., 2005). Se ha sugerido que este efecto es debido a una alteración en la estructura secundaria del ARNm del GR, favoreciendo la traducción de la isoforma GR -A, la cual posee una menor capacidad de transactivación en comparación con la isoforma GR -B (Russcher y col., 2005).

En un estudio realizado en la población alemana por Brouwer y cols. en el año 2006, se encontró que el 10% de los pacientes depresivos eran heterocigotos para los polimorfismos ER22/23EK. Además se ha determinado que la frecuencia de este polimorfismo es significativamente más alta en sujetos depresivos que en controles (van Rossum y cols., 2006).

Recientemente se ha reportado que la respuesta al tratamiento con diversos fármacos antidepresivos, específicamente durante las primeras semanas, fue significativamente

más rápida en los pacientes que tienen el polimorfismo ER22/23EK (van Rossum y cols., 2006). Esto último concuerda con lo obtenido en nuestro estudio en el cual un sujeto clasificado como respondedor temprano al tratamiento con venlafaxina tiene el polimorfismo. No obstante en otros estudios la baja frecuencia del polimorfismo no permitió asociarlo con la respuesta a fármacos antidepresivos (Huizenga y cols., 1998). Por otro lado, en el estudio realizado por van West y cols. en el año 2005, se encontró que este polimorfismo está asociado a la patología depresiva sólo en la población de pacientes suecos y no de pacientes provenientes de Bélgica (van West y cols., 2006). Se podría sugerir que existe otro cambio polimórfico que se asocia a la depresión quizás en un sitio cercano al polimorfismo ER22/23EK.

Los polimorfismos del GR en los codones 22 y 23 (ER22/23EK) se asocian a una mayor resistencia a la supresión de la secreción de los GCs después de la ingesta de 1 mg de dexametasona (van Rossum y cols., 2002). En el estudio realizado por Brouwer y cols. en el año 2006, no se encontró una relación entre la presencia del polimorfismo y los niveles de la ACTH, del cortisol o la respuesta al tratamiento con paroxetina (fármaco antidepresivo ISRS) (Brouwer y cols., 2006). Así mismo, en el estudio de van Rossum y cols. del año 2002, el polimorfismo no estaba asociado a los niveles del cortisol basal ni tampoco a los observados después de la administración de dexametasona.

En nuestro estudio sólo un paciente resultó ser heterocigoto para el codón 22. Esta condición no se pudo comprobar por la secuenciación de la muestra debido a que los electroforetogramas no entregaron una información confiable. Este paciente no se diferencia del resto del grupo de respondedores tempranos en cuanto a parámetros y función endocrinos. La secuenciación de las muestras estudiadas para la genotipificación de estos dos codones entregará la información necesaria para finalmente concluir la confiabilidad de la estrategia utilizada con los partidores específicos. Además permitirá precisar si los alelos menos frecuentes descritos para los codones 22 y 23 se presentan siempre juntos como se ha descrito en la literatura (van Rossum y cols., 2006).

Otro de los polimorfismos en el gen del GR está en el intrón 2 y es denominado *BclI*, en el cual ocurre un cambio nucleotídico de C a G generándose un sitio que es reconocido por la enzima *BclI* (Panarelli y cols., 1998; van Rossum y cols., 2003). Recientemente se ha descrito que este polimorfismo está asociado a la depresión (van Rossum y cols., 2006). En un estudio realizado en Alemania, se determinó que el 46% de los pacientes depresivos eran heterocigotos C/G y el 11% eran homocigotos G/G (Brouwer y cols., 2006). Además, los pacientes homocigotos G/G presentaron una mayor resistencia a la terapia con el antidepresivo paroxetina. Por lo tanto, este polimorfismo puede dar cuenta de la resistencia al tratamiento con fármacos antidepresivos.

El polimorfismo *BclI* ha sido asociado a una hipersensibilidad a los GCs (Panarelli y cols., 1998; van Rossum y cols., 2003). En el estudio de van Rossum y cols. en el año 2006, no se evaluó la relación del polimorfismo con la respuesta al tratamiento, ni tampoco con los niveles del cortisol y la ACTH antes y después del test DEX/CRH en los pacientes depresivos (van Rossum y cols., 2006). En cambio, en el estudio de Brouwer y cols. en el mismo año 2006, sí se evaluó esta relación y se determinó que el nivel basal de la ACTH como aquel observado luego de la administración de una infusión de CRH en el test DEX/CRH fue más alto en los pacientes portadores del alelo G (C/G y G/G) (Brouwer y cols., 2006). Estos resultados sugieren que los niveles altos de ACTH y la presencia del polimorfismo predicen una respuesta lenta al tratamiento con antidepresivos (Brouwer y cols., 2006). Sería interesante estudiar este polimorfismo en los pacientes depresivos de nuestro estudio, sobre todo en los pacientes respondedores tardíos al tratamiento, debido a que este grupo posee niveles más altos de la ACTH que el grupo de los respondedores tempranos.

Otro de los polimorfismos estudiados en la depresión es la secuencia AGT (Ser) en el codón 363 del gen del GR. En un estudio realizado en una población alemana se encontró una baja frecuencia para la serina (heterocigotos 3% y homocigotos 1%) (Brouwer y cols., 2006). Además, en dos estudios diferentes en población europea se encontró que la frecuencia del alelo polimórfico en sujetos depresivos no fue significativamente mayor que en los sujetos sanos (van West y cols., 2006; van Rossum y cols., 2006), es decir, no está relacionado con la patología. Por lo tanto, no

es extraño encontrar en nuestro estudio una baja frecuencia genotípica de este polimorfismo que fue de 1 %, siendo la única diferencia con las otras publicaciones la población estudiada. Este polimorfismo ha sido asociado a un aumento en la sensibilidad a los GCs observada en la supresión de la secreción del cortisol después de la administración de una dosis baja (0,25 mg) del corticoide sintético dexametasona (Huizenga y cols., 1998). Sin embargo, no se relacionó su presencia con alteraciones en la secreción de la ACTH y del cortisol, ni tampoco con la respuesta al tratamiento con paroxetina, un antidepresivo del tipo ISRS (Brouwer y cols., 2006). Además, en otro estudio no se observó una correlación entre la serina 363 y la funcionalidad del eje HHA (van Rossum y cols., 2006). Habría sido interesante haber determinado si el sujeto control homocigoto Ser/Ser encontrado en nuestro estudio, posee una mayor sensibilidad a los GCs y su relación con estados depresivos. Sólo se encontró el alelo menos frecuente en un sujeto de la población. Sin embargo, cabe destacar que la estrategia utilizada para la genotipificación de este codón, utilizando una enzima de restricción, es más confiable que la utilizada en los otros codones de nuestro estudio. No obstante es relevante realizar la secuenciación de la muestra.

Se han descrito en el GR polimorfismos en el dominio de unión al ligando. Se ha determinado en estudios *in vitro* que el cambio D641V resulta en una menor capacidad transactivadora del receptor, probablemente debido a una reducción de la afinidad del receptor por su ligando (de Lange y cols., 1997). El polimorfismo V729I ha sido relacionado con resistencia a los GCs y disminución de la afinidad del GR por su ligando (Brufsky y cols., 1990; Malchoff y cols., 1993). Además, se ha observado en estudios *in vitro* que la isoforma menos frecuente tiene una menor capacidad activadora de la transcripción (de Lange y cols., 1997). En esta memoria no se encontraron estos polimorfismos, por lo que es relevante secuenciar las muestras para descartar un error en la estrategia utilizada.

Las alteraciones en la funcionalidad del GR no sólo pueden ser atribuidas a las variaciones en su secuencia génica sino que existen además otros factores genéticos que pueden contribuir a una menor actividad del GR. Se ha descrito un polimorfismo intrónico en el gen de la proteína FKBP5 (una proteína cochaperona de la HSP 90) que

se relaciona con un aumento en los niveles de la proteína en linfocitos, aunque estos cambios no se relacionan con variaciones en los niveles del ARNm (Binder y col., 2004). La FKBP5 es una proteína presente en el cerebro y en diversos tejidos humanos, incluyendo el músculo, el hígado y el timo (Nair y cols., 1997). La FKBP5 reduce la afinidad del GR por el cortisol y también su posterior translocación al núcleo (Wochnik y cols., 2005). El cortisol induce la expresión del gen de la FKBP5 en linfocitos humanos debido a la unión del GR a sus GRE en el gen de la FKBP5 (Vermeer y cols., 2003). Además, en monos del nuevo mundo esta proteína se asoció a una resistencia a GCs observada como una menor respuesta del GR, debido a una sobre-expresión de la FKBP5 que reduce la respuesta del GR (Westberry y cols., 2006). En sujetos depresivos, el genotipo T/T ha sido asociado a una rápida respuesta al tratamiento con antidepresivos y a un aumento de los niveles de la proteína FKBP5. Ésta variación en el gen de FKBP5 se ha relacionado con un aumento en la recurrencia de episodios antidepresivos (Binder y col., 2004). Sería importante evaluar la presencia del polimorfismo T/T que podría dar cuenta de la velocidad de la respuesta en los pacientes de nuestro estudio.

Debido a que el GR no puede ser estudiado directamente en el cerebro de pacientes depresivos, una buena alternativa son los linfocitos, ya que el GR es relativamente abundante en estas células. Los polimorfismos podrían causar, por ejemplo, la disminución del GR en linfocitos, como la observada en sujetos depresivos, considerando además que el GR regula la expresión de su propio gen y que los antidepresivos pueden modificarla (Pariante y cols., 2001; Calfa y cols., 2003). Además, en pacientes depresivos expuestos a una terapia antidepresiva, se ha observado un aumento en los niveles del GR en linfocitos y una normalización del eje HHA (Calfa y col., 2003). Uno de los objetivos de esta memoria fue evaluar los niveles del GR en los linfocitos de los pacientes durante las seis primeras semanas de tratamiento con el antidepresivo venlafaxina para determinar la contribución de la terapia farmacológica a los niveles del GR (isoforma funcional).

En este estudio no se observaron diferencias significativas en los niveles totales del GR en relación a la β -actina durante el tratamiento con venlafaxina. No obstante, la razón entre las isoformas A y B del GR tiende a comportarse en forma diferente en los dos

grupos de pacientes. En el grupo de los respondedores tempranos esta relación disminuye durante las primeras semanas al aumentar la isoforma más activa (GR -B); en cambio, esta razón aumenta en el grupo de los respondedores tardíos al tratamiento, sugiriendo un predominio de la isoforma menos activa. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la acción del antidepresivo modifica de alguna forma la razón GR A/GR B y no los niveles totales del GR en relación a la -actina. Esto implica que el tratamiento crónico con la venlafaxina regula la traducción del ARNm del GR favoreciendo una isoforma con respecto a la otra. Sería interesante evaluar los niveles del ARNm del GR durante el tratamiento. También sería interesante medir los niveles del ARNm del GR , un ARN más corto debido a un procesamiento alternativo del exón 9 que excluye el dominio de unión al ligando (Hollenberg y cols., 1985). Por lo tanto, la isoforma GR actúa como un verdadero dominante negativo del GR (Charmandari y cols., 2005; Oakley y cols., 1999). Sería importante determinar si los niveles del GR están alterados en la depresión y si se modifican durante el tratamiento con antidepresivos. Aunque se ha descrito que el GR se encuentra en baja cantidad en el hipocampo de sujetos controles (DeRijk y cols., 2002) no se ha documentado si existen diferencias en sus niveles en asociación a patologías psiquiátricas.

6.3 Niveles de ACTH y cortisol en pacientes con depresión mayor y su relación con la respuesta clínica a antidepresivos

Durante muchos años se pensó que la secreción de la ACTH de la hipófisis se debía sólo al estímulo de la CRH. Sin embargo, en los últimos años se ha reconocido que la AVP también cumple este rol atribuyéndosele incluso mayor importancia que a la CRH (Scott y cols., 1998). Se ha descrito que, en ratones deficientes en el receptor del tipo I para la CRH, los niveles de ACTH se mantienen normales gracias a la acción compensatoria de la AVP (Muller y cols., 2000). De acuerdo a esto, el efecto de la AVP a nivel hipofisiario explica muy bien la secreción de la ACTH observada en condiciones de una hipersecreción de CRH donde se observa una reducción de los receptores CRH1 (Gold y cols., 1995). Con estos antecedentes se podría predecir que los niveles

elevados del cortisol en los pacientes depresivos se deben en gran parte a la función que cumple la AVP en la activación del eje HHA.

En esta memoria de título se observó que el ritmo de secreción de cortisol en la saliva de los sujetos controles fue similar al encontrado en sujetos depresivos. Esto indica que el grupo de pacientes con DM ingresados en el estudio no presentan una hipersecreción del cortisol durante el día, lo cual concuerda con el hecho de presentar niveles del cortisol libre urinario semejantes a los de individuos controles. Tanto los sujetos controles como los depresivos suprimieron la secreción diurna del cortisol luego de la ingesta de dexametasona. Por lo tanto, en este grupo de pacientes aparentemente no existe una desregulación del eje HHA, al menos a nivel de los receptores de glucocorticoides que son los que producen el control inhibitorio de este eje.

El curso temporal de la secreción de la ACTH y del cortisol mostró que los pacientes depresivos, a diferencia de los sujetos controles, presentan una mayor sensibilidad a la DDAVP, a nivel de la hipófisis anterior.

Además, los pacientes respondedores tardíos al tratamiento con venlafaxina poseen niveles basales de ACTH más elevados que los sujetos respondedores tempranos. Esta diferencia podría estar relacionada con una mayor activación de la secreción de ACTH, quizás mediada por una mayor secreción de AVP o una mayor sensibilización de los receptores V(1b) a nivel de la hipófisis anterior. En apoyo a esto último, se observó que los pacientes respondedores tardíos presentaron una mayor secreción de ACTH en respuesta a la inyección de DDAVP. Sin embargo, el aumento en la secreción de ACTH no se traduce en una mayor secreción de cortisol a nivel de la zona fasciculada de la corteza adrenal, posiblemente por una alteración de los receptores de ACTH.

Recientemente se ha descrito que los niveles del cortisol urinario y los niveles plasmáticos del cortisol observados después del test DEX/CRH no predicen la respuesta a la paroxetina (Brouwer y cols., 2006). No obstante, los sujetos que

presentan niveles de ACTH más elevados responden de forma menos favorable a este fármaco (Brouwer y cols., 2006). En esta memoria se encontró que aquellos sujetos que presentaron niveles basales bajos de ACTH, fueron los que respondieron más tempranamente al tratamiento. Más aún, aquellos sujetos que remitieron corresponden justamente a los que presentaron niveles basales más bajos de la ACTH y del cortisol. Falta por determinar, en todos los individuos, si existen cambios en los niveles de la ACTH y del cortisol después del tratamiento con venlafaxina.

Por otro lado, se ha determinado que los pacientes con depresión presentan mayores niveles séricos de la AVP luego de la inhibición del eje HHA con dexametasona, sirviendo como un buen marcador de la desregulación del eje HHA (Watson y cols., 2006). Por lo tanto, sería interesante evaluar los niveles de la AVP en el suero de pacientes depresivos antes y después del tratamiento y correlacionarlos con la respuesta clínica. Hubiese sido interesante poder comparar estos resultados con un grupo no respondedor al tratamiento con venlafaxina, lo que no se pudo realizar debido al bajo número de pacientes (n=3).

En la respuesta clínica al tratamiento con fármacos antidepresivos es importante considerar su(s) vía(s) de metabolización sobre todo cuando requieren ser activados. La venlafaxina es un antidepresivo metabolizado por vía hepática, específicamente por el citocromo CYP2D6 (Ereshefsky y cols., 2000). Se ha descrito un polimorfismo (CYP2D6*4 CYP2D6*6) que produce una reducción en la actividad enzimática generando un fenotipo metabolizador lento (Bradford y cols., 2002). De acuerdo a esto, las diferencias en la velocidad de la respuesta al tratamiento por este grupo de pacientes se puede deber a una diferencia en la metabolización del fármaco.

6.4 Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico, factor neurotrófico derivado del cerebro y tratamiento con antidepresivos

La CREB es un factor transcripcional presente en el núcleo y es activada mediante la fosforilación en un residuo específico de serina (Ser 133) por múltiples quinasas (Lonze

y Ginty. 2002). Diversos antidepresivos que facilitan la señalización de la 5HT y la NA, ya sea inhibiendo la recaptación de estos neurotransmisores en el terminal sináptico o bien inhibiendo su catabolismo, promueven un aumento en los niveles de la CREB total, la CREB-P y/o en su capacidad transactivante (Nibuya y cols., 1996; Duman y cols., 1997; Duman y cols., 2000). En contraste, la administración aguda de antidepresivos como fluoxetina y desipramina, ejercen una acción antidepresiva en ensayos conductuales en animales deficientes en CREB semejante a lo observado en animales controles (Conti y cols., 2002). Además, el aumento de corticosterona inducido por estrés agudo es prevenido por la administración de antidepresivos tanto en ratones normales como en aquellos deficientes en CREB (Conti y cols., 2002). Por otro lado, la administración de dexametasona a ratas reduce la fosforilación de CREB en las neuronas productoras de CRH en el PVN, sugiriendo que la cascada transduccional asociada al GR altera esta modificación (Legradi y cols., 1997).

Se han determinado los niveles de la CREB en linfocitos de pacientes depresivos, antes y después de 2 semanas de tratamiento con distintos antidepresivos o psicoterapia (Koch y cols., 2002). Se observó un aumento significativo en la fosforilación de la CREB en los sujetos respondedores al tratamiento, no así en pacientes no respondedores. En el estudio en cuestión se usó como criterio de respuesta la reducción de un 30% del puntaje inicial en el test de HAM-D a las dos semanas de tratamiento. Sin embargo, comúnmente se considera como respuesta al tratamiento con antidepresivos la reducción de un 50% en el puntaje del HAM-D entre la sexta y la octava semanas (Stassen y cols., 1996). Por lo tanto es muy difícil precisar si los pacientes efectivamente respondieron a la terapia. Más aún, se usaron antidepresivos con diferentes mecanismos de acción. Además, no se determinaron las variaciones en la CREB total durante el tratamiento ni se controlaron los niveles de carga de la proteína en la técnica de Western utilizada para evaluar los cambios de CREB-P, lo que dificulta aún más la interpretación de los resultados. En un estudio posterior realizado en pacientes tratados con fluoxetina o venlafaxina, se mostró que los niveles del ARNm de la CREB disminuyen significativamente en linfocitos y que no existe una asociación entre los cambios del ARNm y la respuesta al tratamiento (Lai y col., 2003). Hubiese sido interesante determinar en estos dos estudios los niveles de

los GCs circulantes y de esta forma haber realizado una correlación entre la función del eje HHA y los niveles de la CREB en los pacientes depresivos.

En esta memoria, se consideró el criterio de respuesta temprana como la reducción mayor o igual a un 25% en el HAM-D en la primera semana de tratamiento y la respuesta a la venlafaxina como una reducción en a lo menos un 50% del HAMD inicial en la sexta semana de tratamiento. En ambos grupos de pacientes se observó una tendencia de los niveles de la CREB total en extractos de linfocitos a aumentar durante la primera semana de tratamiento. Estos resultados están de acuerdo con el aumento de los niveles de CREB y de su ARNm que se logran en el sistema nervioso central de animales tratados crónicamente con antidepresivos (Nibuya y cols., 1996; Duman y cols., 1997; Duman y cols., 2000). Además se encontró un aumento de la fosforilación de la CREB sólo en los respondedores tempranos, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos, debido probablemente al bajo número de pacientes. Sin embargo, destaca en el grupo de respondedores tardíos el hecho de que presentan niveles más altos de cortisol y menor fosforilación de la CREB que el grupo de pacientes respondedores tempranos. Esta variación en los niveles de la CREB-P en el grupo respondedor tardío podría ser producto del efecto inhibitorio de los GCs sobre la activación de este factor transcripcional.

El estrés puede disminuir los niveles del BDNF, mientras que el tratamiento a largo plazo con antidepresivos y la terapia electroconvulsiva pueden aumentarlos (Nibuya y cols., 1995). En un estudio realizado postmortem en cerebro de sujetos depresivos que fueron tratados con fármacos antidepresivos, se observó un aumento en la inmunoreactividad del BDNF hipocampal (Chen y cols., 2001). Esto último concuerda con estudios que determinaron que estos fármacos son capaces de aumentar los niveles de la CREB (Dowlatshahi y cols., 1998; Nibuya y cols., 1996). La relación causal entre CREB y BDNF ha quedado de manifiesto en experimentos realizados con ratones deficientes en CREB los cuales al ser tratados con antidepresivos no manifiestan un aumento del BDNF (Conti y cols., 2002). Esto sugiere que, en la fisiopatología de la depresión, el sistema de señalización del AMPc y sus blancos son importantes en el mecanismo de acción de los antidepresivos. Además, el BDNF es

capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que sugiere que los niveles de esta neurotrofina en el suero pueden reflejar los niveles presentes en el cerebro (Pan y cols., 1998).

En un estudio se determinó que los pacientes depresivos sin tratamiento farmacológico durante tres o más semanas poseen niveles disminuidos del BDNF en el suero al ser comparados con sujetos controles y esto se correlacionó con la severidad de la depresión (Karege y cols., 2002). Este fue el primer estudio que sugirió que el BDNF proveniente de las plaquetas puede ser un marcador periférico de la depresión (Karege y cols., 2002). Sin embargo, los autores no consideraron una asociación entre la respuesta a tratamientos con antidepresivos y la normalización de los niveles del BDNF en pacientes que remiten. En estudios recientes se ha descrito una disminución del BDNF en el suero y en el plasma de pacientes depresivos sin tratamiento al compararlos con sujetos controles, pero los niveles totales del BDNF no se encontraron alterados (Karege y col., 2002). Los autores sugieren que la disminución en los niveles del BDNF en el suero y en el plasma no depende de la reactividad plaquetaria, sino más bien de alteraciones en mecanismos moleculares relacionados con la secreción del BDNF de las plaquetas.

En otro estudio se determinó que los niveles del BDNF fueron menores en pacientes sin tratamiento que en los que sí recibieron tratamiento farmacológico con antidepresivos (como milnacipran, fluvoxamina, trazodona, amoxapina, amitriptilina, clomipramina, imipramina y mianserina) y este efecto fue independiente de la dosis administrada (Shimizu y cols., 2003). Además, los niveles del BDNF fueron similares en los pacientes sin tratamiento y los sujetos controles (Shimizu y cols., 2003). En otro estudio se observó que los niveles del BDNF en pacientes depresivos tratados con paroxetina, clomipramina o venlafaxina aumentaron después de la remisión (Gervasoni y cols., 2005). En el primer estudio realizado en el cual sólo se utilizó venlafaxina, se observó un aumento significativo de los niveles del BDNF en el suero (Aydemir y cols., 2005).

En ninguno de estos estudios se determinó la asociación entre los niveles del BDNF y parámetros que reflejen la función del eje HHA en los pacientes estudiados. En esta memoria se observa que ambos grupos de pacientes depresivos aumentan sus niveles del BDNF durante la primera semana del tratamiento, sin embargo este aumento sólo se sostuvo en la segunda semana en el grupo de los pacientes respondedores tempranos, siendo en esta semana el cambio estadísticamente significativo en comparación con los respondedores tardíos. Esto sugiere que la determinación de los niveles del BDNF en el suero de los pacientes depresivos puede ser predictivo de la respuesta temprana al tratamiento con antidepresivos. Cabe destacar que el grupo respondedor temprano aparentemente posee una menor desregulación del eje HHA, evidenciado en los niveles basales de cortisol, de la ACTH y la respuesta del eje a la estimulación con DDAVP.

El propósito de este estudio es aportar al conocimiento del origen de la depresión y contribuir al diagnóstico temprano, a un tratamiento adecuado y a la determinación de la eficacia del tratamiento farmacológico. Este es el primer estudio que relaciona potenciales marcadores periféricos y genéticos con la funcionalidad del eje HHA y la respuesta al tratamiento con un antidepresivo único en un período de seis semanas.

7 CONCLUSIONES

1. Los pacientes depresivos tratados con venlafaxina responden temprana o tardíamente, diferencia que no se puede asociar a la edad, el género o el grado de la depresión.
2. Los pacientes depresivos respondedores tardíos secretan más ACTH frente a una estimulación de la hipófisis con desmopresina que los sujetos sanos sugiriendo una mayor sensibilidad de los receptores V3.
3. Los niveles del GR en linfocitos no son un marcador de la respuesta al tratamiento de la depresión con venlafaxina porque no varían durante el tratamiento.
4. Los niveles de la CREB total en linfocitos no son un marcador de la respuesta al tratamiento de la depresión con venlafaxina porque no varían durante el tratamiento, a diferencia de lo reportado en ratas.

5. Los pacientes respondedores tempranos a la venlafaxina presentan mayores niveles del BDNF sérico en la segunda semana de tratamiento que los respondedores tardíos, lo cual establece un marcador periférico de la respuesta clínica.
6. El polimorfismo descrito en el codón 22 se encontró sólo en un sujeto depresivo respondedor temprano. El polimorfismo descrito en el codón 363 se encontró sólo en un sujeto de la muestra poblacional. Los polimorfismos en los codones 23, 641 y 729 descritos para el gen del GR no se encontraron en la población chilena, ni en los sujetos depresivos estudiados. El aumento del tamaño muestral permitirá evaluar el potencial uso de estos polimorfismos como marcadores genéticos de la respuesta al tratamiento con fármacos antidepresivos.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham IM, Harkany T, Horvath KM y Luiten PJ. Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? *Journal of Neuroendocrinology* 13(9): 749-760 (2001)

Akil H. Stressed and depressed. *Nature Medicine* 11(2): 116-118 (2005)

Angelucci L. The glucocorticoid hormone: from pedestal to dust and back. *European Journal Pharmacology* 405(1-3): 139-147 (2000)

Aydemir O, Deveci A y Taneli F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 29(2): 261-265 (2005)

Bray PJ y Cotton RG. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and *in vitro* mutations and polymorphisms. *Human Mutation* 21(6): 557-568 (2003)

Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Putz B, Papiol S, Seaman S, Lucae S, Kohli MA, Nickel T, Kunzel HE, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Kern N, Brunner J, Modell S, Baghai T, Deiml T, Zill P, Bondy B, Rupprecht R, Messer T, Kohnlein O,

Dabitz H, Bruckl T, Muller N, Pfister H, Lieb R, Mueller JC, Lohmussaar E, Strom TM, Bettecken T, Meitinger T, Uhr M, Rein T, Holsboer F y Muller-Myhsok B. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nature Genetics* 36(12): 1319-1325 (2004)

Boyle MP, Brewer JA, Funatsu M, Wozniak DF, Tsien JZ, Izumi Y y Muglia LJ. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102(2): 473-478 (2005)

Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3(2): 229-243 (2002)

Brouwer JP, Appelhof BC, van Rossum EF, Koper JW, Fliers E, Huyser J, Schene AH, Tijssen JG, Van Dyck R, Lamberts SW, Wiersinga WM y Hoogendijk WJ. Prediction of treatment response by HPA-axis and glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. *Psychoneuroendocrinology* 31(10): 1154-1163 (2006)

Brufsky A M, Malchoff DM, Javier EC, Reardon G, Rowe D y Malchoff CD. A glucocorticoid receptor mutation in a subject with primary cortisol resistance. *Transactions of the Association of American Physicians* 103: 53-63 (1990)

Calfa G, Kademian S, Ceschin D, Vega G, Rabinovich GA y Volosin M. Characterization and functional significance of glucocorticoid receptors in patients with major depression: modulation by antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology* 28(5): 687-701 (2003)

Charmandari E, Chrousos PG, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E y Kino T. The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGR alpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Molecular Endocrinology* 19(1): 52-64 (2005)

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF y Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological Psychiatry* 50(4): 260-265 (2001)

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K y Schutz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & Development* 9(13): 1608-1621 (1995)

Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I y Blendy JA. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *The Journal of Neuroscience* 22(8): 3262-3268 (2002)

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS y Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 19(3): 269-301 (1998)

de Lange P, Koper JW, Huizenga NA, Brinkmann AO, de Jong FJ, Karl M, Chrousos GP y Lamberts SW. Differential hormone-dependent transcriptional activation and repression by naturally occurring human glucocorticoid receptor variants. *Molecular Endocrinology* 11(8): 1156-1164 (1997)

DeRijk RH, Schaaf M y de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 81(2): 103-122 (2002)

Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Modesta F, Koper JW, Liuzzi A y Lamberts SW. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clinical Endocrinology* 59(1): 68-74 (2003)

Dinan TG, O'Brien S, Lavelle E y Scott LV. Further neuroendocrine evidence of enhanced vasopressin V3 receptor responses in melancholic depression. *Psychological Medicine* 34(1):169-72 (2004)

Dinan TG y Scott LV. Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic-pituitary-adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *Journal of Anatomy* 207(3): 259-264 (2005)

Diogenes MJ, Fernandes CC, A. Sebastiao M y Ribeiro JA. Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience* 24(12): 2905-2913 (2004)

Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF y Young LT. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *The Lancet* 352(9142): 1754-1755 (1998)

D'Sa C y Duman RS. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disorder* 4(3): 183-194 (2002)

Duma D, Jewell CM y Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 102(1-5): 11-21(2006)

Duman RS, Heninger GR y Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Archives of General Psychiatry* 54(7): 597-606 (1997)

Duman RS, Malberg J, Nakagawa S y D'Sa C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological Psychiatry* 48(8): 732-739 (2000)

Ereshefsky L y Dugan D. Review of the pharmacokinetics, pharmacogenetics, and drug interaction potential of antidepressants: focus on venlafaxine. *Depression and Anxiety* 12 Suppl 1: 30-44 (2000)

- Fava M y Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron* 28(2): 335-341 (2000)
- Gervasoni N, Aubry JM, Bondolfi G, Osiek C, Schwald M, Bertschy G y Karege F. Partial normalization of serum brain-derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode. *Neuropsychobiology* 51(4): 234-238 (2005)
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG y Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46(5): 645-652 (1986)
- Gladkevich A, Kauffman HF y Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 28(3): 559-576 (2004)
- Goggi J, Pullar IA, Carney SL y Bradford HF. Signalling pathways involved in the short-term potentiation of dopamine release by BDNF. *Brain Research* 968(1): 156-161 (2003)
- Gold PW, Licinio J, Wong ML y Chrousos GP. Corticotropin releasing hormone in the pathophysiology of melancholic and atypical depression and in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771: 716-729 (1995)
- Hamajima N. PCR-CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 1(1): 119-123 (2001)
- Hansson AC, Sommer WH, Metsis M, Stromberg I, Agnati LF y Fuxe K. Corticosterone actions on the hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression are mediated by exon IV promoter. *Journal of Neuroendocrinology* 18(2): 104-114 (2006)
- Herr AS, Tsolakidou AF, Yassouridis A, Holsboer F y Rein T. Antidepressants differentially influence the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor *in vitro*. *Neuroendocrinology* 78(1): 12-22 (2003)
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG y Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318(6047): 635-641 (1985)
- Holsboer F y Barden N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrine Reviews* 17(2): 187-205 (1996)
- Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkmann AO, De Jong FH y Lamberts SW. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with increased sensitivity to glucocorticoids *in vivo*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(1): 144-151 (1998)
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G y Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Research* 109(2): 143-148 (2002)

Koch JM, Kell S, Hinze-Selch D y Aldenhoff JB. Changes in CREB-phosphorylation during recovery from major depression. *Journal of Psychiatric Research* 36(6): 369-375 (2002)

Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO y Lamberts SW. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Human Genetics* 99(5): 663-668 (1997)

Lahiri DK y Nurnberger JL, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19(19): 5444 (1991)

Lai IC, Hong CJ y Tsai SJ. Expression of cAMP response element-binding protein in major depression before and after antidepressant treatment. *Neuropsychobiology* 48(4): 182-185 (2003)

Legradi G, Holzer D, Kapcala LP y Lechan RM. Glucocorticoids inhibit stress-induced phosphorylation of CREB in corticotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 66(2): 86-97 (1997)

Lonze BE y Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35(4): 605-623 (2002)

Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJ, De Kloet ER y Swaab DF. Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *American Journal of Pathology* 158(2): 453-468 (2001)

Malchoff DM, Brufsky A, Reardon G, McDermott P, Javier EC, Bergh CH, Rowe D y Malchoff CD. A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 91(5): 1918-1925 (1993)

Muller MB, Landgraf R, Preil J, Sillaber I, Kresse AE, Keck ME, Zimmermann S, Holsboer F y Wurst W. Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids. *Endocrinology* 141(11): 4262-4269 (2000)

Nair SC, Rimerman RA, Toran EJ, Chen S, Prapapanich V, Butts RN y Smith DF. Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. *Molecular and Cellular Biology* 17(2): 594-603 (1997)

Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT y Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226(4680): 1342-1344 (1984)

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ y Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 34(1): 13-25 (2002)

Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F y Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *The American Journal of Human Genetics* 71(3): 651-655 (2002)

Nibuya M, Morinobu S y Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *The Journal of Neuroscience* 15(11): 7539-7547 (1995)

Nibuya N, Nestler EJ y Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 16(7): 2365-2372 (1996)

Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM y Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *The Journal of Biological Chemistry* 274(39): 27857-27866 (1999)

Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J y Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37(12): 1553-1561 (1998)

Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH y Kenyon CJ. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(6): 1846-1852 (1998)

Pariante CM y Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry* 49(5): 391-404 (2001)

Prado C y Mena I. Basal and frontal activation neuroSPECT demonstrates functional brain changes in major depression. *Alasbimn Journal* 1(3): AJ03-01 (1999)

Quiroz D, Gloger S y Valdivieso S. Trastornos del ánimo, psicofármacos y tiroides. *Revista Médica de Chile* 132: 1413-1324 (2004)

Radka SF, Holst PA, Fritsche M y Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Research* 709(1): 122-301 (1996)

Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hortnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G y Gass P. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *The Journal of Neuroscience* 25(26): 6243-6250 (2005)

Rojas G, Gonzalez I, Díaz B, Miranda E, López F. Eventos vitales y patología psiquiátrica en el nivel primario de atención. *Acta Psiquiátrica y Psicológica de América Latina* 43: 134-140 (1997)

Rosby SP, Nalepa I, Huang M, Perrin C, Buró AM, Schmidt DE, Gillespie DD y Sulser F. Norepinephrine-independent regulation of GR11 mRNA *in vivo* by a tricyclic antidepressant. *Brain Research* 687(1-2): 79-82 (1995)

Russcher H, van Rossum EF, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW y Koper J W. Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Molecular Endocrinology* 19(7): 1687-1696 (2005)

Sapan CV, Lundbland RL y Prince NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29(2): 99-108 (1999)

Sapolsky RM, Krey LC y McEwen BS. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 81(19): 6174-6177 (1984)

Scott LV y Dinan TG. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sciences* 62(22): 1985-1998 (1998)

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S y Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry* 54(1): 70-75 (2003)

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS y Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *The Journal of Neuroscience* 22(8): 3251-3261 (2002)

Simon GE, VonKorff M, Piccinelli M, Fullerton C y Ormel J. An international study of the relation between somatic symptoms and depression. *The New England Journal of Medicine* 341(18): 1329-1335 (1999)

Siuciak JA, Boylan C, Fritsche M, Altar CA y Lindsay RM. BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Research* 710(1-2): 11-20 (1996)

Stassen HH, Angst J y Delini-Stula A. Delayed onset of action of antidepressant drugs? Survey of results of Zurich meta-analyses. *Pharmacopsychiatry* 29(3): 87-96 (1996)

Truss M y Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Reviews* 14(4): 459-479 (1993)

van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA y Lamberts SW. A

polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids *in vivo*, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51(10): 3128-3134 (2002)

van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA y Lamberts SW. Identification of the *Bcl* polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids *in vivo* and body mass index. *Clinical Endocrinology* 59(5): 585-592 (2003)

van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SW y Holsboer F. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biological Psychiatry* 59(8): 681-688 (2006)

van West D, Van Den Eede F, Del-Favero J, Souery D, Norrback KF, Van Duijn C, Sluijs S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Deboutte D, Van Broeckhoven C y Claes S. Glucocorticoid receptor gene-based SNP analysis in patients with recurrent major depression. *Neuropsychopharmacology* 31(3): 620-627 (2006)

Vermeer H, Hendriks-Stegeman BI, van der Burg B, van Buul-Offers SC y Jansen M. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(1): 277-284 (2003)

Vicente B, Rioseco P y Saldivia S. Prevalence of psychiatric disorders in Chile. *Revista Médica de Chile* 130(5): 527-536 (2002)

Volpi S, Rabadan-Diehl C y Aguilera G. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. *Stress* 7(2): 75-83 (2004)

Watson S, Gallagher P, Ferrier IN y Young AH. Post-dexamethasone arginine vasopressin levels in patients with severe mood disorders. *Journal of Psychiatric Research* 40(4): 353-359 (2006)

Westberry JM, Sadosky PW, Hubler TR, Gross KL y Scammell JG. Glucocorticoid resistance in squirrel monkeys results from a combination of a transcriptionally incompetent glucocorticoid receptor and overexpression of the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP51. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 100(1-3): 34-41 (2006)

Wochnik GM, Ruegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F y Rein T. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280(6): 4609-4616 (2005)

World Health Organization. Mental health document. (2006) http://.who.int/_mentalhealth/management/depression/definition/en/2006

Yamamoto H y Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience* 10(11): 3469-3478 (1990)

Yehuda R, Boisoneau D, Mason JW y Giller EL. Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety, and psychotic disorders. *Biological Psychiatry* 34(1-2): 18-25 (1993)

Yudt MR y Cidlowski JA. Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Molecular Endocrinology* 15(7): 1093-1103 (2001)