



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

*DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DEL GEN  
5-HTT ENTRE DOS GRUPOS DE PACIENTES:  
ALCOHÓLICOS CON Y SIN DEPRESIÓN*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DENIA GONZÁLEZ CRUZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** María Benita Leonor Fernández Salgado

**VOCAL:** María Elena Bravo Gómez

**SECRETARIO:** Julia Moreno Aguilar

**1er SUPLENTE:** León Patricio Martínez Castilla

**2° SUPLENTE:** Luis Enrique Becerril Villanueva

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”

**ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Julia Moreno Aguilar

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Luis Enrique Becerril Villanueva

**SUSTENTANTE:**

Denia González Cruz

# ÍNDICE

Contenido	Página
1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1 Aspectos sociodemográficos del abuso del alcohol.....	3
3.2 Aspectos biológicos del abuso del alcohol.....	8
3.3 Serotonina y transportador de serotonina .....	14
3.4 Expresión de genes .....	20
3.5 El transportador de serotonina en el alcoholismo y la depresión .....	23
3.6 Las células mononucleares como modelo neuronal .....	26
4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	28
4.1 Hipótesis .....	28
4.2 Objetivo general.....	28
4.3 Objetivos particulares.....	28
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
5.1 Diagrama de flujo .....	29
5.2 Población de estudio .....	30
5.3 Criterios de selección.....	31
5.4 Separación de PBMC de sangre periférica .....	32
5.5 Extracción de RNA total.....	32
5.6 Síntesis de cDNA por RT .....	33
5.7 Amplificación de <i>GAPDH</i> y <i>5-HTT</i> por PCR.....	34
5.8 Densitometría.....	36

6. RESULTADOS .....	37
6.1 Pureza e integridad del RNA total.....	37
6.2 Resultados cualitativos .....	38
6.2.1 Controles .....	38
6.2.2 Pacientes alcohólicos .....	39
6.2.3 Pacientes alcohólicos con depresión.....	40
6.3 Resultados semicuantitativos.....	41
6.3.1 Densitometría .....	41
6.3.2 Normalización .....	43
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	44
8. CONCLUSIONES.....	49
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
10. APÉNDICES.....	57
10.1 Abreviaturas.....	57
10.2 Consentimiento informado .....	58

## 1. RESUMEN

Recientemente, se ha encontrado una marcada asociación entre los trastornos del abuso de sustancias como el alcohol y trastornos psiquiátricos como la depresión. Investigaciones sugieren que, una disfunción en la neurotransmisión central serotoninérgica y particularmente en el transportador de serotonina (5-HTT) predispone y/o contribuye al desarrollo de estos dos desórdenes.

El objetivo de este estudio es determinar las diferencias que existen en la expresión genética del gen *5-HTT* entre pacientes alcohólicos con y sin depresión comparados con voluntarios sanos. Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de 12 sujetos por grupo de estudio, de las que se extrajo RNA para su transcripción, amplificación y posterior medición de la expresión del gen *5-HTT* de forma semicuantitativa.

Se observó una reducción significativa en la expresión del gen *5-HTT* entre pacientes alcohólicos con y sin depresión en comparación con voluntarios sanos. Sugiriendo que existe una disfunción en la neurotransmisión serotoninérgica debido presuntamente a diferencias en la expresión genética del gen *5-HTT*.

Palabras clave: alcoholismo, depresión, transportador de serotonina, expresión genética.

## 2. INTRODUCCIÓN

Entre las sustancias de abuso que consume la población, el alcohol es la que mas se usa prácticamente en todo el mundo. Alrededor del 90% de la población occidental ha consumido alcohol en algún momento de sus vidas y el 40% ha experimentado efectos perjudiciales temporales o permanentes como resultado de su consumo (Schuckit, et al. 2005). En el año 2000, en la población de entre 15 y 64 años, el consumo de alcohol se relaciono con numerosas causas de muerte en México entre las que se encuentran: la cirrosis hepática, accidentes (especialmente de transito), homicidios y el SIDA (Borges, et al. 2003.)

Recientemente, se ha enfatizado en el hecho de que varios trastornos psiquiátricos no se presentan solos sino que tienden a concurrir. Se encontró una marcada asociación entre los trastornos del abuso de sustancias y trastornos psiquiátricos (Merikangas, et al. 1998). En la búsqueda de generar estrategias mas efectivas para el tratamiento de estos trastornos y sus efectos adversos, se han desarrollado estudios a nivel neurobiológicos y genéticos, en animales y humanos con el objetivo de explicar los mecanismos patogénicos de estos trastornos (Niemela, 2007). Muchas líneas de investigación sugieren que, una disfunción en la neurotransmisión central serotoninérgica y particularmente en el transportador de serotonina (5-HTT) predispone y/o contribuye al desarrollo de estos trastornos (Chastain, et al. 2006, Heinz, et al. 2001, Niemela, 2007, Salcedo, 2007).

En esta investigación se realiza un estudio preliminar de la expresión genética del 5-HTT en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con dependencia al alcohol con y sin depresión mayor comorbida.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### **3.1 Aspectos sociodemográficos del abuso del alcohol**

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define el alcoholismo en el “*Glosario de términos de alcohol y drogas*” como un término empleado generalmente para referirse al consumo crónico, continuo o periódico de alcohol, que se caracteriza por un deterioro del control sobre la bebida, frecuentes episodios de intoxicación, obsesión por el alcohol y su consumo a pesar de sus consecuencias adversas. En 1977 en respuesta al uso impreciso y variable del término se propuso utilizar en su lugar la expresión síndrome de dependencia definido en el mismo glosario en general, como el estado de necesitar o depender de algo o alguien, ya sea como apoyo, para funcionar o sobrevivir. Aplicado al alcohol y otras drogas, la dependencia implica una necesidad de consumir dosis repetidas de la sustancia para sentirse bien o no sentirse mal (OMS, 1994).

Los desordenes en el uso del alcohol están incluidos en la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10) como uso nocivo y dependencia (OPS, 1995). También se encuentran en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) (Pichot, et al. 1995); en donde se define la dependencia al alcohol como un patrón desadaptativo de consumo de alcohol que produce un malestar significativo, que esta caracterizado por tres o más de los siguientes criterios, que se presentan durante un periodo de un año continuo:

1. Tolerancia: ingesta de cantidades mayores para conseguir el mismo efecto, o cuando el efecto disminuye con el consumo continuo.
2. Abstinencia: Ingestión de alcohol o sustancias parecidas para alivio de los signos y síntomas originados por la suspensión del consumo de alcohol.
3. Beber por periodos más largos y en grandes cantidades de lo que originalmente se pretendía.

4. Deseos o esfuerzos infructuosos para controlar el consumo.
5. Emplear mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención y uso de alcohol.
6. Reducción o abandono de actividades sociales, laborales y familiares como consecuencia del consumo.
7. Continuar el consumo a pesar de tener conciencia de la existencia de problemas ocasionados por el alcohol.

El alcoholismo es una de las formas prevalentes del abuso de sustancias en los países occidentales, siendo una condición altamente frecuente y discapacitante. Se considera una enfermedad crónica, cuyo desarrollo y manifestaciones están influenciados por factores genéticos, psicosociales y ambientales (Hasin, et al. 2007). Su consumo en exceso y prolongado tiene un amplio intervalo de impactos médicos, sociales y económicos. Es también uno de los desordenes mas costosos socialmente, en términos de atención medica, criminalidad, disrupción familiar y pérdida de productividad (Harwood, et al. 1998).

En nuestro país, las Encuestas Nacionales de Adicciones de los años 1988, 1993, 1998 y 2002 indican cambios en el consumo de alcohol y resalta un descenso importante en la tasa de abstinencia. También se aprecia una marcada tendencia en el aumento de la población consumidora de alcohol a bebedores fuertes y dependientes en ambos sexos y a edades de inicio cada vez más tempranas y económicamente productivas (Secretaria de Salud 1988, 1990, 1994, 1998, 2002).

Referente a este aumento en el consumo de alcohol, se ha encontrado que las mujeres se han sumado a este, además de la población adolescente que copia los modelos adultos. A diferencia de sus padres, los adolescentes de hoy parecen desarrollarse en un ambiente mas “húmedo” donde se tolera y hasta podría decirse, se promueve el consumo del alcohol (Medina-Mora, et al. 1997). En México existe la Ley General de Salud que limita el consumo de alcohol en este sector de la población y en los establecimientos comerciales pero generalmente se hace caso omiso de ella (Ley General de Salud, 1984).

Asimismo, el consumo de alcohol sigue siendo un elemento importante del paso a la edad adulta pero ahora se suma a él un mayor número de mujeres y se presenta a edades más tempranas; un 67% de los varones y un 77.3% de las mujeres han bebido cuando menos una copa completa de alcohol antes de cumplir 18 años, edad legal para beber. El índice de consumo fuerte (esto es, 5 copas o mas por ocasión, al menos una vez por mes) es alto y llega a un 3.6% en los varones y un 1.5% en las mujeres, entre 12 y 17 años mientras que alcanza a un 9% de los varones y a un 1% de las mujeres entre 18 y 65 años (Secretaría de Salud, et al. 2002).

Comparaciones internacionales ubican a México entre los primeros lugares de mortalidad por cirrosis hepática, con una tasa de 22 muertes por 100,000 habitantes. Si bien la sobremortalidad existente en nuestro país se puede asociar con otros riesgos derivados de infecciones hepáticas o deficiencias nutricionales, es un hecho que la mortalidad por cirrosis asociada con el abuso de alcohol va en ascenso. En los hombres, esta aumento en 72%, entre 1970 y 1995 y presento un aumento del 13% en el caso de las mujeres (Secretaría de Salud y DGEI 1970, 1998).

Para el año 2003, las enfermedades asociadas directa o indirectamente al consumo de bebidas embriagantes figuraron entre las diez principales razones de mortalidad en nuestro país. La enfermedad alcohólica y otras enfermedades crónicas del hígado representaron la quinta causa, en tanto que los accidentes, las agresiones u homicidios figuraron en la cuarta y décima causa, respectivamente (INEGI, 2003).

Todo lo anterior obliga a considerar dos aspectos: a) altos costos en los sistemas de salud generados por la atención y los servicios por enfermedades asociadas al consumo excesivo de alcohol (López, et al. 1998, Solís, et al. 1999) y b) el consumo de alcohol representa uno de los problemas prioritarios de salud pública en México (Solís, et al. 2007).

Aunado a este problema, recientemente se ha enfatizado el hecho de que varios de los trastornos psiquiátricos no se presentan solos, sino que tienden a concurrir con los trastornos derivados del uso de sustancias. Un trabajo reciente de investigación transcultural en que participo México ha permitido avanzar en el conocimiento del problema (Merikangas, et al. 1998); la investigación reunió datos de cinco países donde se aplicaron instrumentos de detección de casos similares y diseños de investigación plenamente comparables. En general se encontró una marcada asociación entre los trastornos del uso de sustancias y los trastornos psiquiátricos como la ansiedad y la depresión. De este modo, se observó una tendencia según la cual, cuanto más se avanza en el uso de alcohol y drogas (abuso y dependencia), aumenta la comorbilidad con los otros dos trastornos psiquiátricos. En México 9.4% de las personas con abuso de alcohol presentaban también un trastorno afectivo (Medina-Mora, et al. 1997).

La depresión es un trastorno del afecto que produce en las personas estados de ánimo abatido con tristeza o decaimiento. Se acompaña de algunos síntomas específicos como irritabilidad, ansiedad, pérdida o ganancia de apetito o peso, sentimiento de culpa, minusvalía y desesperanza; generalmente provoca que las personas afectadas sean incapaces de afrontar sus actividades cotidianas y pueden llegar a desarrollar ideas de muerte o suicidas que ponen en peligro su vida. Además, la depresión mayor fue la cuarta causa más perjudicial en el año 1990 y llegara a ser la segunda en el año 2020 (Muñoz, 2005).

En años recientes, se ha prestado mayor atención a la comorbilidad que hay entre el uso y abuso de sustancias con los trastornos psiquiátricos. Sin embargo, se requiere de una mayor comprensión sobre los patrones y correlatos del inicio de este tipo de trastornos (Kessler, et al. 2001).

Su importancia reside principalmente en que (Kessler, et al. 2001):

1) a lo largo de la vida, este tipo de correlación tiende a ser crónico para ambos trastornos;

2) las personas afectadas muestran un mayor deterioro y mayor riesgo suicida, en comparación con las personas que solo tienen una de estas patologías;

3) al evitar el desarrollo de la comorbilidad entre las personas que presentan solo trastornos mentales o solo por el uso de sustancias se producirán efectos preventivos importantes.

### **3.2 Aspectos biológicos del abuso del alcohol (Fleming, et al. 2006)**

El alcohol de dos carbonos o etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) es un supresor del Sistema Nervioso Central (SNC) ampliamente utilizado debido a que su uso es legal y aceptado en muchas sociedades, lo cual lleva a un abuso y subsecuentes problemas sociales, como se ha descrito.

En cuanto a sus efectos, aunque las personas ven frecuentemente a las bebidas alcohólicas como estimulantes, el etanol es primordialmente un depresivo. La ingestión de cantidades moderadas de etanol, así como otros depresivos como los barbituratos y las benzodiazepinas también puede tener una acción anti-ansiedad y producir desinhibición del comportamiento en un amplio intervalo de dosis.

Las propiedades farmacológicas relevantes del etanol incluyen efectos en el sistema gastrointestinal, cardiovascular y en el SNC. El etanol perturba el fino balance entre las influencias excitatorias e inhibitorias en el cerebro, produciendo desinhibición, ataxia y sedación. El etanol también causa dependencia física, lo cual está demostrado por la elucidación del síndrome de abstinencia en donde los síntomas y la severidad están determinados por la cantidad y la duración del consumo, lo que incluye alteración del sueño, activación del sistema nervioso autónomo, temblores, ataques y en casos severos *delirium tremens*\*

Comparado con otras drogas, se requieren grandes cantidades de alcohol para sus efectos fisiológicos, por lo que en su consumo resulta más como alimento que como droga. El etanol contenido en las bebidas tiene rangos típicos desde 4-6% (v/v) para la cerveza, 10-15% para vino y 40% o más para licores destilados. Un vaso de cerveza, vino, una bebida mezclada o un trago de licor contienen alrededor de 14g de alcohol, alrededor de 0.3 moles de etanol.

*\*Delirium tremens: estado psicótico agudo que se produce durante la fase de abstinencia en las personas dependientes a alcohol y se caracteriza por confusión, desorientación, ideas paranoides, delirios, alucinaciones, inquietud, distracción, temblor, sudor, taquicardia e hipertensión.*

Después de la administración oral, el etanol es absorbido rápidamente hacia el torrente sanguíneo desde el estómago y el intestino delgado y se distribuye en el agua total del cuerpo (0.5-0.7 L/Kg). El pico del nivel máximo de alcohol ocurre alrededor de 30 minutos después su ingesta, cuando el estómago esta vacío. Muchos factores como el peso corporal, la composición y el índice de absorción del tracto gastrointestinal determinan la concentración de etanol en sangre después de la ingestión de una determinada cantidad de alcohol. En promedio, la ingestión de tres bebidas estándar (42g de etanol) con el estómago vacío resulta en una concentración máxima de etanol de 67-92mg/dL en hombres; después de una comida mixta, la máxima concentración en sangre por tres bebidas es 30-53mg/dL en hombres.

Cuando la concentración de etanol en sangre está entre 20-30mg/dL comienza a ser evidente una disminución del control motor fino, los reflejos y alteraciones en el juicio. Más del 50% de las personas están muy intoxicadas por una concentración de 150mg/dL y en casos fatales el promedio de la concentración es alrededor de los 400mg/dL.

En cuanto a la definición de los niveles de intoxicación, esta varía entre ciudades y países. En los Estados Unidos, muchos estados definen el nivel de intoxicación a 80mg/dL. Aunque el alcohol puede medirse en saliva, orina, sudor y sangre, la medición de los niveles en el aire exhalado permanece como el método primario para medir el nivel de intoxicación. En México, está prohibido conducir vehículos con una cantidad de alcohol en sangre superior a 0.8g/L o de alcohol en aire expirado superior a 0.4mg/L (Reglamento de Transito Metropolitano, 2010).

En cuanto a su eliminación; se lleva a cabo el metabolismo del primer paso por la enzima alcohol deshidrogenasa gástrica y del hígado, continuando con oxidaciones secuenciales hepáticas, primero a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa y luego a ácido acético por la enzima aldehído deshidrogenasa.

Cada biotransformación requiere  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamida adenina dinucleótido), de esta forma, la oxidación de 1 mol de etanol (46g) a 1 mol de ácido acético requiere 2 moles de  $\text{NAD}^+$  (aproximadamente 1.3Kg). Esto excede el suministro de  $\text{NAD}^+$  en el hígado y limita el metabolismo del etanol en alrededor de 8g o 10mL por hora en un adulto de 70kg.

A pesar de las limitaciones, existe una enzima hepática de la familia del citocromo P450, llamada CYP2E1 que también puede contribuir a la biotransformación, especialmente a altas concentraciones de etanol y bajo condiciones como el alcoholismo. Aunque el CYP2E1 usualmente no es un factor relevante en el metabolismo del etanol, puede ser un importante sitio de interacción del etanol con otras drogas.

Para individuos con una función hepática normal, el etanol se elimina en un índice 60-90 minutos para una bebida estándar. Cabe hacer notar que las concentraciones de alcohol en sangre suelen ser más altas en mujeres que en hombres que consumen la misma cantidad de alcohol porque en promedio las mujeres son más pequeñas que los hombres, tienen menos agua corporal por unidad de peso en el cual se distribuye el etanol y tienen menor actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa que los hombres.

El etanol por sí mismo es neurotóxico y aunque la desnutrición o deficiencias vitamínicas probablemente juegan un papel importante en las complicaciones del alcoholismo como en la encefalopatía de Wernicke\* y la psicosis de Korsakoff\*\*, muchos de los daños en el SNC inducidos por el alcohol en los países occidentales son debido principalmente a su alta ingesta.

*\*Encefalopatía de Wernicke: Síndrome neurológico agudo potencialmente mortal, consiste en confusión, apatía, desánimo, parálisis de músculos oculares, alteraciones del equilibrio y ataxia.*

*\*\*Psicosis de Korsakoff: Trastorno de la memoria con una amnesia anterógrada, retrógrada y disminución de la actividad psíquica acompañada de polineuropatías.*

El consumo diario de grandes cantidades de etanol también lleva a un incremento en la incidencia de falla cardiovascular no coronaria como arritmias, cardiomiopatía, apoplejía hemorrágica y el consumo de más de 30g de alcohol está asociado con un aumento de 1.5-2.3 mmHg en la presión diastólica y sistólica.

En el músculo esquelético un consumo crónico, fuerte y diario de etanol esta asociado con miopatías, aun cuando se ajusten otros factores como la edad, uso de nicotina y enfermedades crónicas. Las biopsias del músculo de bebedores fuertes también revelan una disminución en las reservas de glicógeno y en la actividad de la enzima piruvato cinasa.

Por otra parte, la ingestión de etanol causa una sensación de calor porque este aumenta el flujo sanguíneo cutáneo y gástrico; sin embargo, se pierde rápidamente y la temperatura interna del cuerpo decae. Después del consumo de grandes cantidades de alcohol, el mecanismo central de regulación de la temperatura comienza a deprimirse y la caída de la temperatura comienza a ser más pronunciada. La acción de la disminución de la temperatura es mayor y más peligrosa cuando la temperatura del medio ambiente es baja. Algunos estudios de muertes por hipotermia sugieren que el alcohol es el factor de mayor riesgo en estos eventos.

Asimismo, el etanol inhibe la liberación de vasopresina (hormona antidiurética) desde la glándula pituitaria posterior, resultando en un aumento en la diuresis. Los alcohólicos tienen menos producción de orina que sujetos control en respuesta a una dosis de etanol, sugiriendo que se desarrolla tolerancia al efecto diurético del etanol. Inclusive, la falta de proteínas, vitaminas y muchos otros nutrientes en bebidas alcohólicas predispone a quienes consumen grandes cantidades de alcohol a deficiencias nutricionales. Los alcohólicos presentan frecuentemente estas deficiencias debido a una disminución en la ingesta, absorción y alteración en la utilización de nutrientes.

El etanol es también el factor etiológico primario para la disfunción esofágica; esta asociado con el desarrollo de reflujo esofágico, ruptura traumática de esófago y desgarre de Mallory-Weiss\*, así como cáncer de esófago.

A bajas concentraciones de alcohol en sangre existen pequeños cambios en la función esofágica y a altas concentraciones puede ocurrir una disminución en la peristalsis y en la presión del esfínter esofágico. Un uso fuerte de etanol puede alterar la barrera de la mucosa gástrica y causar gastritis aguda y crónica. También parece estimular las secreciones gástricas al excitar los nervios sensoriales en la mucosa gástrica, bucal y promover la liberación de gastrina e histamina.

El uso fuerte de etanol también es la causa más común de pancreatitis aguda y crónica en los Estados Unidos. La pancreatitis aguda alcohólica esta caracterizada por el comienzo brusco de dolor abdominal, náusea, vómito e incremento en los niveles de enzimas pancreáticas en suero y orina. Aunque muchos ataques no son fatales la pancreatitis hemorrágica puede desarrollarse y llevar a cuadros como shock, falla renal, respiratoria y la muerte.

En el hígado, el etanol produce varios efectos deletéreos como son: infiltración de grasas al hígado, hepatitis y cirrosis. Conjuntamente, el consumo crónico de etanol causa estrés oxidante sobre el hígado debido a la generación de radicales libres, contribuyendo al daño inducido por un consumo excesivo de esta sustancia.

*\*Desgarre de Mallory-Weiss: Laceraciones en la membrana mucosa del esófago, causados por hacer fuertes y prolongados esfuerzos para vomitar o toser. Puede aparecer con cierta frecuencia en el punto de unión entre el esófago y el estómago y puede acompañarse de sangrado.*

Por otro lado, a pesar de la creencia de que el alcohol puede aumentar la actividad sexual se observa mas seguido el efecto opuesto. Muchas drogas de abuso, incluyendo el etanol, tienen efectos desinhibitorios que podrían llevar inicialmente a un incremento del libido; sin embargo, un excesivo o prolongado uso del alcohol lleva al deterioro de la función sexual en hombres que puede causar atrofia testicular, disminución en la fertilidad, disminución en el deseo sexual e incrementa la latencia eyaculatoria.

El efecto en las mujeres dependientes a alcohol es menos clara, pero un alto porcentaje de ellas se quejan de disminución de la libido, disminución en la lubricación vaginal y anormalidades en el ciclo menstrual. Sin embargo es claro que durante el embarazo, el abuso en el consumo de alcohol causa el síndrome fetal alcohólico (SFA) caracterizado por una triada de anormalidades en el recién nacido que puede incluir: 1) anormalidades craneofaciales, 2) disfunción del SNC y 3) pre y/o postnatal atrofia del crecimiento. Por ejemplo, déficit del crecimiento prenatal y postnatal, microcefalia, retraso mental, puente nasal hundido y defectos cardiacos.

### 3.3 Serotonina y transportador de serotonina (Sanders-Bush y Mayer, 2006)

En 1946 fue designada inicialmente como “enteramina” debido a su aislamiento de las células enterocromafines de la mucosa gastrointestinal así como de otros tejidos animales. Después de su identificación química, las similitudes entre la serotonina y el LSD (dietilamida del ácido lisérgico) llevaron a la especulación lógica de que las sustancias relacionadas con esta podían causar desordenes mentales.

Gracias al desarrollo de métodos espectrofluorométricos y bioensayos, en 1950 se reveló que la serotonina estaba presente abundantemente en ciertas áreas del cerebro de los mamíferos. Desde su caracterización química y síntesis completa en 1948 y 1951 respectivamente, la serotonina ha sido considerablemente interesante tanto para psiquiatras como farmacólogos.

Estos argumentos marcaron el comienzo de la neuropsicofarmacología moderna y la hipótesis de que las alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica son de importancia en la patofisiología y tratamiento de las enfermedades psiquiátricas.

La serotonina (Fig. 1) o 5-hidroxitriptamina (5-HT), se ha identificado como un neurotransmisor y neuromodulador en el SNC, un inmunomodulador en linfocitos y un mensajero endocrino, exocrino o paracrino de las células enterocromafines.

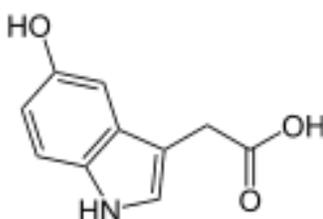


Fig.1 Estructura química de la serotonina.

Las células serotoninérgicas se concentran en la parte media del tallo cerebral, agrupándose en nueve núcleos principales conocidos como complejo nuclear rafe (Fig. 2). A partir de estos núcleos, nacen fibras que llegan prácticamente a todo el sistema nervioso (ganglios basales, hipotálamo, tálamo, hipocampo, sistema límbico, corteza cerebral, cerebelo y medula espinal).

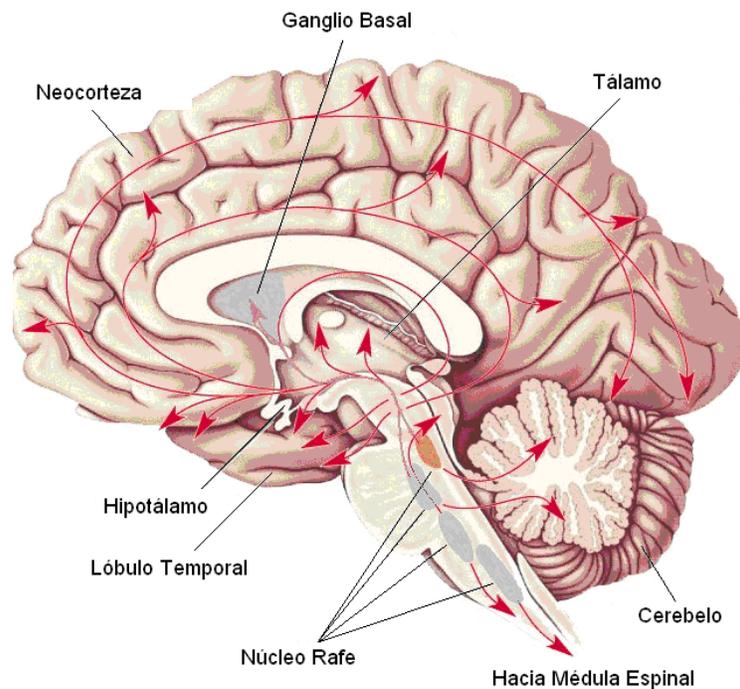


Fig.2 La difusión del sistema serotoninérgico surge del núcleo rafe. El núcleo rafe está agrupado a lo largo de la línea media del tronco cerebral y se proyecta extensamente a todos los niveles del SNC (Mozzoni, 2007).

La serotonina tiene influencia en las funciones del sistema cardiovascular, reproductor, gastrointestinal e inmune y se encuentra en altas concentraciones en células enterocromafines del tracto gastrointestinal, gránulos de almacenamiento en plaquetas y en términos generales por todo el SNC.

Esta relacionada con múltiples procesos en los que participa el SNC siendo fundamentalmente los de regulación del sueño, dolor, temperatura corporal, la actividad neuroendocrina y el estado de ánimo, la actividad sexual, el apetito y en diferentes desordenes neuropsiquiátricos como la depresión, desorden obsesivo-compulsivo, adicción a drogas, esquizofrenia, Alzheimer y desordenes alimenticios, entre otros.

La serotonina es sintetizada por una vía de dos pasos a partir del aminoácido esencial triptófano (TRP), cuya fuente primaria es de la proteína de la dieta. En la sangre, alrededor del 80-90% de TRP se encuentra unido a albúmina y compite con los ácidos grasos libres por los sitios de unión; el TRP es transportado activamente dentro del cerebro por una proteína acarreadora que también transporta otros aminoácidos neutros, con los que compite para transportarse por lo que, los niveles de TRP en el cerebro están influenciados no solo por su concentración en plasma sino también por concentraciones en plasma de otros aminoácidos.

Las neuronas serotoninérgicas, contienen la enzima l-triptofano-5-monooxigenasa, más comúnmente llamada triptófano hidroxilasa la cual convierte el TRP a 5-hidroxitriptofano, empleando oxígeno molecular y un cofactor. Esta es la enzima limitante de la síntesis de 5-HT y no es saturable por el TRP a concentraciones fisiológicas y tampoco es regulada por inhibición del producto final. El producto de esta reacción es el 5-hidroxitriptofano; este compuesto es descarboxilado para formar la 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina (Fig 3).

La principal ruta de metabolismo de la serotonina involucra una desaminación oxidativa por la enzima monoaminoxidasa (MAO), formando un intermediario acetaldehído, el aldehído es convertido a ácido 5-hidroxiindolacético por la enzima aldehído deshidrogenasa (Fig. 3).

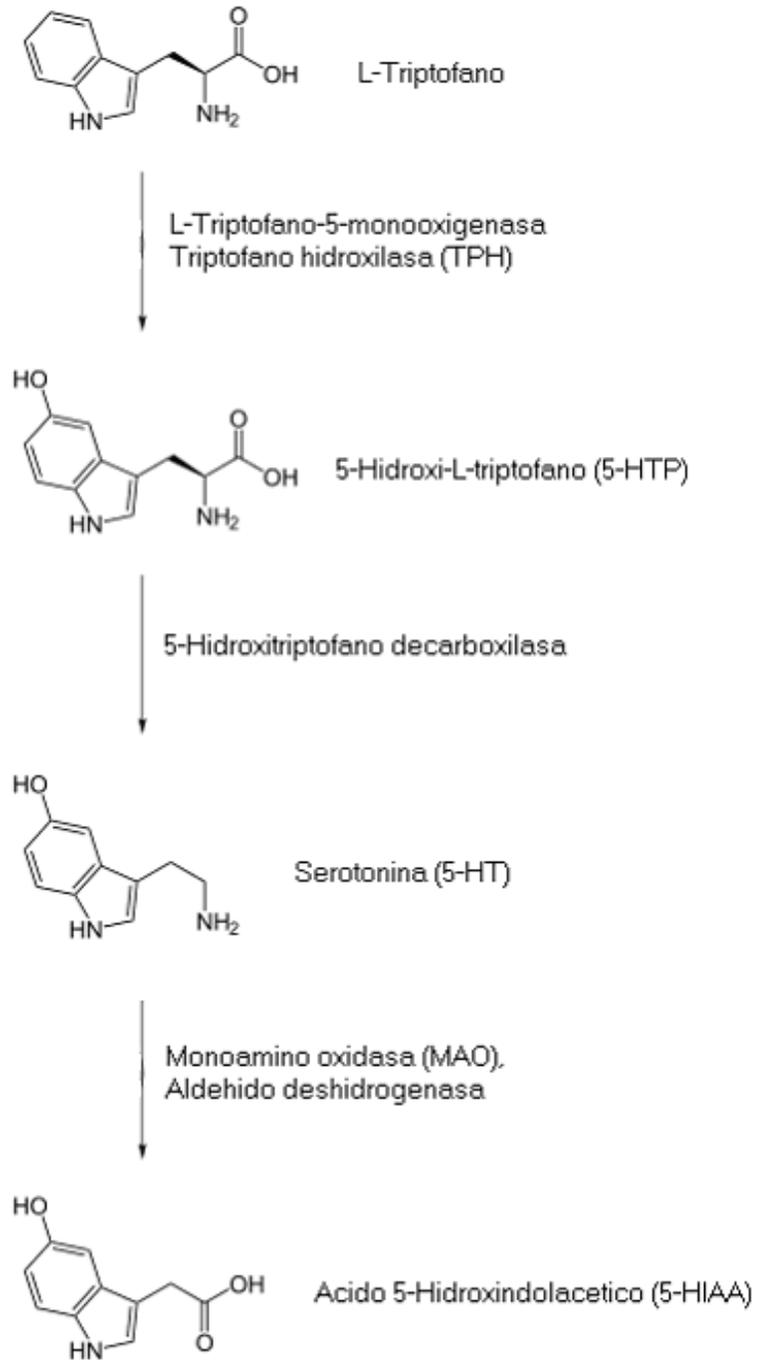


Fig.3 Síntesis y degradación de la serotonina (5-HT).  
(Sanders-Bush y Mayer, 2006).

La serotonina sintetizada es almacenada en vesículas, que pueden liberarse por exocitosis desde las neuronas serotoninérgicas. En el sistema nervioso la acción de liberación de serotonina esta determinada por la captación neuronal mediada por un transportador específico. También existen diversos receptores específicos de membrana que están presentes tanto en SNC como Sistema Nervioso Periférico (SNP), así como numerosos tejidos no neuronales como el intestino, sistema cardiovascular, células sanguíneas. Hasta el momento se han identificado siete miembros dentro de la familia de receptores de serotonina (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>) y diversos subtipos, todos ellos también constituyen una gran área de investigación del sistema serotoninérgico.

Los transportadores de monoaminas son proteínas funcionales que remueven las monoaminas liberadas del espacio sináptico. La serotonina y la dopamina tienen su propio transportador específico, denominado para el caso de la serotonina como transportador de serotonina o 5-HTT por sus siglas en inglés.

Particularmente, el 5-HTT en el cerebro y en varios tejidos periféricos es responsable de la reabsorción por transporte activo de la serotonina hacia las neuronas, células enterocromafines, plaquetas y otras células. De esta forma regula la reabsorción rápida y el reciclaje de la serotonina que se libera al espacio sináptico después de una estimulación neuronal y su retorno a las terminales presinápticas, donde es metabolizado o almacenado en vesículas secretoras. Por lo tanto, tiene un papel crítico en la regulación homeostática de la magnitud, duración y distribución espacial de señales que se extiende a todos los receptores de serotonina.

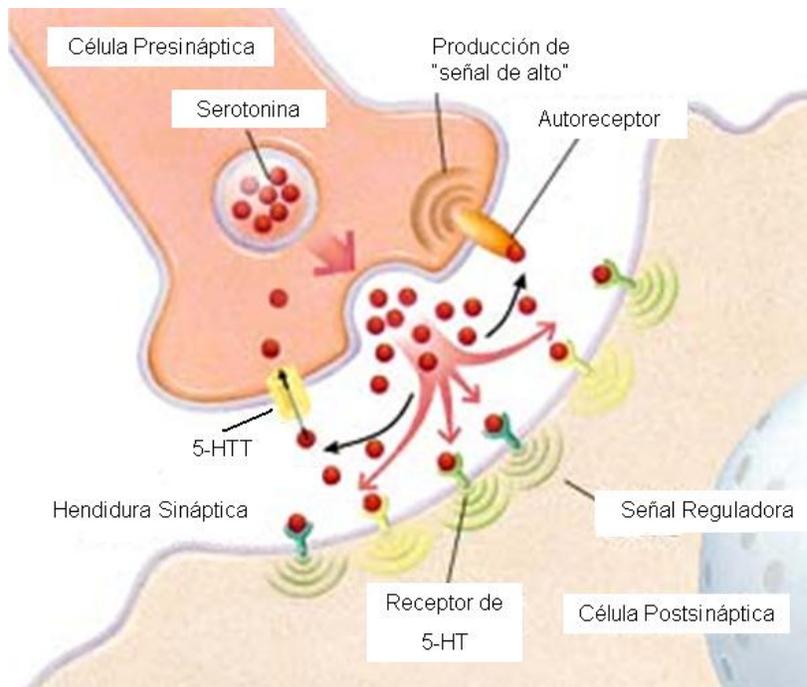


Fig. 4 Representación grafica de la remoción de la serotonina en el espacio sináptico por el 5-HTT. (Tovar-Franco, 2010).

El 5-HTT está localizado en la membrana de los axones terminales presinápticos, así como en los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas, donde juega un papel relevante en la transmisión sináptica. El transportador también está extensamente distribuido en varios tejidos periféricos como las plaquetas, placenta, endotelio pulmonar, mastocitos, retina y linfocitos (Fozard, et al. 1989, Lima y Schmeer, 1994, Faraj, et al. 1994). Sin embargo, su significado fisiológico en estas células y tejidos periféricos es aun desconocido.

### 3.4 Expresión de genes

Un gen es un fragmento de la molécula de DNA que se transcribe en RNA y corresponde a una sola proteína. Los mecanismos mediante los cuales una célula traduce la secuencia de nucleótidos de un gen a la secuencia de aminoácidos de una proteína, se conoce como *expresión genética* (Alberts, et al. 2004).

El gen del transportador de serotonina humano se localiza en el cromosoma 17q11.2 y abarca 37.8kb. Estructuralmente, el 5-HTT pertenece a una superfamilia de transportadores dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  con alrededor de 30 miembros diferentes. Esta compuesto de 630 aminoácidos, es una proteína integral de membrana, con 12 dominios transmembranales hidrofóbicos y ambas terminales, amino y carboxilo, están localizadas en el dominio intracelular (Fig. 5). Este transportador contiene sitios para modificación post-transcripcional por glicosilación y fosforilación (Blakely, et al. 1994).

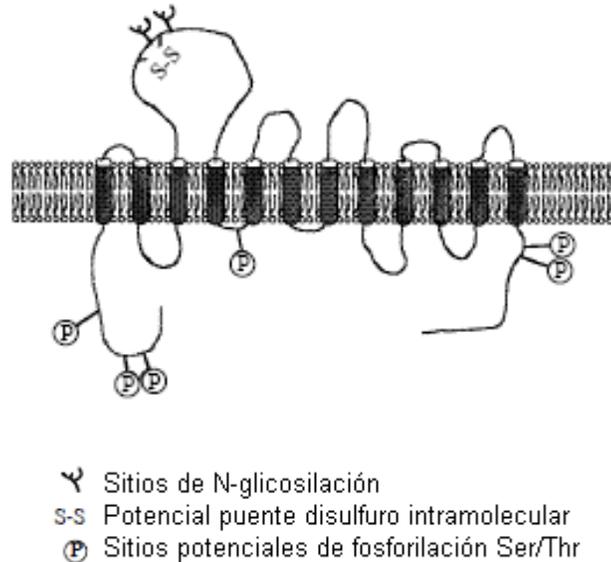


Fig.5 Representación grafica de la estructura del transportador de serotonina (5-HTT).  
(Blakely, et al. 1994).

Cuando la célula necesita una proteína determinada, la secuencia de nucleótidos de la región apropiada de la inmensa molécula de DNA se copia primero a RNA (transcripción) y son estas copias las que se utilizan como moldes para dirigir la síntesis de las proteínas (traducción). Todas las células expresan su información genética de esta manera, un principio tan fundamental que se denomina *dogma central* de la biología molecular (Fig. 6) (Alberts, et al. 2004).

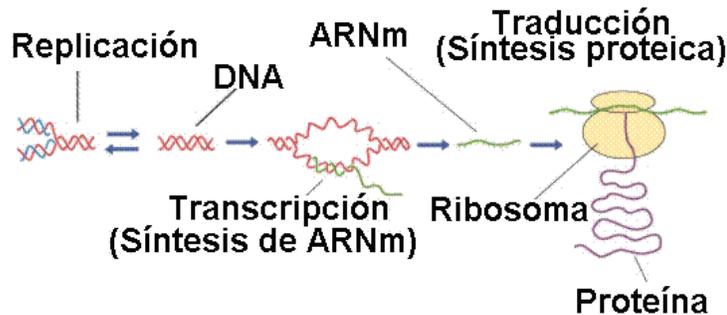


Fig.6 Representación grafica del dogma central de la biología molecular. La información fluye (con la excepción de la transcripción reversa) del ADN al ARN por el proceso llamado transcripción, y luego a la proteína por el proceso de traducción (Raisman y González, 2008).

En todas las células, la regulación de la expresión de los genes es un mecanismo fundamental de desarrollo, homeostasis y adaptación al medio ambiente. En el sistema nervioso, la iniciación de la transcripción es regulada de manera significativa por señales intracelulares y extracelulares que pueden favorecer o inhibir dicho proceso (Roberts y Lundbland, 2004).

Se ha observado que las sustancias de abuso como cocaína, morfina, anfetaminas y etanol entre otras, inducen indirectamente la expresión de una gran cantidad de genes, en el contexto de la síntesis de proteínas, activando varios de las rutas bioquímicas en las neuronas cerebrales. Además, los efectos de las drogas de abuso en la expresión de genes celulares son multifactoriales en espacio, tiempo y niveles haciendo que parezca virtualmente imposible trazar el camino por el cual la adicción interviene en la expresión de un gen en particular (Torres y Horowitz, 1999).

Han surgido hipótesis en las que, la adicción a una droga es vista como una enfermedad mental caracterizada por desordenes neurológicos y uso compulsivo de la sustancia. Dichos desordenes reflejan los cambios neuroadaptativos de la expresión de genes producida por el uso crónico de la sustancia (Genova, et al. 1997). Existen estudios que demuestran que muchas de las sustancias de abuso estimulan indirectamente la transcripción de genes específicos por incremento intracelular del AMPc, lo cual resulta en la activación de proteínas cinasas y fosforilación de varias proteínas celulares (Torres y Horowitz, 1996).

Otras investigaciones han estudiado que la actividad transcripcional del gen *5-HTT* está modulada por una región polimorfica del gen llamada 5-HTTLPR (5-HTT gene-linked polimorphic region), del cual existen dos variantes alélicas corta (s) y larga (l) que modulan de modo distinto la actividad transcripcional del promotor del gen 5-HTT. Algunas de estas se han centrado en la asociación de estas variantes con enfermedades psiquiátricas, como el alcoholismo y la depresión (Barr, et al. 2004, Heinz, et al. 2000, Hinckers, et al. 2006, Lima, et al. 2004).

### **3.5 El transportador de serotonina en el alcoholismo y la depresión**

Los avances en técnicas de biología molecular y genética han hecho posible enfocar gran atención a la identificación de factores de riesgo genético para el alcoholismo. Existe ya una historia larga y rica de investigaciones sobre la heredabilidad y las influencias genéticas de esta enfermedad, la identificación de genes así como de rasgos conductuales y fisiológicos como factores útiles en la predicción de riesgo del alcoholismo, pero aun son insuficientes (Salcedo, 2007).

En la búsqueda de generar estrategias más efectivas para el tratamiento de estos desordenes y sus efectos adversos, se han desarrollado estudios a nivel neurobiológico y genético en animales y humanos con el objetivo de explicar los mecanismos patogénicos de trastornos como el abuso del alcohol y la depresión (Niemela, 2007). Muchas líneas de investigación sugieren que una disfunción en la neurotransmisión central serotoninérgica y particularmente en el 5-HTT predispone y/o contribuye al desarrollo de estos trastornos (Chastain, et al. 2006, Heinz, et al. 2001, Niemela, 2007, Salcedo, 2007).

Siendo un modulador de los niveles extracelulares de serotonina, el 5-HTT es conocido como el principal sitio de acción de fármacos para el tratamiento de las enfermedades psiquiátricas en las que existe una disfunción en el sistema serotoninérgico, tal es el caso de los antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) entre ellos la fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina y citalopram (Lenox y Frazer, 2002). No obstante, también es un sitio importante de acción de sustancias de abuso como la cocaína y las anfetaminas (Lima, 2002).

Estudios de unión de radioligandos, como el [<sup>3</sup>H]citalopram, la [<sup>3</sup>H]imipramina y la [<sup>3</sup>H]paroxetina, muestran una disminución en la unión al 5-HTT en cerebros postmortem de alcohólicos (Storvik, et al. 2006), en tejido cerebral postmortem de víctimas suicidas y pacientes deprimidos (Franks, et al. 1991) así como en plaquetas

(Langer, et al. 1987, Lawrence, et al. 1993, Nemeroff, et al 1991, Wagner, et al. 1990) y linfocitos de sangre periférica de pacientes igualmente deprimidos (Lima y Urbina, 2002 y Peña, et al. 2005). Todos ellos sugieren una alteración en el 5-HTT de pacientes con estos trastornos.

En otros estudios, mediante SPECT (Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único), se midió la captación de serotonina en el cerebro de pacientes alcohólicos y se observó una reducción significativa en la disponibilidad del 5-HTT debido probablemente a causa de los efectos tóxicos del consumo de alcohol (Heinz, et al. 1998).

En primates no humanos, se observó una relación directamente proporcional entre la unión del [<sup>123</sup>I]β-CIT al 5-HTT en la corteza cerebral y la concentración de 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el fluido cerebroespinal (CSF) de estos animales, sugiriendo que las diferencias en estas concentraciones tienen su origen por una alteración en la neurotransmisión de serotonina relacionado con el consumo excesivo de alcohol (Heinz, et al. 1998). De igual forma, se observó mediante SPECT una relación directa en primates no humanos entre la disponibilidad de 5-HTT en el área rafe del cerebro y la ingesta de alcohol, indicando que una disfunción serotoninérgica está asociada con la sensibilidad a la intoxicación por alcohol, así como un exceso en la ingesta del mismo (Heinz, et al. 2003).

Algunas investigaciones muestran que existen concentraciones reducidas de 5-HIAA, el mayor metabolito de la serotonina en CSF de pacientes deprimidos y pacientes con alcoholismo y depresión (alcohólicos depresivos) (Cornelius, et al. 1997). De igual forma, se han encontrado concentraciones reducidas de 5-HT y 5-HIAA en varias áreas del cerebro obtenidas de tejido postmortem de pacientes deprimidos y/o suicidas (Roy, et al. 1989, Gibbons y Davis, 1986).

Otros estudios se han centrado en el polimorfismo del 5-HTTLPR como un componente del gen del transportador que influye en el desarrollo de la dependencia alcohólica. Resultados sugieren una asociación entre la disponibilidad del transportador y la potencial susceptibilidad selectiva de los individuos II-homocigotos a los efectos neurotóxicos del consumo crónico de alcohol (Heinz, et al. 2000). Sin embargo, otros estudios indican que no existen diferencias en la frecuencia alélica del 5-HTTLPR entre individuos con dependencia alcohólica y controles (Marques, et al. 2006).

Debido a que la heredabilidad de la depresión es compleja, se ha concluido que genes múltiples, en interacción con otro(s) y en conjunto con eventos ambientales producen vulnerabilidad a estos desordenes (Lesch, 2004).

De acuerdo a estas evidencias, el sistema serotoninérgico y en específico el 5-HTT, molécula esencial en la regulación de la neurotransmisión serotoninérgica, se relaciona estrechamente con ambos desordenes (el alcoholismo y la depresión) y forma parte de una serie de elementos complejos que originan el desarrollo de los mismos.

### **3.6 Las células mononucleares como modelo neuronal**

Estudiar el metabolismo y procesos regulatorios en tejidos de sujetos con desórdenes del SNC es difícil. Las neuroimágenes que se han desarrollado durante la última década nos permiten estudiar algunas funciones neuronales; sin embargo, esta técnica no puede proveer información en lo que respecta a la bioquímica celular debido a que estas investigaciones moleculares requerirían biopsias de cerebro, siendo una cuestión verdaderamente imposible e irreal (Gladkevich, et al. 2004).

Se han encontrado algunas alternativas a este gran problema. Una de ellas, es la presencia del 5-HTT sobre la membrana plasmática de las neuronas serotoninérgicas, plaquetas, placenta y en células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) (Fozard, et al. 1989, Faraj, et al. 1994), el cual tiene una gran semejanza al que se encuentra en tejidos neuronales (Faraj, et al. 1994).

Usando transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se aisló e identificó la codificación del cDNA de la estructura primaria del sitio de captura de la serotonina en PBMC y mostró ser idéntica a la del 5-HTT del cerebro humano (Villinger, et al. 1994 y Lesch, et al. 1993).

La elucidación de esta estructura y la demostración de su identidad con la del 5-HTT en el cerebro tiene implicaciones importantes ya que las PBMC, que son realmente accesibles pueden utilizarse como modelo del 5-HTT del cerebro para estudiar la regulación y expresión de este gen en individuos alcohólicos y de esta forma entender en lo posible la asociación entre la alteración de la función del transportador y la vulnerabilidad al alcoholismo (Faraj, et al. 1997).

Fortaleciendo el modelo del 5-HTT en PBMC, también se estudio el transporte de serotonina en estas células mediante el uso de radioligandos como [<sup>3</sup>H]5-HT y [<sup>3</sup>H]paroxetina, demostrando similitudes bioquímicas y farmacológicas con las descritas para el 5-HTT en la sinapsis cerebral (Faraj, et al. 1994 y Urbina, et al. 1999).

En resumen, los argumentos para el estudio de padecimientos psiquiátricos y alteraciones inmunológicas a través de las PBMC se basan en tres características (Gladkevich et al. 2004):

1. Expresión de proteínas neuroactivas y procesos en PBMC, entre ellos el 5-HTT.
2. Alteraciones en el funcionamiento de las PBMC en trastornos neuropsiquiátricos.
3. Similitudes de los efectos hormonales en procesos del sistema nervioso y en la fisiología de las PBMC.

Por lo tanto, es posible establecer un modelo de expresión genética del 5-HTT en células mononucleares de sangre periférica o PBMC, que refleje la expresión del mismo en el SNC.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1 Hipótesis

Los pacientes alcohólicos con y sin depresión presentan una disminución en la expresión genética del gen *5-HTT*, en comparación con voluntarios sanos.

### 4.2 Objetivo general

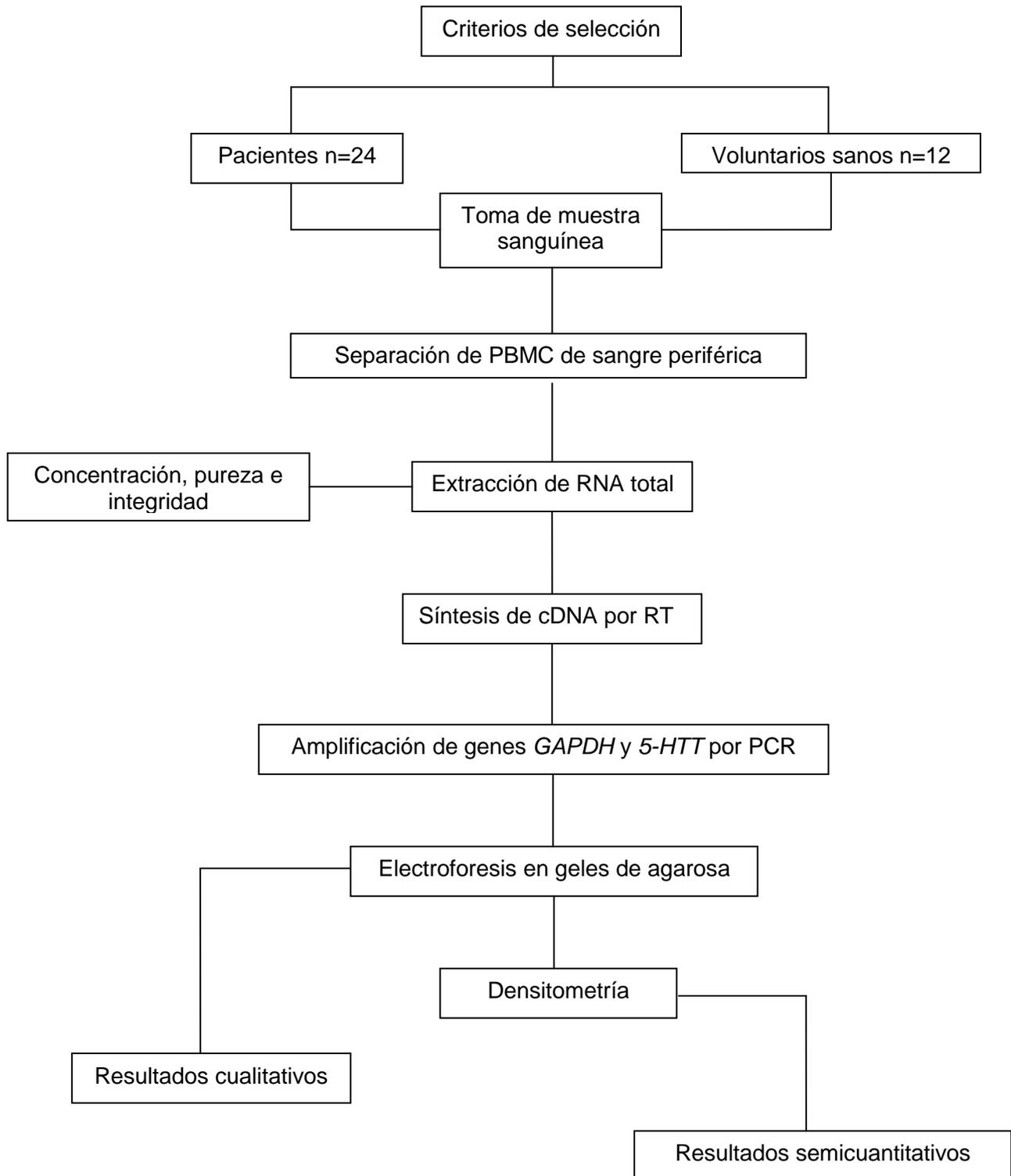
Determinar las diferencias que existen en la expresión genética del gen *5-HTT* entre pacientes alcohólicos con y sin depresión comparada con voluntarios sanos.

### 4.3 Objetivos particulares

- ✓ Realizar la captación de pacientes así como de voluntarios sanos.
- ✓ Separar las PBMC de las muestras sanguíneas.
- ✓ Extraer el RNA total de PBMC de pacientes y voluntarios sanos.
- ✓ Analizar la concentración, pureza e integridad del RNA extraído de pacientes y voluntarios sanos.
- ✓ Sintetizar cDNA mediante RT de pacientes y voluntarios sanos.
- ✓ Amplificar genes *GAPDH* y *5-HTT* mediante PCR de pacientes y voluntarios sanos.
- ✓ Realizar la electroforesis de los productos de amplificación de los genes *GAPDH* y *5-HTT*.
- ✓ Realizar el análisis cualitativo y semicuantitativo de la expresión del gen *5-HTT*.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.1 Diagrama de flujo



## **5.2 Población de estudio**

### ***Pacientes***

Se conformo por un grupo de 58 pacientes que asistieron al Centro de Ayuda a Alcohólicos y Familiares (CAAF) del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz o al Centro de Alcohólicos y Drogadictos Carrasco, A.C. entre los meses de Febrero a Noviembre del año 2008. Se formo un grupo de 12 pacientes que cumplieron los criterios de selección y además de ello presentaban un trastorno depresivo (denominados pacientes alcohólicos con depresión), según la MINI (Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional) (Sheehan y Lecrubier, 1999) realizada por un médico psiquiatra. A partir de este numero de pacientes, se formo otro grupo de 12 pacientes que cumplieron los criterios de selección pero sin trastorno depresivo (denominados pacientes alcohólicos).\*

### ***Voluntarios sanos***

El grupo de voluntarios sanos se conformo de 20 sujetos de una población abierta de la Ciudad de México, de los cuales se seleccionaron 12 que cumplieron con los criterios de selección y de la misma forma, un médico psiquiatra realizo la entrevista MINI para descartar trastornos psiquiátricos así como dependencia alcohólica.\*

\*Todos los sujetos que participaron en el estudio firmaron un consentimiento informado (Apéndice 10.2).

### **5.3 Criterios de selección**

#### ***Pacientes***

Criterios de inclusión:

- ✓ Síndrome dependiente alcohólico (grupos de alcohólicos con y sin depresión)
- ✓ Trastorno depresivo (grupo de alcohólicos con depresión)
- ✓ Sexo masculino o femenino
- ✓ Entre 18 y 65 años

Criterios de exclusión:

- ✓ Encontrarse bajo tratamiento farmacológico
- ✓ Embarazo o lactancia
- ✓ Consumo de otras sustancias de abuso
- ✓ Menores de edad

#### ***Voluntarios sanos***

Criterios de inclusión:

- ✓ Sexo masculino o femenino
- ✓ Entre 18 y 65 años

Criterios de exclusión:

- ✓ Síndrome dependiente alcohólico
- ✓ Trastorno depresivos
- ✓ Encontrarse bajo tratamiento farmacológico
- ✓ Embarazo o lactancia
- ✓ Consumo de sustancias de abuso
- ✓ Menores de edad

#### **5.4 Separación de PBMC de sangre periférica**

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de pacientes y voluntarios sanos en ayuno, de aproximadamente 6mL por punción venosa en el antebrazo en presencia de heparina de litio 87 USP (BD Vacutainer® Plus de Heparina). En seguida, se realizó una dilución 1:1 de la sangre total con solución salina isotónica; posteriormente, esta dilución se adicionó en tubos con Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) y se siguió el procedimiento del reactivo para realizar la separación de PBMC por gradiente de densidad. Las muestras se centrifugaron durante 30min a 1600rpm, a continuación se tomó la capa correspondiente a las células mononucleares y se realizaron dos lavados con solución salina isotónica y centrifugación a 1600rpm por 10min. Por último, se adicionó al botón de PBMC 1mL de TRIzol® LS Reagent (Invitrogen). Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

#### **5.5 Extracción de RNA total**

Las muestras con TRIzol fueron procesadas, adicionando 220µL de cloroformo, agitando en vórtex por aproximadamente 20s e incubando la muestra en hielo por 10min, terminado este tiempo se centrifugó la muestra a 10000rpm por 15min a 4°C obteniendo una fase cloroformo/fenol, una interfase y una fase acuosa incolora; esta última fue transferida a un tubo eppendorf nuevo y para precipitar el RNA se adicionaron 520µL de isopropanol agitando suavemente e incubando la muestra en hielo por 20min. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10000rpm por 15min obteniendo al final un botón tipo gel en el fondo del tubo. Se removió el sobrenadante y al botón de RNA se le realizaron dos lavados con 1ml de etanol al 80% homogenizando en vórtex y centrifugando a 6000rpm por 5min. Después de remover el sobrenadante se secó ligeramente el botón de RNA en campana de flujo laminar por 20min. El RNA fue resuspendido en 20µL de agua Gibco (Invitrogen) que se encuentra libre de DNAsas y RNAsas y se disolvió incubando 5min a 50°C.

Para conocer la concentración del RNA total extraído, se llevo a cabo una dilución 1:50 de este en agua Gibco y se analizo utilizando un espectrofotómetro (Biofotometro Eppendorf) a una relación de absorbancias de  $A_{260}/A_{280}$ . Además, se realizo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 10x (Base Tris, Ácido bórico, EDTA) pH 8.0 por 1hr a 110v teñido posteriormente con bromuro de etidio (BioRad) y visualizado con lámpara UV (UVTransilluminator).

### **5.6 Síntesis de cDNA por RT**

Se utilizó 1 $\mu$ g de RNA para ser sometido a transcripción reversa (RT) con la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). Los componentes de reacción que se indican en la Tabla 1, teniendo un volumen final de 25 $\mu$ L. Se realizo un primer ciclo de 1h a 42°C seguido por ciclo final de 95°C por 10min.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Oligo dT (Promega)	2 $\mu$ L	25ng/ $\mu$ L
Mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs mix, Promega)	1 $\mu$ L	500 $\mu$ M
Buffer (M-MLV RT 5X Reaction Buffer, Promega)	5 $\mu$ L	1X
Enzima (M-MLV RT, Promega)	1 $\mu$ L	200 u/ $\mu$ l
Agua Gibco c.p.b 25 $\mu$ L		

Tabla 1. Elementos de reacción para la transcripción reversa (RT).

### 5.7 Amplificación de *GAPDH* y *5-HTT* por PCR

Se utilizaron 2µL de cDNA sintetizado para la amplificación de un control endógeno o gen de referencia, el gen *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) (Stamova, et al. 2009), así como para la amplificación del gen *5-HTT*.

Se utilizó la enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) y se recurrió a primers ya diseñados para el *5-HTT* (Yang, et al. 2007). Mientras que, para el *GAPDH* se diseñaron los primers correspondientes (NCBI, 2009) y se realizó a cada una de las secuencias (Tabla 2) un análisis bioinformático (Kibbe, 2007).

Gen	Secuencias
<i>5-HTT</i> 534pb	For 5'-GAACTCCTGGAACACTGGCAAC-3'
	Rev 5'-ATGACAAATCCCGAAACGAAGC-3'
<i>GAPDH</i> 874pb	For 5'-TGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
	Rev 5'-GACTTCAACAGCGACACCCACTC-3'

Tabla 2. Secuencias y peso molecular de los primers para los genes *GAPDH* y *5-HTT*.

Los componentes para ambas reacciones se indican en la Tabla 3, teniendo un volumen final de 25µL. La PCR fue realizada en termociclador (Master Cycler Gradient, Eppendorf) bajo las condiciones que se indican en la Tabla 4.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Buffer (5X Green GoTaq <sup>®</sup> Reaction Buffer, Promega)	5µL	1X
Mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs mix, Promega)	1µL	500µM
Primer Forward	1µL	1µM
Primer Reverse	1µL	1µM
Enzima (GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, Promega)	0.5µL	5u/µL
Agua Gibco c.b.p. 25 µL		

Tabla 3. Elementos de reacción para la PCR de ambos genes *GAPDH* y *5-HTT*.

Etapa	<i>GAPDH</i>	<i>5-HTT</i>
Desnaturalización	94°C/3´	94°C/5´
Alineamiento	61°C/1´	54°C/30´´
Polimerización	72°C/1´30´´	72°C/30´´
Extensión	72°C/10´	72°C/10´
Ciclos	35	35

Tabla 4. Condiciones para la PCR de los genes *GAPDH* y *5-HTT*.

Los productos de amplificación de las reacciones se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 10x pH 8.0 por 1hr a 110v, utilizando un marcador de peso molecular de 1500pb (Promega); al término, el gel se tiñó por 5min con bromuro de etidio (BioRad) y las bandas se visualizaron con lámpara UV (UV Transilluminator).

## **5.8 Densitometría**

Se realizó el análisis semicuantitativo de los productos de amplificación por densitometría, con un equipo Fotodocumentador (BioRad Gel Doc) y su programa correspondiente (Quantity One<sup>®</sup> 1-D Analysis version 4.2.1) (Bio-Rad Laboratories) y con los datos obtenidos se elaboraron los resultados semicuantitativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Pureza e integridad del RNA total

Como criterio de calidad y pureza las muestras cumplieron con la relación  $A_{260}/A_{280}$ , entre un valor de 1.8 y 2.0. Para verificar la integridad del RNA total extraído, se sometieron muestras de este a electroforesis en gel de agarosa, donde se observan las dos bandas características propias del RNA ribosomal (Fig. 7), correspondientes a los segmentos 18S y 28S, siendo indicativo de la integridad del RNA extraído (Applied Biosystems, 2004).

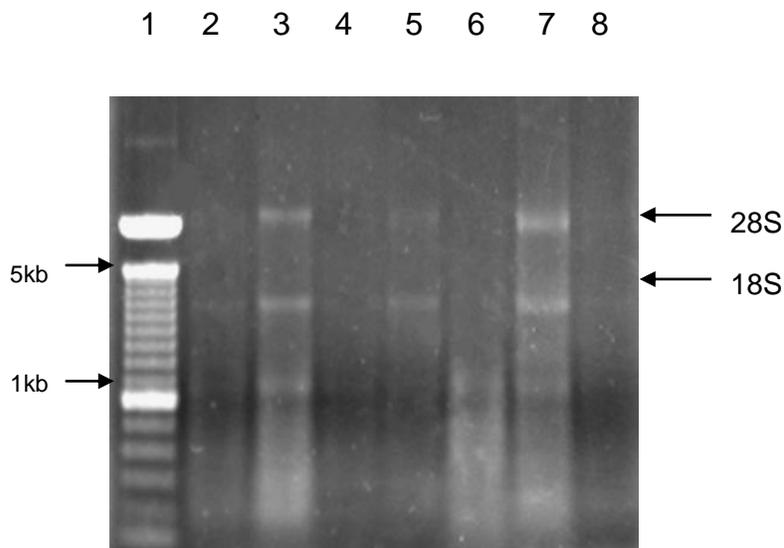


Fig 7. Gel de agarosa que muestra las bandas características del RNA ribosómico correspondientes a los segmentos 18S y 28S con un peso molecular de 1.9kb y 4.5kb respectivamente. El carril 1 es el marcador de peso molecular, los carriles 3, 5 y 7 contienen muestras de RNA total extraído de tres muestras elegidas al azar y los carriles 2, 4, 6 y 8 no contienen muestra.

## 6.2 Resultados cualitativos

Después de realizar la RT-PCR, los resultados obtenidos en los geles de agarosa se analizaron cualitativamente, en base a la presencia o ausencia del producto amplificado y utilizando como control endógeno o gen de referencia el gen *GAPDH*.

### 6.2.1 Voluntarios sanos

Este grupo se conformo de 12 sujetos entre los 18 y 65 años de edad ( $33.5 \pm 10.4$ ) y un 83.4% fueron hombres mientras que el 16.6% fueron mujeres. Los productos de amplificación obtenidos se muestran en la figura 8. Cualitativamente se observa que todos los sujetos expresan el gen *GAPDH* (gen de referencia) al igual que el gen *5-HTT* (gen problema).

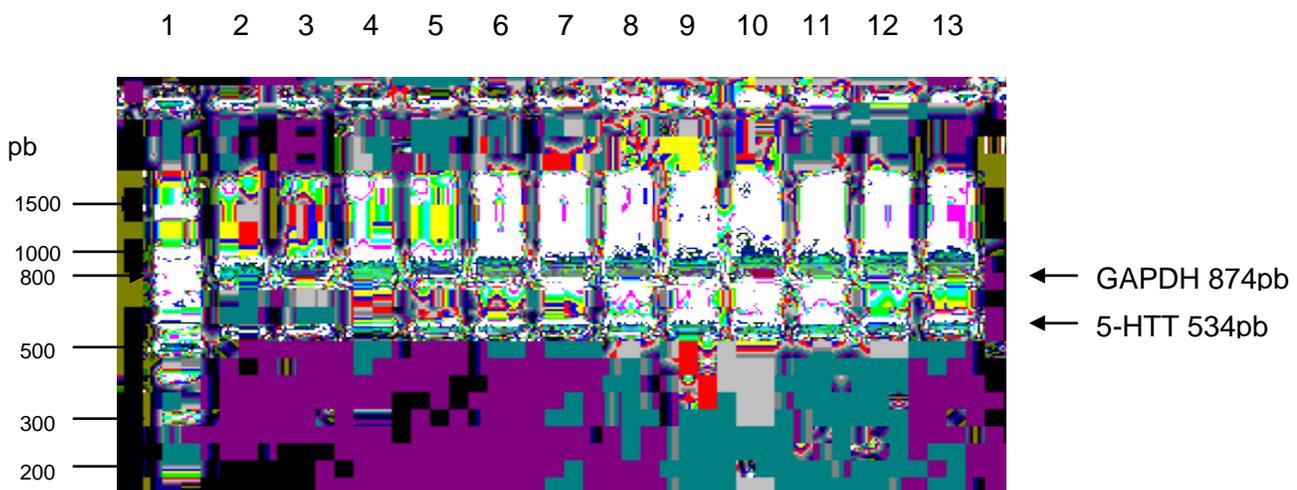


Fig 8. Productos de amplificación de los genes *GAPDH* y *5-HTT* en PBMC de 12 voluntarios sanos por RT-PCR. El carril 1 es el marcador de peso molecular.

### 6.2.2 Pacientes alcohólicos

Se estudio un grupo de 12 pacientes alcohólicos entre 18 y 65 años de edad ( $41.67 \pm 14.01$ ), un 91.7% fueron hombres mientras que el 8.3% fueron mujeres. Los productos de amplificación obtenidos se muestran en la figura 9. Cualitativamente se observa que todos los sujetos expresan el gen *GAPDH* (gen de referencia), mientras que la expresión del gen *5-HTT* (gen problema) es menor en algunos sujetos comparados con los voluntarios sanos.

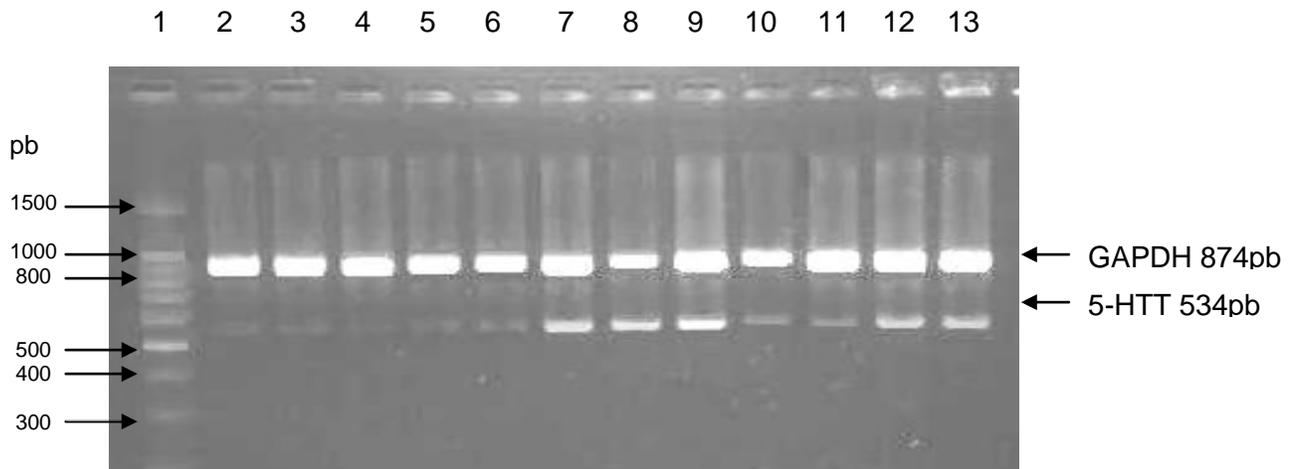


Fig 9. Productos de amplificación de los genes *GAPDH* y *5-HTT* en PBMC de 12 pacientes alcohólicos por RT-PCR. El carril 1 es el marcador de peso molecular.

### 6.2.3 Pacientes alcohólicos con depresión

El grupo de pacientes alcohólicos con depresión también oscilo entre los 18 y 65 años de edad ( $43.25 \pm 12.43$ ) e igualmente un 91.7% fueron hombres mientras que el 8.3% fueron mujeres. Los productos de amplificación obtenidos se muestran en la figura 10; cualitativamente se observa que todos los sujetos expresan el gen *GAPDH* (gen de referencia), mientras que la expresión del gen *5-HTT* (gen problema) es menor o nula en la mayor parte de los sujetos comparados con los voluntarios sanos y los pacientes alcohólicos.

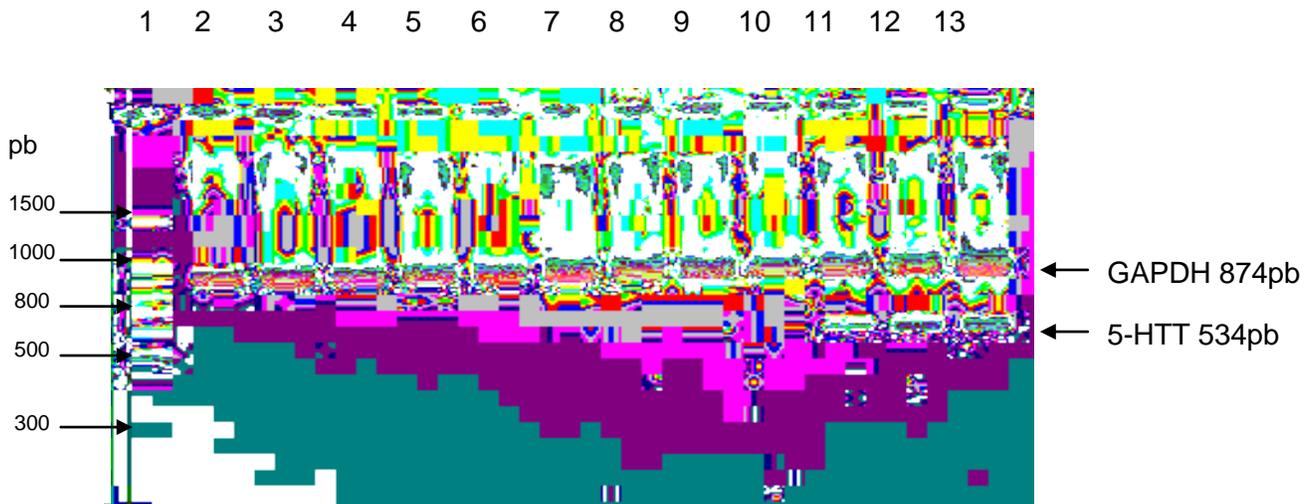


Fig 10. Productos de amplificación de los genes *GAPDH* y *5-HTT* en PBMC de 12 pacientes alcohólicos con depresión por RT-PCR. El carril 1 es el marcador de peso molecular.

### 6.3 Resultados semicuantitativos

#### 6.3.1 Densitometría

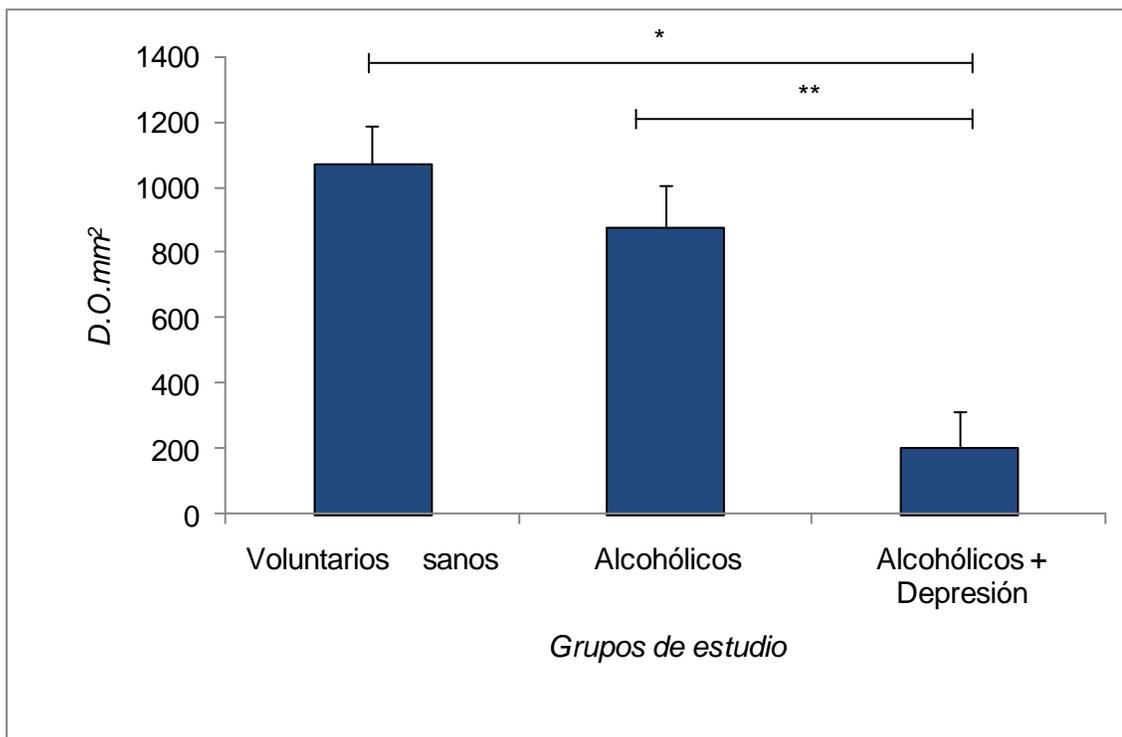
Se realizó un análisis de la densidad óptica por área (D.O. mm<sup>2</sup>) de las bandas observadas en los geles de agarosa para los tres grupos de estudio; como indicador de los niveles de expresión genética. Los resultados descriptivos de la semicuantificación se muestran en la tabla 5.

Gen	Grupos de estudio	n	D.O. mm <sup>2</sup> ± Error Estándar
<i>GAPDH</i>	Total	36	2288.96 ± 119.14
<i>5HTT</i>	Voluntarios sanos	12	1074.03 ± 112.58
	Alcohólicos	12	880.46 ± 127.20
	Alcohólicos con depresión	12	202.64 ± 108.73
	Total	36	719.04 ± 90.83
<i>5HTT/GAPDH</i>	Voluntarios sanos	12	0.501 ± 0.039
	Alcohólicos	12	0.315 ± 0.053
	Alcohólicos con depresión	12	0.097 ± 0.053
	Total	36	0.305 ± 0.039

Tabla 5. Media de la densidad óptica por área (D.O. mm<sup>2</sup>) obtenida de las bandas observadas en los geles de agarosa correspondientes a los genes *GAPDH* y *5-HTT*; así como de la normalización (*5-HTT/GAPDH*) de los tres grupos de estudio. n= numero de muestras.

Después, utilizando el software estadístico SPSS Statistics version 18.0 (IBM, 2008) se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) de la densitometría (D.O.mm<sup>2</sup>) de las bandas correspondientes al gen *5-HTT*.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la densitometría (D.O.mm<sup>2</sup>) de los tres grupos de estudio correspondientes al gen *5-HTT* (F=15.442, gl=35, p<0.0001) (Gráfica 1). Mediante una comparación de Tukey se encontró una diferencia estadística significativa entre la media de los voluntarios sanos y la de alcohólicos con depresión (p<0.0001); así como entre el grupo de alcohólicos y el de alcohólicos con depresión (p<0.0006).

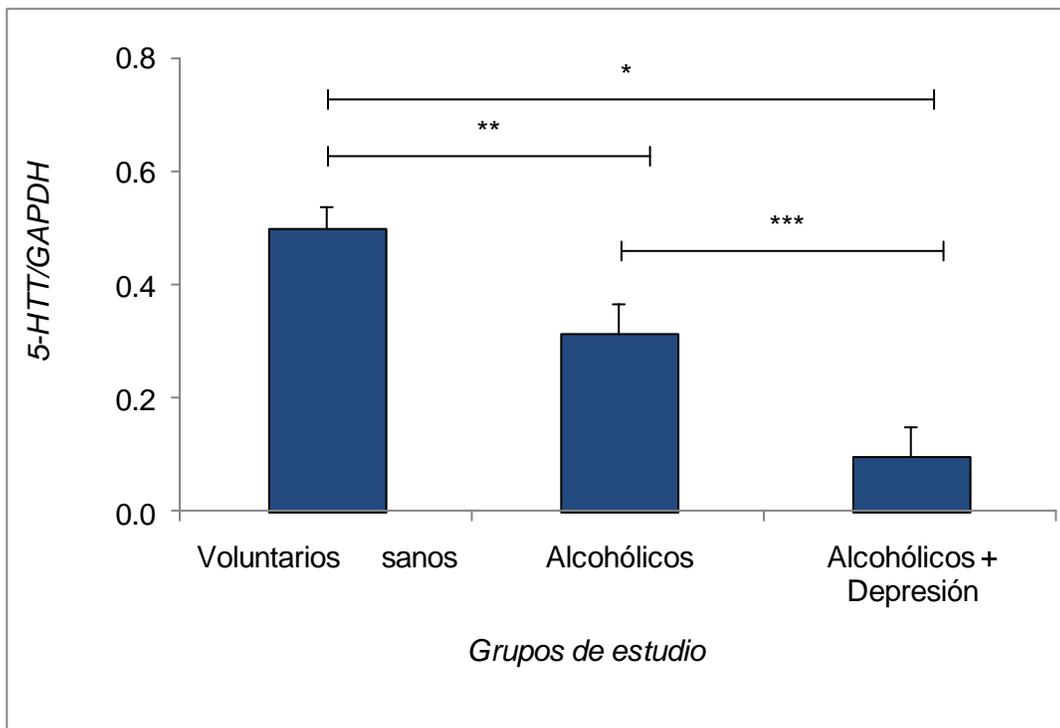


Gráfica 1. D.O. mm<sup>2</sup> ± error estándar de las bandas observadas en los geles de agarosa y que corresponden a los niveles de expresión del gen *5-HTT* en los tres grupos de estudio. \*\*\* p<0.05

### 6.3.2 Normalización

También se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) de la normalización de los niveles de expresión, es decir, la relación o proporción de los niveles de expresión del gen problema y el gen de referencia (*5-HTT/GAPDH*).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la densitometría (D.O.mm<sup>2</sup>) de los tres grupos de estudio correspondientes a la normalización *5-HTT/GAPDH* ( $F=17.120$ ,  $gl=35$ ,  $p<0.0001$ ) (Gráfica 2). Mediante una comparación de Tukey se encontró una diferencia estadística significativa entre los voluntarios sanos y alcohólicos ( $p<0.05$ ); los voluntarios sanos y alcohólicos con depresión ( $p<0.0001$ ); así como entre el grupo de alcohólicos y el de alcohólicos con depresión ( $p<0.009$ ).



Gráfica 2. D.O. mm<sup>2</sup> ± error estándar de las bandas observadas en los geles de agarosa y que corresponden a la normalización *5-HTT/GAPDH* en los tres grupos de estudio. \*, \*\*, \*\*\*  $p<0.05$

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La importancia de la comorbilidad entre la depresión y el alcoholismo se demostró por diversos estudios epidemiológicos. Por ejemplo, la Inspección Nacional de Comorbilidad (NCS) en los Estados Unidos, encontró que en comparación con no-deprimidos, la posibilidad de dependencia al alcohol fue significativamente elevada para hombres y mujeres con depresión y demostró además, que existe el doble de incremento en la posibilidad de presentar depresión entre sujetos con dependencia al alcohol (Kessler, et al. 1997).

Otros estudios, encontraron que en aproximadamente un 31.5% de los individuos con un desorden afectivo como la depresión también presentaban criterios para dependencia al alcohol, comparado con el 14% de aquellos que no tenían un desorden afectivo (Ostacher, 2007).

Por tanto, debido a que los desordenes en el uso del alcohol co-ocurren muchas veces con el trastorno depresivo mayor y el curso de cada una de estos trastornos se ve complicado por el otro, los pacientes que tienen comorbidas estas condiciones tienden a ser más perjudicados que aquellos que tienen solo uno de ellos. Por ende, el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes es todo un reto.

Con el fin de encontrar características biológicas que definan la susceptibilidad de los individuos al desarrollo de trastornos relacionados con el abuso del alcohol, es decir, el alcoholismo o dependencia alcohólica, así como del trastorno depresivo mayor; numerosas publicaciones se han inclinado a hipótesis en las que estas enfermedades tienen en común una disfunción en la neurotransmisión central serotoninérgica (Chastain, et al. 2006, Heinz, et al. 2001, Niemela, 2007, Salcedo, 2007).

En esta investigación, se observó una reducción significativa en la expresión genética del gen *5-HTT* en células mononucleares de sangre periférica en pacientes alcohólicos con y sin depresión comparados con voluntarios sanos.

Cabe señalar que no se encontraron investigaciones previas sobre el estudio del *5-HTT* en células mononucleares de sangre periférica en trastornos comorbidos como el alcoholismo y la depresión. Algunos estudios hallaron una reducción significativa en la unión del radioligando [<sup>3</sup>H]paroxetina al *5-HTT* en linfocitos de sangre periférica de pacientes con depresión mayor (Lima y Urbina, 2002 y Peña, et al. 2005).

Respecto al resultado de esta investigación, la reducción en los niveles de expresión del gen *5-HTT* puede deberse a una disminución en los niveles de concentración de serotonina, como indican algunos estudios en pacientes alcohólicos y pacientes deprimidos, existe una disminución en la concentración de serotonina así como de su metabolito principal, el 5-HIAA (Gibbons y Davis, 1986 y Roy, et al. 1989). Otra explicación es que esta reducción en la expresión genética del *5-HTT* es resultado de una reducción genética directa de los niveles de su correspondiente mRNA, por inhibición de la transcripción del gen debido a los efectos tóxicos del alcohol y/o a los efectos propios del trastorno depresivo (Krishnan y Nestler, 2008 y Chastain, 2006).

Otras investigaciones indican que una variación alélica en la región polimórfica del gen del transportador, el *5-HTTLPR* está asociada con el alcoholismo y ciertos desordenes neuropsiquiátricos y puede conferir una baja expresión del transportador (Heinz, et al. 2000, Marques, et al. 2006). Sin embargo, se han encontrado disminuciones significativas en determinaciones de los niveles de mRNA de esta región polimórfica sin importar las variantes alélicas corta o larga en linfocitos de pacientes con depresión mayor, explicando simplemente la disminución en la proteína (Lima, et al. 2005).

El hallazgo de este estudio, se suma a la hipótesis de que una disfunción en la neurotransmisión central serotoninérgica está implicada en la dependencia alcohólica y el trastorno depresivo. Y por ahora, solo es posible señalar que se trata de otro factor que contribuye en el origen, susceptibilidad o desarrollo de estas enfermedades y en un futuro pueda aportarse en la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos para estos trastornos.

Por otro lado, no hay que omitir que al aumentar los índices de comorbilidad entre estos y otros trastornos neuropsiquiátricos, ha crecido el interés por estudiar tanto las causas como las consecuencias de la correlación entre trastornos. Un estudio (Lynskey, 1998) concluyó que hay esencialmente cuatro clases de explicación para la co-ocurrencia de dos desordenes:

- a) una condición puede crear un aumento en el riesgo de la otra condición;
- b) las condiciones pueden ser comorbidas porque comparten los mismos factores de riesgo;
- c) los factores de riesgo para dos condiciones podrían ser separados y distintos sin embargo correlacionados y es esta correlación entre los factores de riesgo lo que causa que las dos condiciones sean comorbidas;
- d) las condiciones podrían ser correlacionadas o comorbidas porque son reflejo de un síndrome o vulnerabilidad común.

De esta forma, la implicación del 5-HTT tanto en el alcoholismo como en la depresión así como su comorbilidad genera, en base a estas cuatro explicaciones las siguientes propuestas:

- a) la depresión aumenta el riesgo de dependencia alcohol o viceversa;
- b) la depresión y el alcoholismo comparten como factor de riesgo las diferencias en la expresión genética del *5-HTT*;
- c) los factores de riesgo son distintos para ambos desordenes pero tienen en común una disparidad en la expresión del gen *5-HTT*;
- d) el alcoholismo y la depresión son reflejo de una disparidad en la expresión genética del *5-HTT*.

Paralelamente, la cuestión de la secuencia temporal entre el comienzo de la dependencia al alcohol y los desordenes afectivos ha sido documentada en algunos estudios. En uno de ellos, se definieron dos subtipos potenciales de desorden afectivo entre individuos que son alcohol-dependientes: 1) desordenes depresivos mayores independientes, que definieron como aquellos desordenes que tuvieron su inicio antes del comienzo de la dependencia al alcohol o durante un largo periodo de abstinencia al alcohol y 2) desordenes del humor inducidos por sustancias, que tuvieron un inicio después del comienzo de la dependencia al alcohol y durante periodos de consumo fuerte de alcohol (Schuckit, 2000).

El conocer el origen de la comorbilidad entre la depresión y dependencia alcohólica tiene también importantes implicaciones prácticas para el tratamiento del desorden. Por ejemplo, si la depresión es a causa de la dependencia al alcohol entonces el tratamiento efectivo hacia la dependencia podría aliviar o eliminar la depresión; inversamente, si el desorden primario es la depresión entonces su tratamiento podría reducir los síntomas de dependencia al alcohol (Lynskey, 1998).

No obstante, nada puede asegurarse incluso si la comorbilidad entre los desordenes es explicado por un factor de riesgo común o compartido, entonces el tratamiento de cada condición no necesariamente tendrá efecto sobre el otro (Lynskey, 1998).

Aunque en relativamente poco tiempo se han logrado avances significativos en la identificación de genes involucrados en el desarrollo del alcoholismo y la depresión con ayuda de estudios estadísticos y de genética molecular, es necesario continuar la identificación de características determinantes en enfermedades multifactoriales que como se sabe, son resultado de una amplia gama de complejas interacciones entre factores genéticos, ambientales, conductuales y sociales que aún permanecen sin elucidar a pesar de los enormes esfuerzos hechos durante varias décadas por la comunidad de investigadores que trabaja en temas relacionados.

## 8. CONCLUSIONES

Se encontró una disminución significativa en la expresión genética del gen *5-HTT* entre pacientes alcohólicos y pacientes alcohólicos con depresión en comparación con voluntarios sanos.

Los resultados obtenidos sugieren que existe una disfunción en la neurotransmisión serotoninérgica en pacientes alcohólicos y pacientes alcohólicos con depresión debido presuntamente a diferencias en la expresión genética del gen *5-HTT*.

La expresión genética del gen *5-HTT* es otro factor que contribuye en el origen, susceptibilidad o desarrollo de los trastornos neuropsiquiátricos como la dependencia alcohólica y la depresión.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2004) *Biología Molecular de la Célula*. 4a edición. Ediciones Omega. Barcelona. 191-299.
2. Applied Biosystems (2004) *Determinants of RNA integrity and purity*. Tech Notes Articles 11(2) [En línea] <http://www.ambion.com/techlib/tn/112/10.html> [Consulta: Abril 2009]
3. Barr CS, Newman TK, Lindell S, Shannon C, Champoux M. (2004) *Interaction between serotonin transporter gene variation and rearing condition in alcohol preference and consumption in female primates*. Arch Gen Psychiatry. 61:1146-1152.
4. Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell C. (1994) *Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters*. J exp Biol. 196:263-281.
5. Borges G, Mondragón L, Casanova L, Rojas E, Joaquín Zambrano J, Cherpitel CJ, Gutiérrez I. (2003) *Substance and alcohol use and dependence in a sample of patients from an emergency department in México city*. Salud Mental. 26: 23-31.
6. Chastain G. (2006) *Alcohol, neurotransmitter systems, and behavior*. J Gen Psychol. 133:329-35.
7. Cornelius JR, Salloum IM, Ehler JG, Jarrett PJ, Cornelius MD, Perel JM, Thase ME, Black A. (1997) *Fluoxetine in depressed alcoholics. A double-blind, placebo-controlled trial*. Arch Gen Psychiatry. 54:700-5.
8. Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT. (1994) *Expression of high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes*. Int. J. Immunopharmacol. 16:561-567.
9. Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT. (1997) *Prevalence of high serotonin uptake in lymphocytes of abstinent alcoholics*. Biochem Pharmacol. 53:53-7.
10. Fleming M, Mihic SJ, Harris RA. (2006) *Ethanol*. En: Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11ª edición. Ed. McGraw-Hill. 591-603.
11. Fozard J. (1989). *Peripheral Actions of 5-hydroxytryptamine*. Oxford University Press, New York.
12. Franks JA, Knight DL, Krishnan KRR, Slotkin TA, Nemeroff CB. (1991) *[<sup>3</sup>H]imipramine binding in platelets of never-medicated depressed patients*. Soc Neurosci Abstr. 17:576.4.

13. Genova L, Berke J, Hyman SE. (1997) *Molecular adaptations to psychoestimulants in striatal neurons: toward a pathophysiology of addiction*. Neurobiol. Dis. 4: 239-246.
14. Gibbons RD, Davis JM. (1986). *Consistent evidence for a biological subtype of depression characterized by low CSF monoamine levels*. Acta Psychiatr Scand. 74: 8-12.
15. Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. (2004) *Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 28:559-76.
16. Harwood R, Fountain D, Livermore G. (1998) *The economic costs of alcohol and drug abuse in the united states*. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism and National Institute on Drug Abuse.
17. Hasin DS, Stinson FS, Ogburn E, Grant B. (2007) *Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic survey on Alcohol and Related Conditions*. Arch Gen Psychiatry. 64(7):830-42.
18. Heinz A, Higley JD, Gorey JG, Saunders RC, Jones DW, Hommer D, Zajicek K, Suomi SJ, Lesch KP, Weinberger DR, Linnoila M. (1998) *In vivo association between alcohol intoxication, aggression, and serotonin transporter availability in nonhuman primates*. Am J Psychiatry. 155:1023-8.
19. Heinz A, Jones DW, Gorey JG, Bennet A, Suomi SJ, Weinberger DR, Higley JD. (2003) *Serotonin transporter availability correlates with alcohol intake in non-human primates*. Mol Psychiatry. 8:231-4.
20. Heinz A, Jones DW, Mazzanti C, Goldman D, Ragan P, Hommer D, Linnoila M, Weinberger DR. (2000) *A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity*. Biol Psychiatry. 47:643-9.
21. Heinz A, Mann K, Weinberger DR, Goldman D. (2001) *Serotonergic dysfunction, negative mood states, and response to alcohol*. Alcohol Clin Exp Res. 25:487-95.
22. Heinz A, Ragan P, Jones DW, Hommer D, Williams W. (1998) *Reduced central serotonin transporters in alcoholism*. Am J Psychiatry. 155:1544-1549.
23. Hinckers AS, Laucht M, Schmidt MH, Mann KF, Schumann G, Schuckit MA, Heinz A. (2006) *Low level of response to alcohol as associated with serotonin transporter genotype and high alcohol intake in adolescents*. Biol Psychiatry. 60:282-7.
24. INEGI, SSA, DGEI. (2003) *Estadísticas Vitales: Mortalidad en los Estados Unidos Mexicanos*. México.

25. Kessler RC, Aguilar-Gaxiola S, Andrade L, Bijl R, Borges G, Caraveo-Anduaga J, et al. (2001) *Mental-substance comorbidities in the ICPE surveys*. *Psiquiatria Femina*. 32(supl 2):62-79.
26. Kessler RC, Crum RM, Warner LA, Nelson CB, Schulenberg J, Anthony JC. (1997) *Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey*. *Arch Gen Psychiatry*. 54:313-24.
27. Kibbe WA. (2007) *OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator*. [En línea] <<http://www.basicnorthwestern.edu/biotools/oligocalc.html>> [Consulta: Noviembre 2008]
28. Krishnan V y Nestler EJ. (2008) *The molecular neurobiology of depression*. *Nature*. 455 (7215): 894-902.
29. Langer SZ, Galzin AM, Poirier MF, Loo H, Scheter D, Zarafian E. (1987) *Association of [<sup>3</sup>H]imipramine and [<sup>3</sup>H]paroxetine binding with the 5-HT transporter in brain and platelets: relevance to studies in depression*. *J Receptor Res*. 7:499-521.
30. Lawrence KM, Falkowaki J, Jacobson RR, Horton RW. (1993) *Platelet 5-HT uptake sites in depression: three concurrent measures using [<sup>3</sup>H]imipramine and [<sup>3</sup>H]paroxetine*. *Psychopharmacology*. 110: 235-9.
31. Lenox RH y Frazer A. (2002) *Mechanism of action of antidepressants and mood stabilizers*. In: *Neuropsychopharmacology, The Fifth Generation of Progress*. Lippincott Williams & Wilkins. New York. 1139-1163.
32. Lesch KP, Wolozin BL, Estler HC, Murphy DL, Reiderer P. (1993) *Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter*. *J Neural Transm*. 91:67-73.
33. Lesch KP. (2004) *Gene-environment interaction and the genetics of depression*. *J Psychiatry Neurosci*. 29:174-84.
34. Ley General de Salud. (1987) *Título Decimo Segundo. Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación. Capítulo III. Bebidas Alcohólicas*.
35. Lima L. (2002) *Avances en el conocimiento del transportador de serotonina. Relevancia en psiquiatría*. *Neuropsicofarmacología*. 4:23-28.
36. Lima L, Mata S, Urbina M. (2004) *ARN Mensajero y Polimorfismo del Transportador de Serotonina en Linfocitos de Pacientes con Depresión Mayor*. *Archivos venezolanos de psiquiatría y neurología*. 50:33-40.

37. Lima L, Mata S, Urbina M. (2005) *Allelic isoforms and decrease in serotonin transporter mRNA in lymphocytes of patients with major depression.* Neuroimmunomodulation. 12:299-306.
38. Lima L, and Schmeer C. (1994) *Characterization of serotonin transporter in goldfish retina by binding of [3H]paroxetine and the uptake of [3H]serotonin: Modulation by light.* J. Neurochem. 62:528–535.
39. Lima L, Urbina M. (2002) *Serotonin transporter modulation in blood lymphocytes from patients with major depression.* Cell Mol Neurobiol. 22:797-804.
40. López J, Rosovsky H. (1998) *El papel que desempeña el alcohol en los motivos por los que se les da atención en los servicios de urgencias, estimación del riesgo asociado en los traumatismos.* Salud Mental, 21(3):32-38.
41. Lynskey MT. (1998) *The comorbidity of alcohol dependence and affective disorders: treatment implications.* Drug Alcohol Depend. 52:201-9.
42. Marques FZ, Hutz MH, Bau CH. (2006) *Influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcohol-dependent individuals.* Psychiatr Genet. 16:125-31.
43. Medina-Mora ME, Natera G, Borges G, Cravioto P, Fleiz C, Tapia R. (2001) *Del siglo XX al tercer milenio. Las adicciones y la salud pública: drogas, alcohol y sociedad.* Salud Mental. 24:3-19.
44. Medina-Mora ME, Natera G, Borges G, Ortiz A, Rojas E, Leal L. (1997) *Evaluación de un Modelo de Intervención. Resultados de la Fase I.* Instituto Mexicano de Psiquiatría, Consejo Nacional Contra las Adicciones, Consejo Estatal contra las Adicciones. Reporte Interno. México.
45. Merikangas KR, Mehta RL, Molnar BE, Walters EE, Swendsen JD, Aguilar-Gaxiola SA, et al. (1998) *Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: Results of the International Consortium of Psychiatric Epidemiology.* Addict Behav. 23:893-907.
46. Mozzoni, Marco. (2007) *Il sistema serotoninergico possibile target di farmaci anti-cocaina: la ricerca NIDA* [En línea] <<http://addiction.blogosfere.it/2007/05/il-sistema-serotoninergico-possibile-target-di-farmaci-anticocaina-la-ricerca-nida.html>> [Consulta: Diciembre 2009]
47. Muñoz RF. (2005) *Conferencia magistral. La depresión y la salud de nuestros pueblos.* Salud Mental. 28:3-9.
48. Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. (2004) *Serotonin transporter gene, genetic disorders, and pharmacogenetics.* Mol Interv. 4:109-23.

49. NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2009) *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* [En línea] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> [Consulta: Enero 2009]
50. Nemeroff CB, Knight DL, Krishnan KRR. (1991) *Reduced platelet [<sup>3</sup>H]paroxetine and [<sup>3</sup>H]imipramine binding in major depression*. Soc Neurosci Abstr. 17:586.4.
51. Niemela O. (2007) *Biomarkers in alcoholism*. Clin Chim Acta. 377(1-2):39-49.
52. OMS (Organización Mundial de la Salud). (1994) *Glosario de términos de alcohol y drogas*. Madrid.
53. OPS (Organización Panamericana de la Salud). (1995) *Clasificación Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10)*. 10ª Revisión. v 3. Publicación Científica No. 554. Washington, D.C.
54. Ostacher MJ. (2007) *Comorbid alcohol and substance abuse dependence in depression: impact on the outcome of antidepressant treatment*. Psychiatr Clin North Am. 30:69-76.
55. Peña S, Baccichet E, Urbina M, Carreira I, Lima L. (2005) *Effect of mirtazapine treatment on serotonin transporter in blood peripheral lymphocytes of major depression patients*. Int Immunopharmacol. 5:1069-76.
56. Pichot P, López I, Valdez M. (1995) *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-IV*. Asociación Americana de Psiquiatría. Masson. México.
57. Raisman JS y González AM. (1998-2008) *Hipertextos del área de la biología*. [En línea] <http://www.biologia.edu.ar/adn/adntema2.htm#engancha> [Consulta: Septiembre 2010]
58. Reglamento de Tránsito Metropolitano. Gobierno del D.F. Reforma G.O.D.F. 781; 17 de Febrero de 2010.
59. Roberts J y Lundblad J. (2004) *Regulation of genes in neural tissue*. In: *From molecules to networks: an introduction to cellular and molecular neuroscience*. Ed. Elsevier Academic. Amsterdam. 371-390.
60. Roy A, De Jong J, Linnoila M. (1989) *Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients*. Arch Gen Psychiatry. 46:609-12.
61. Salcedo A. (2007) *Aspectos Genéticos relacionados con el Alcoholismo*. Típica, Boletín Electrónico de Salud Escolar. 3:1-8.

62. Sanders-Bush E, Mayer SE. (2006) *5-Hydroxytryptamine (Serotonin): receptor agonists and antagonists*. En: Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11ª edición. Ed. McGraw-Hill. 297-314.
63. Schuckit MA. (2000) *Genetics of the risk for alcoholism*. Am J Addict. 9:103-12.
64. Schuckit MA. (2005) *Alcohol-related disorders*. In: Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry. Vol I. Lippincott Williams and Wilkins. 1168-88.
65. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Dirección General de Epidemiología, Consejo Nacional contra las Adicciones (1988, 1990, 1994, 1998, 2002) *Encuesta Nacional de Adicciones, Alcohol*. Dirección General de Epidemiología. México.
66. Secretaría de Salud, Dirección General de Estadística Informática. (1970, 1998) *Tabulación sobre Defunciones*. México.
67. Sheehan DV y Lecrubier Y. (1999) *MINI (Mini International Neuropsychiatric Interview)* Version en español. 5.0.0 DSM-IV. Madrid, España. © Copyright 1992, 1994, 1998, 1999.
68. Stamova BS, Apperson M, Walker WL, Tian Y, Xu H, Zhan X, Adamczyk P, Liu DZ, Ander BP, Liao IH, Gregg JP, Turner RJ, Jickling G, Lit L, Sharp FR. (2009) *Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood*. BMC Med Genomics 2:49.
69. Solís L, Cordero M, Cordero R, Martínez M. (2007) *Caracterización del nivel de dependencia al alcohol entre habitantes de la Ciudad de México*. Salud Mental. 30:62-68.
70. Solís L, Cordero M. (1999) *El uso de servicios y las recaídas de los pacientes alcohólicos en tratamiento. Resultados de un seguimiento telefónico*. Salud Mental. 22(2):1-6.
71. Storvik M, Tiihonen J, Haukijärvi T, Tupala E. (2006) *Lower serotonin transporter binding in caudate in alcoholics*. Synapse. 59:144-51.
72. Torres G y Horowitz JM. (1999) *Drugs of abuse and brain gene expresión*. Psychosomatic Medicine. 61: 630-650.
73. Torres G y Horowitz JM. (1996) *Individual and comorbid effects of ethanol and cocaine on intracellular signals and gene expression*. Prog Neuropsy. Biol. Psy. 20: 561-596.

74. Tovar-Franco, JA. (2010) *Programa del Curso Neurobioquímica. Sistemas de neurotransmisión indolaminérgica. Serotonina (5-HT)*. [En línea] <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/programneuro.htm> [Consulta: Agosto 2010]
75. Urbina M, Pineda S, Piñango L, Carreira I, Lima L. (1999) [ $^3\text{H}$ ]Paroxetine binding to human peripheral lymphocyte membranes of patients with major depression before and after treatment with fluoxetine. *Int. J. Immunopharmacol.* 21:631-646.
76. Villinger F, Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT, Ansari AA. (1994) *Functional expression of a serotonin transporter in human peripheral lymphocytes*. *FASEB J.* 8:A108.
77. Wagner A, Montero D, Martensson B, Siwers B, Asberg M. (1990) *Effects of fluoxetine treatment of platelet [ $^3\text{H}$ ]imipramine binding, 5-HT uptake and 5-HT content in major depressive disorder*. *J Affect Dis.* 20:101-3.
78. Yang GB, Qiu CL, Aye P, Shao Y, Lackner AA. (2007) *Expression of serotonin transporters by peripheral blood mononuclear cells of rhesus monkeys (Macaca mulatta)*. *Cell Immunol.* 248:69-76.

## 10. APÉNDICES

### 10.1 Abreviaturas

5-HTT	Transportador de serotonina
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
5-HIAA	5-hidroxiindolacético
5-HTTLPR	Región regulatoria polimorfica del 5-HTT
c.b.p	Cuanto baste para
CAAF	Centro de Ayuda a Alcohólicos y Familiares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
CSF	Fluido cerebro espinal
DSM	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales
EDA	Escala de Dependencia al Alcohol
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
ICD	Clasificación Internacional de Enfermedades
ISRS	Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina
mRNA	RNA mensajero
MAO	Monoaminoxidasa
MINI	Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
SFA	Síndrome fetal alcohólico
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
TRP	Triptófano

## 10.2 Consentimiento Informado

\_\_\_\_\_  
Fecha (día/mes/año)

El participante: \_\_\_\_\_  
Con domicilio en: \_\_\_\_\_

Otorga su consentimiento para participar voluntariamente en el proyecto de investigación “*Diferencias en la expresión del gen del transportador de serotonina en dos grupos de pacientes: alcohólicos con y sin depresión*”, el cual requiere lo siguiente:

Realizar una entrevista psiquiátrica con un médico especialista y permitir la toma de una muestra sanguínea en ayunas, las cuales no tendrán ningún costo e igualmente se realizara un biometría hemática gratuita.

He recibido una explicación completa de la pQFB Denia González Cruz responsable del estudio, acerca de su naturaleza, propósito, duración y he podido preguntar mis dudas sobre todos los aspectos del estudio.

Puedo notificar de inmediato cualquier anomalía que pudiera observar y estoy informado y consciente de que puedo abandonar el estudio en cualquier momento si así lo deseo. Mis datos personales no serán divulgados y todos los datos recogidos en el estudio se mantendrán de forma confidencial.

Doy mi conformidad para que estos datos puedan examinarlos las personas responsables del estudio bajo la autoridad delegada al investigador y los representantes de las autoridades sanitarias del Instituto Nacional de Psiquiatría.

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Firma del participante