



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *NR3C1* EN PACIENTES CON
TRANSTORNO POR ESTRÉS POSTRAUMÁTICO PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE UN POSIBLE BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
CLAUDIA GONÁLEZ RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSE MARIANO GUARDADO ESTRADA**



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: | Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA |
| VOCAL: | Profesor: ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ |
| SECRETARIO: | Profesor: JOSE MARIANO GUARDADO ESTRADA |
| 1er. SUPLENTE: | Profesor: JAVIER AXOSCO MARIN |
| 2° SUPLENTE: | Profesor: LIZBETH ESMERALDA GARCIA VELAZQUEZ |

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE GENÉTICA
FORENSE, LICENCIATURA DE CIENCIA FORENSE, FACULTAD DE MEDICINA UNAM**

ASESOR DEL TEMA: DR. MARIANO GUARDADO ESTRADA

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. ALEXA VILLAVICENCIO QUELJEIRO

SUSTENTANTE: CLAUDIA GONZÁLEZ RAMÍREZ

| Índice | Página |
|---|---------------|
| I. Introducción | |
| 1.1 Trastorno por estrés postraumático (TEPT) | |
| • Generalidades del TEPT | 1 |
| • Epidemiología del TEPT en México | 5 |
| • Fisiopatología del TEPT | 5 |
| • Diagnóstico y tratamiento para el TEPT | 7 |
| 1.2 Biomarcadores diagnósticos para el TEPT | |
| • Biomarcadores para diagnosticar TEPT | 10 |
| • Expresión génica y su cuantificación por qPCR | 14 |
| • El gen de receptor de glucocorticoides (<i>N3RC1</i>) y el TEPT | 23 |
| II. Justificación | 27 |
| III. Objetivos | 28 |
| VI. Hipótesis | 29 |
| V. Materiales y métodos | 30 |
| VI. Resultados y Discusión | 38 |
| VII. Conclusiones | 57 |
| VIII. Perspectivas | 57 |
| IX. Bibliografía | 58 |

Abreviaturas

ABC: Área bajo la curva
ADN: Ácido desoxirribonucleico-2'
ARN: Ácido ribonucleico
ADNc: ADN complementario
ANXA2: Gen codificante para la Anexina 2
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
AVP: Arginina vasopresina
CLEC9A: Gen codificante para el dominio de lectina de tipo C Familia 9 Miembro A
COMT: Gen codificante para la catecol-o-metiltransferasa
CRHR1: Gen codificante para el receptor de hormona liberadora de corticotropina
C_T: Ciclo de umbral (*threshold cycle*)
DAT1: Gen codificante para el transportador de dopamina
DMS- III: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales 3ra edición (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3th edition*)
DMS-VI: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales 4ta edición (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition*)
DMS-V: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales 5ta edición (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edition*)
DRD2: Gen codificante para el receptor 2 de dopamina
FkBP5: Gen que codifica para la chaperona de hsp90
FRET: Principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (*Förster resonance energy transfer*)
GABA= Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH: Gen codificante para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC: Glucocorticoides
HACT: hormona adrenocorticotrópica
HHA: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HLC: hormona liberadora de corticotropina
HTR2A: Gen codificante para el receptor de 5-hidroxitriptamina 2A
NR3C1: Gen codificante para el receptor de glucocorticoides
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
qPCR: PCR cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*)
RG: Receptor glucocorticoide
RM: Receptor de mineralocorticoide
ROC: Curva característica Operativa del Receptor (*Receiver Operating Characteristic*)
SLC6A4: Gen codificante para la proteína transportadora de serotonina Familia 6 Miembro 4
SNV: Variante de un sólo nucleótido (*Single Nucleotide Variant*)
TEPT: Trastorno por Estrés Postraumático
TLR8: Gen codificante para el receptor *toll-like* 8
18S: Gen codificante para ARN ribosomal 18S
5-HTT: Transportador de serotonina
5-HTR2A: Gen codificante para el receptor de 5-hidroxitriptamina 2A

I. Introducción

1.1 Trastorno por estrés postraumático

Generalidades del trastorno por estrés postraumático

El trastorno por estrés postraumático (TEPT), es una patología que presentan algunas personas, después de haber vivido o presenciado, un acontecimiento estresante, ó que ponga en riesgo la vida o integridad física del individuo. La respuesta normal de cualquier individuo ante una situación de estrés implica una serie de cambios fisiológicos que preparan a la persona para afrontar dicha situación; esta respuesta de "lucha o huida" es una reacción típica que sirve para proteger a la persona de cualquier peligro. La gran mayoría de personas presentarán una serie de reacciones después del evento, como temor o pesadillas, sin embargo éstas desaparecerán gradualmente de forma natural (National Institute of Mental health, 2016). En personas que padecen síndrome por estrés postraumático las reacciones siguen en los meses posteriores al evento (National Institute of Mental health, 2016).

Un evento traumático, según el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, editado por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría en su cuarta edición, puede involucrar la amenaza de muerte o de la integridad física del individuo; así como presenciar eventos que involucren una lesión o la muerte de otra persona. Además, puede involucrar el conocimiento a través de familiares o personas cercanas a acontecimientos que atenten contra la integridad física o pongan en riesgo la vida (DSM-V).

Dicho evento traumático puede ser experimentado a través de enfrentamientos armados, robo con violencia, ataques terroristas, secuestro, tortura, los desastres naturales, violación sexual, la violencia doméstica o psicológica, el abuso emocional, e inclusive posterior al diagnóstico de una enfermedad potencialmente mortal. Otra causa que puede desencadenar el TEPT, es la exposición repetida o extrema a detalles repulsivos del evento traumático, como ocurre con profesiones tales como, rescatistas, paramédicos, policías, etc. Sin embargo, solo el 30% de los individuos que enfrentan un evento potencialmente traumático desarrollan TEPT. Por otra

parte, estudios epidemiológicos han demostrado que una gran mayoría de individuos que presentan TEPT han padecido algún otro trastorno psiquiátrico, como son: trastornos del estado de ánimo (61.5%), de ansiedad (59%), trastornos por uso de sustancias (46.4%) o tendencias suicidas(92%) (Pietrzak et al., 2011).

Los síntomas del trastorno por estrés post traumático generalmente aparecen de manera persistente a partir del primer mes después del evento traumático (*National Institute of Mental health*, 2016), tiempo en el cual permite ser distinguido del estrés agudo (DSM-V, American Psychological Association, 2014).

Los síntomas que presentan las personas con TEPT caen en cinco principales categorías.

- 1) **Síntomas de intrusión:** Recuerdos angustiosos recurrentes, involuntarios e intrusivos, sueños angustiosos recurrentes, relacionados con el evento que suscitó el trastorno (DSM-V, American Psychological Association, 2014).
- 2) **Reexperimentación:** Estos síntomas se caracterizan por una reexperimentación del suceso traumático, la cual es de forma recurrente y en casos más graves acompañado de una pérdida de la conciencia del entorno presente. Incluyen malestar psicológico intenso o prolongado al exponerse a factores internos o externos que simbolizan el suceso traumático (ruidos estridentes en el caso de personal militar). Además, se presentan reacciones fisiológicas intensas, como sudoración o palpitaciones (DSM-V, American Psychological Association, 2014).
- 3) **Evitación activa:** Evitación o esfuerzos para evitar recuerdos, pensamientos o sentimientos angustiosos, acerca de o estrechamente asociados con el suceso traumático. También se produce la evitación o esfuerzos para evitar recordatorios externos (personas, lugares, conversaciones, actividades,

objetos, situaciones) relacionados con el evento traumático (DSM-V, American Psychological Association, 2014).

- 4) **Alteraciones negativas cognitivas y del estado de ánimo:** Incapacidad de recordar un aspecto importante del suceso traumático (debido típicamente a amnesia disociativa y no a otros factores como una lesión cerebral, uso de alcohol o drogas); creencias o expectativas negativas persistentes y exageradas sobre uno mismo, los demás o el mundo; percepción distorsionada persistente de la causa o las consecuencias del suceso traumático que hace que el individuo se acuse a sí mismo o a los demás; estado emocional negativo persistente (miedo, terror, enfado, culpa o vergüenza); disminución importante del interés o la participación en actividades significativas; sentimiento de desapego o extrañamiento de los demás; así como la incapacidad persistente de experimentar emociones positivas (felicidad, satisfacción o sentimientos amorosos) (DSM-V, American Psychological Association, 2014).

- 5) **Hiperactividad o alteración importante en los estados de alerta y reactividad (*Arousal*):** Comportamiento irritable y arrebatos de furia (con poca o ninguna provocación); comportamiento imprudente o autodestructivo; hipervigilancia; respuesta de sobresalto exagerada; problemas de concentración; alteración del sueño (dificultad para conciliar o continuar el sueño, o sueño inquieto) (DSM-V, American Psychological Association, 2014).

Epidemiología del TEPT en México

Se estima que un 50 a 90% de la población mundial ha estado expuesta a algún tipo de evento traumático a lo largo de su vida, aunque no todos desarrollarán TEPT. (Robert J. Ursano, 2005). La prevalencia a lo largo de la vida del TEPT en Estados Unidos de América según la Encuesta Nacional de Comorbilidad (NCS-R), es del

7.8% (Kessler, 2005). Dicha encuesta fue realizada entre febrero del 2001 y abril del 2003, en la que se evaluó a 5,692 participantes utilizando los criterios del DSM-IV para diagnóstico de TEPT (Kessler, 2005).

En México, existen pocos estudios referentes a la prevalencia y epidemiología de TEPT. Sin embargo, existen reportes que sugieren que al menos un 68% de la población mexicana ha sido expuesta a un evento traumático a lo largo de su vida. (Medina-Mora et al., 2005). Así mismo, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica realizada en México (2003- 2016) con un total de 5,826 participantes, se ha reportado una prevalencia del TEPT de 1.45%, siendo más frecuente en mujeres (2.3%) en comparación con varones (0.49%). Además, los eventos traumáticos más frecuentes que suscitaron este trastorno en la población estudiada fueron la violación, abuso sexual, acoso y secuestro (Medina-Mora et al., 2005). Por otra parte, de acuerdo con la encuesta de Salud Mental Adolescente, la prevalencia del TEPT en población de 12 a 17 años es de 0.3% en hombres y 1.7% en mujeres (Benjet C, 2009).

Con base en la Encuesta Nacional de Victimización y Percepción Sobre la Seguridad Pública publicada en 2017 por el INEGI, 2017 fue el año más violento en nuestro país en las últimas dos décadas. Esta tendencia ha ido a la alza, si consideramos que en mayo del 2018 se registró la tasa más alta de homicidios dolosos en el país en comparación con los mismos reportes de mayo del 2017 (Víctimas de Delitos del Fuero Común, Secretaría de Gobernación de México. Mayo de 2018), por lo que el 2018 fue un año histórico en cuestiones de inseguridad. Debido a que la inseguridad que enfrenta el país continúa empeorando, y aunado al patrón de crecimiento acelerado de la ola de violencia, es factible plantear que exista un incremento de personas expuestas a sucesos traumáticos y con ello, la probabilidad de tener más casos de TEPT en nuestro país.

Fisiopatología del TEPT

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) es el coordinador neuroendocrino central del sistema de respuesta al estrés de los mamíferos, por lo cual se ha estudiado en pacientes con trastorno de estrés postraumático. Este eje está conformado por componentes endocrinos hipotalámicos, la glándula hipófisis y las glándulas suprarrenales (Sherin et al 2011).

Cuando una persona es sometida a estrés, el hipotálamo libera dos hormonas, la arginina vasopresina (AVP) y la hormona liberadora de corticotropina (HLC); que a su vez estimulan la glándula hipófisis para promover la producción y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (HACT). Esta última induce la síntesis de glucocorticoides (GCs), como el cortisol, y su liberación de las glándulas suprarrenales (Stephens et al., 2012). La HLC estimula un estado de alerta, así como el sistema hipotalámico β -endorfina, que presenta efectos analgésicos y afecta la termogénesis, al tiempo que suprime el apetito, la función reproductiva y el crecimiento. Posteriormente los glucocorticoides se unen a los receptores de glucocorticoides en las células de la hipófisis anterior, el hipotálamo y el hipocampo para regular la producción de HLC y HACT (**Fig. 1**). Este sistema se modula por señalizaciones de retroalimentación negativa, que se dan por la limitación en la duración de la exposición tisular de los glucocorticoides, minimizando así los efectos catabólicos, anti reproductivos e inmunosupresores de estas hormonas (Tsigos y Chrousos, 2002).

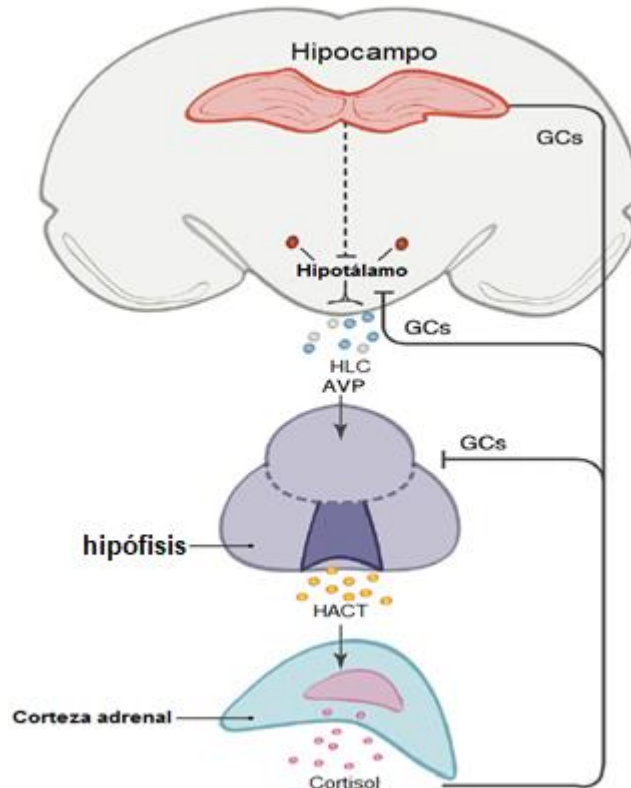


Fig 1. Mecanismo de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) por medio del estrés. Modificada de: (Argentieri et al. 2017). Al presentarse una situación estresante, se libera del hipotálamo la arginina vasopresina (AVP) y la hormona liberadora de corticotropina, que son captadas por la hipófisis y promueven la liberación de hormona adrenocorticotrófica que es captada por la corteza adrenal de las glándulas suprarrenales estimulándolas para la liberación de glucocorticoides (GCs) como el cortisol.

Respecto a la fisiopatología del TEPT, se ha reportado que el eje hipotálamo-hipófisis (HHA) se encuentra alterado en estos pacientes incapacitándolos para responder de forma normal a los factores estresantes. Sin embargo, los resultados no han sido del todo concluyentes debido a que algunos estudios sugieren una hiperactividad del eje HHA en esta enfermedad, mientras que otros encuentran lo opuesto (Bremner et al 1997; Baker et al .1999; Yehuda et al., 2000; Cohen et al 2009).

Diagnóstico y tratamientos para el TEPT

El término de trastorno por estrés postraumático se publicó por primera vez en la tercera versión del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría en 1980 (DMS-III). Desde entonces, el diagnóstico de este trastorno ha sido un campo constante en las dos versiones subsecuentes de este manual. La mayoría de los estudios publicados, cuenta con individuos que han sido diagnosticados siguiendo los parámetros de la cuarta versión del manual (DMS-IV), sin embargo, en la actualidad el diagnóstico de este trastorno se realiza por medio de los criterios de la versión más actual de esta guía, el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales- publicado en 2013; que cuenta con algunas modificaciones frente a la versión anterior, los cuales se muestran en la tabla 1.

Sin embargo, por la heterogeneidad de los síntomas que presenta esta enfermedad, el diagnóstico se dificulta en ocasiones (Brewlin et al., 2017). Además, la complejidad del trastorno se incrementa por el tipo de trauma y la comorbilidad asociada al individuo, debido a que el TEPT se encuentra asociado con otros trastornos psiquiátricos como son trastornos depresivos, de ansiedad y de abuso de sustancias. (Roberts, et al 2015).

Las pautas de tratamiento del TEPT suelen incluir tanto orientación psicológica, como tratamientos farmacológicos. A pesar que de no existe un enfoque definido sobre cómo tratar el TEPT, la Guía práctica para el tratamiento de pacientes con trastorno por estrés agudo y trastorno por estrés postraumático de la Asociación Americana de Psiquiatría, recomienda el uso de la terapia psicológica basada en el trauma como primera línea del tratamiento, seguido del uso de medicamentos como un tratamiento complementario o de próxima línea. De igual forma las consideraciones prácticas de cada paciente pueden influir en tratamiento seleccionado; por ejemplo las posibilidades de la organización que diagnostique al paciente de brindarle atención psicológica o los medicamentos disponibles; así como

la existencia de patología coexistentes al TEPT como depresión, ansiedad, dolor agudo, o abuso de alcohol, que pueden influenciar en el tipo de tratamiento seleccionado (Pietrzak, et al., 2011).

Las terapias psicológicas para el tratamiento del TEPT tienen como objetivo minimizar los síntomas de intrusión, evitación e hiperactividad del TEPT, mediante la combinación de aprendizaje y acondicionamiento para cambiar los patrones de pensamiento, además de la reexperimentación de memorias y emociones relacionadas al trauma para dar paso a una desensibilización y a un mejor manejo de los factores estresantes relacionadas al trauma. Entre estas terapias se encuentran la terapia cognitivo-conductual, terapias de manejo de habilidades, terapia basada en la exposición y otras formas de terapias individuales y grupales (Hoffman, et al., 2018).

Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina son los medicamentos que han mostrado mayor efectividad, reduciendo los síntomas de TEPT en un 60% de los pacientes (Secretaría de Salud, México. 2011). Así mismo, según la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), ha aprobado solo paroxetina y sertralina para el tratamiento de pacientes con TEPT (Hoffman et al 2018). Sin embargo, también se han usado otros medicamentos inhibidores de la recaptura de serotonina y norepinefrina; antidepresivos tricíclicos; otros antidepresivos de segunda generación; antipsicóticos atípicos; anticonvulsivos y estabilizadores del humor; agentes adrenérgicos; benzodiazepinas; y otros agentes farmacológicos tales como naltrexona, cicloserina e inositol (Hoffman et al 2018).

Tabla 1. Comparación de los criterios diagnósticos del Trastorno por Estrés Postraumático en diferentes versiones del DSM

| DSM-III(1980) | DSM-IV(1994) | DSM-V(2013) |
|---|---|--|
| <p>A. Existencia de un estrés reconocible, capaz de provocar síntomas significativos de malestar en todas las personas.</p> | <p>A. La persona ha estado expuesta a un acontecimiento traumático en el que han existido (1) y (2): 1. Experimentar, presenciar u oír uno o más acontecimientos caracterizados por muertes o amenazas para su integridad física o de los demás. 2. La persona ha respondido con temor, desesperanza u horror intensos</p> | <p>A: La persona fue expuesta directa o indirectamente a un evento traumático, así como aprendido u oído de él, o exposición indirecta repetida / extrema en el curso de trabajo profesional.</p> |
| <p>B. El reexperimentar el trauma se pone de manifiesto por al menos uno de los siguientes síntomas: 1. Recuerdos recurrentes e invasores del acontecimiento 2. Sueños recurrentes del acontecimiento. 3. Comportamiento o sentimiento repentino, como si el acontecimiento traumático estuviera presente debido a una asociación con un estímulo ambiental o ideacional</p> | <p>B. Durante o después del acontecimiento traumático el individuo presenta tres o más de los siguientes síntomas disociativos: 1. Ausencia de reactividad emocional 2. Reducción del conocimiento de su entorno 3. Desrealización 4. Despersonalización 5. Amnesia disociativa</p> | <p>B: La persona presenta al menos uno de los siguientes síntomas de intrusión: 1. Recuerdos intrusivos recurrentes. 2. Pesadillas traumáticas. 3. Flashbacks 4. Angustia intensa / prolongada después de la exposición 5. Reactividad fisiológica tras la exposición a las señales.</p> |
| <p>C. Disminución de la capacidad de respuesta e integración ante el medio externo, que empieza en algún momento después del trauma, tal como se demuestra por al menos uno de los siguientes síntomas: 1. Disminución marcada del interés en una o más actividades significativas 2. Sentimientos de separación o de extrañeza frente a los demás 3. Constricción del afecto</p> | <p>C. El acontecimiento traumático es reexperimentado persistentemente en al menos una de estas formas: imágenes, pensamientos, sueños, ilusiones, episodios o flashbacks recurrentes o sensaciones de estar reviviendo la experiencia y molestar al exponerse a objetos o situaciones que recuerden el acontecimiento traumático</p> | <p>C: La persona evita con esfuerzo persistente al menos alguno de los siguientes estímulos angustiosos relacionados con el trauma: 1. Pensamientos o sentimientos 2. Recordatorios externos</p> |
| | <p>D. Evitación marcada de estímulos que recuerdan el trauma</p> | <p>D: La persona experimenta alteraciones negativas en la cognición y en el estado de ánimo: Incapacidad para recordar características clave del trauma: 1. Creencias negativas sobre uno mismo y/o el mundo. 2. Culpa distorsionada de sí mismo u otros 3. Emociones negativas persistentes relacionadas con el trauma. 4. Interés disminuido 5. Sentirse alienado, desapego / alejamiento. 6. Afecto constreñido</p> |
| | <p>E. Síntomas marcados de ansiedad o aumento del alerta</p> | <p>E: La persona experimenta al menos dos alteraciones en la excitación y reactividad: 1. Comportamiento irritable o agresivo. 2. Comportamiento autodestructivo o imprudente 3. Hipervigilancia 4. Respuesta exagerada de sobresalto. 5. Problemas en la concentración. 6. Alteración del sueño</p> |
| <p>F. Las alteraciones provocan malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo, o interfieren de forma notable con su capacidad para llevar a cabo tareas indispensables.</p> | <p>F. Las alteraciones provocan malestar clínicamente significativo o deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo, o interfieren de forma notable con su capacidad para llevar a cabo tareas indispensables.</p> | <p>F. La persona experimenta estas perturbaciones por más de un mes</p> |
| <p>G. Las alteraciones duran un mínimo de dos días y un máximo de cuatro semanas y aparecen en el primer mes que sigue al acontecimiento traumático</p> | <p>G. Las alteraciones duran un mínimo de dos días y un máximo de cuatro semanas y aparecen en el primer mes que sigue al acontecimiento traumático</p> | <p>G. La persona experimenta malestar clínicamente significativo o discapacidad que prevalecen más de un mes.</p> |
| <p>H. Las alteraciones no se deben a los efectos fisiológicos directos de una sustancia o enfermedad.</p> | <p>H. Las alteraciones no se deben a los efectos fisiológicos directos de una sustancia o enfermedad.</p> | <p>H. Los síntomas no se deben a la medicación, sustancia, u otra enfermedad</p> |

1.2 Biomarcadores diagnósticos para el TEPT

Biomarcadores para diagnosticar TEPT

Un biomarcador se define como un proceso, sustancia o estructura biológica que se puede medir en el cuerpo o sus productos para analizar el riesgo de desarrollar una determinada enfermedad, diagnosticarla, evaluar su progreso y pronóstico, así como su respuesta al tratamiento (Schmidt, et al 2013). Por otra parte los biomarcadores moleculares se definen como el subconjunto de los marcadores biológicos medibles o detectables en función de sus características moleculares, así como cualquier versión modificada de estos analitos, que pueden estudiarse utilizando tecnologías genómicas o proteómicas, estos pueden ser clasificados en biomarcadores de: ADN, ARN, proteínas y metabolitos (Laterza, et al 2007). Sin embargo, cabe mencionar que a pesar de que estas moléculas se encuentran diferenciadas entre individuos sanos y los que padecen alguna patología o están en riesgo a padecerla, no significa que los cambios sean reflejados en algún otro nivel del organismo; es decir, puede existir un cambio a nivel ADN, ARN, proteína o en los metabolitos, que no represente un cambio en el fenotipo, un cambio en la expresión de un gen (concentración de ARNm) no necesariamente impacta en la cantidad de proteínas, o la cantidad de proteínas no siempre significa que todas ellas sean funcionales. En el presente trabajo sólo se estudia el cambio en la concentración de transcrito de ARN mensajero, sin embargo el TEPT al ser una patología tan compleja podría tener otras alteraciones a nivel molecular.

Un gran número de autores han propuesto el análisis diferencial de la concentración de transcritos de ARN mensajero (ARNm) de genes de interés relacionados con ciertas patologías. De tal forma que la concentración de ARNm, es decir, la expresión génica, indique el estatus de un organismo o tejido, como se distingue cuando se utiliza un marcador bioquímico (Sunde, 2010). De hecho algunos autores sugieren que la información genética y genómica permitirá un diagnóstico más temprano y más preciso de la enfermedad y su progresión; del mismo modo que actualmente se

están identificando factores de riesgo genéticos comunes para una gran variedad de enfermedades, como cáncer y diabetes (Bell, 2004). El análisis de los ARNm, ha sido posible gracias al desarrollo de diversas tecnologías, desde el descubrimiento de la transcriptasa reversa y la polimerasa de ADN termoestable, el desarrollo y optimización de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, las tecnologías de microarreglos y la secuenciación de ARN (ARNseq); en conjunto con la bioinformática han proporcionado colectivamente la capacidad de evaluar los niveles relativos de transcritos de genes, permitiendo el uso de éstos en la medicina (Sunde, 2010).

A diferencia de otras enfermedades tales como la diabetes, el cáncer o la hepatitis actualmente no existen estudios de gabinete que puedan utilizarse para diagnosticar el TEPT. Diversos estudios se han enfocado en la búsqueda de biomarcadores para diagnóstico, con la finalidad de detectar el TEPT por medio de parámetros cuantificables partiendo de muestras biológicas, pruebas genéticas, estudios de imagen cerebral o su combinación (Bandelow, et al., 2016).

En el caso del TEPT, se han propuesto una gran variedad de biomarcadores (**Tabla 2**), uno de los más importantes es el nivel de cortisol sérico, ya que se ha reportado que este se encuentra disminuido en pacientes con TEPT (Gill et al., 2008); sin embargo los resultados no han sido concluyentes debido que en otros estudios los niveles de cortisol en pacientes con TEPT no eran diferentes de manera significativa de aquellas personas que no sufrieron TEPT, por otra parte existe evidencia de que los bajos niveles de cortisol en pacientes con TEPT pudiera estar relacionada con la sensibilidad incrementada que existe en la retroalimentación negativa en los tejidos sensibles a cortisol (MacMillan,, et al 2009).

A pesar de todas las investigaciones que se han llevado a cabo, la falta de resultados concluyentes no han permitido establecer un biomarcador que sea capaz de diagnosticar el TEPT, por lo cual es necesario seguir las diferentes líneas de

investigación para desarrollar nuevos biomarcadores diagnósticos para esta enfermedad.

Tabla 2. Biomarcadores propuestos para el diagnóstico del TEPT

| Tipo de Estudio | Característica observada. | Referencia |
|--|---|---|
| Estudios de imagen de resonancia magnética estructural | <ul style="list-style-type: none"> • Disminución en la materia gris (Frontal, temporal y límbica) • Alteraciones en el volumen de materia blanca (Prefrontal, temporal, límbica, parietal, capsula interna, Fascículo longitudinal superior) | <ul style="list-style-type: none"> • Karl et al. 2006; Levy-Gigi et al. 2013; Morey et al. 2012 • Bremner 2001; Kroes et al. 2011, |
| Imagen de resonancia magnética funcional | <ul style="list-style-type: none"> • Activación de lóbulo frontal (Corteza <i>ventromedial</i>) • Disminución de actividad en córtex del cíngulo anterior | <ul style="list-style-type: none"> • Etkin and Wager 2007 • van Rooij et al. 2015a |
| Biomarcadores séricos | <ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en los niveles de 5-HTT (↓Amígdala, ↑corteza cingulada posterior) • Aumento a nivel receptor de 5-HT1A • Disminución a nivel receptor de 5-HT1B • Disminución Cortisol | <ul style="list-style-type: none"> • Murrough et al. 2011; Sullivan et al. 2013; Frick et al. 2016 • Sullivan et al. 2013 • Murrough et al. 2011 • Gill et al., 2008 |
| Genéticos | <ul style="list-style-type: none"> • Los estudios de asociación de genes candidatos para el TEPT, han sugerido que alteraciones en vías relacionadas con sistemas de neurotransmisores podrían conferir susceptibilidad para TEPT -Sistema de serotonina (polimorfismos en la región promotora <i>SLC6A4</i>, <i>5-HTTLPR</i>, y <i>5-HTT2A</i>) -Eje HHA (gen <i>FKBP5</i>, <i>CRHR1</i>) -Sistema dopaminérgico (genes <i>COMT</i>, <i>DRD2</i>, <i>DAT1</i>) -Sistema endocannabinoide (gen del receptor canabinoide 1) -Sistema GABA (Gen de la subunidad 2α del receptor GABA) | <ul style="list-style-type: none"> • Koenen et al. (2013) • Kang et al. 2018; Pape et al. 2018 • Pietrzak et al. 2015 • Lanius et al 2018 • Sheth et al 2018 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Niveles globales de metilación aumentada, sitios CpG en cinco genes relacionados con el sistema inmune (<i>CLEC9A1</i>, <i>APC51</i>, y <i>TLR81</i>) se encuentran metilados diferencialmente. • Algunos polimorfismos de un solo nucleótido han sido encontrados como locus que confieren susceptibilidad de contraer TEPT. | <ul style="list-style-type: none"> • Smith et al 2011; |
| | <ul style="list-style-type: none"> - SNP (rs8042149) en el receptor huérfano relacionado con retinoides - SNPs asociados con TEPT en diferentes cohortes raciales: afroamericanos (rs10768747, rs17504106, rs73419609, rs2862383, rs834811), caucásicos no hispanos (rs7866350, rs1116255, rs2437772,rs61793204) - SNP (rs6482463) en el gen <i>PRTFDC1</i> fosforribosil transferasa que contiene el dominio 1. | <ul style="list-style-type: none"> • Logue et al. 2013; White et al. 2013; Xie et al. 201; (Ashley-Koch et al. 2015 |

Expresión génica y su cuantificación por qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (*polymerase chain reaction*) es una técnica utilizada en biología molecular que fue desarrollada en 1983 por Kary Mullis, basándose en la replicación del ADN en los organismos, realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. La PCR es un ensayo que permite la amplificación de un fragmento específico de ADN por lo que únicamente se necesitan pequeñas cantidades de ADN para obtener suficientes copias para ser analizadas (Garibyan, 2013).

Para realizar una PCR se requiere de ADN molde o templado, oligonucleótidos o cebadores, polimerasa termorresistente de ADN y nucleótidos trifosfatados. La técnica se lleva a cabo en un termociclador, un aparato que eleva y baja la temperatura en pasos discretos, precisos y pre-programados. Inicialmente, la temperatura se eleva a 95-97°C, esto se realiza para separar la doble cadena de ADN, esto se conoce típicamente como desnaturalización. Posteriormente la temperatura desciende para permitir que los oligonucleótidos o cebadores, que son secuencias complementarias específicas para el fragmento de interés, se unan al segmento, en un proceso conocido como hibridación. Después la temperatura aumenta nuevamente, comúnmente a 72°C, momento en el que la polimerasa de ADN puede extender la cadena a partir de los oligonucleótidos agregando nucleótidos a la cadena de ADN en desarrollo, este paso es conocido como extensión (**Fig. 2**). Estos tres pasos son repetidos de manera cíclica y permiten que el número de copias de este fragmento aumente de manera exponencial en cada ciclo (Garibyan et al., 2013). Posteriormente los fragmentos de ADN amplificados son analizados por su tamaño utilizando electroforesis en geles de agarosa.

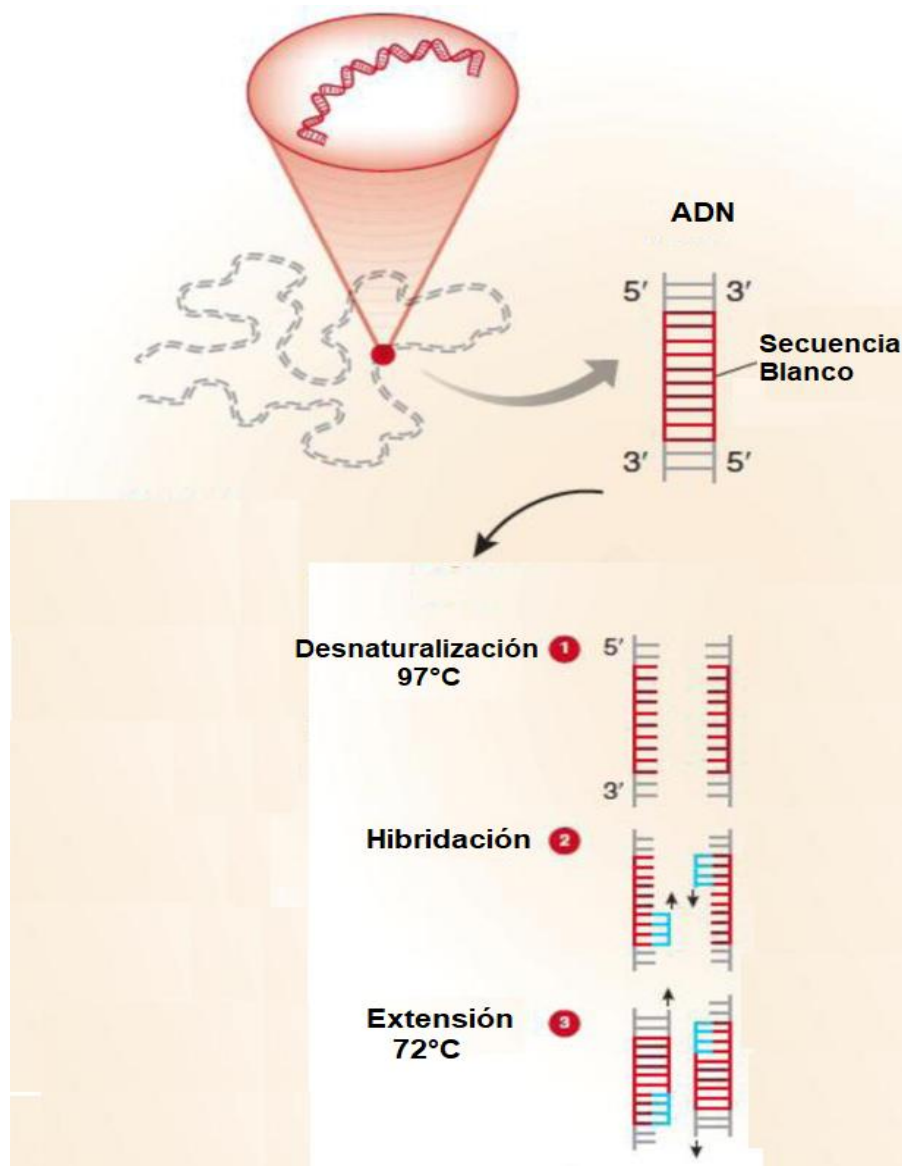


Fig 2. Representación esquemática de la PCR. Modificada de: (Garibyan, 2013). 1. Desnaturalización: La temperatura aumenta hasta 97°C para separar las dos cadenas de DNA. 2. Hibridación: La temperatura desciende para permitir que los oligonucleótidos o cebadores se unan a las regiones de interés. 3. La temperatura aumenta nuevamente hasta 72°C para permitir que la Taq Polimerasa realice la extensión del ADN, obteniéndose así copias de la secuencia de interés.

Una técnica derivada de la PCR en punto final es la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), que se desarrolló originalmente para resolver la limitante de la cuantificación exacta del material genético. La qPCR está basada en el mismo principio que la PCR de punto final (desnaturalización, alineación y extensión), con

la característica de emplear fluorescencia por medio de sondas o colorantes que se adicionan a la reacción. Esta fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto formado en cada ciclo de amplificación de la reacción, lo cual permite calcular el número de moléculas de ADN de la secuencia de interés (Kubista et al., 2006).

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas (fluoróforos) son excitadas por la absorción de radiación electromagnética, este proceso es el resultado de tres etapas 1) Excitación: en la cual un fotón de energía es suministrado por una fuente externa (ej. Lámparas o láseres) y es absorbido por la molécula, la cual crea un estado singulete electrónico excitado. 2) Estado excitado: Este estado existe por un tiempo finito, en el cual la molécula experimenta cambios conformacionales. La energía del estado singulete excitado se disipa parcialmente y se produce un singulete relajado a partir del cual se origina la emisión de fluorescencia. 3) Emisión de la fluorescencia: Se emite un fotón que devuelve el fluoróforo a su estado fundamental. Debido a la disipación de energía durante el estado excitado, la energía de este fotón es más baja y, por lo tanto, tiene una longitud de onda más larga que la del fotón de excitación. Esta diferencia en energía o longitud de onda se denomina cambio de *Stokes*. El cambio de *Stokes* es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia porque permite detectar los fotones de emisión contra un fondo bajo, aislado de los fotones de excitación (Godbey, 2014).

Para detectar la fluorescencia se necesitan instrumentos especiales, que a su vez necesitan tres elementos necesarios para considerarse sistemas de detección: 1) Fuente de luz. 2) filtros de longitud de onda, para aislar fotones de emisión de los fotones de excitación. 3) detector para registrar fotones de emisión y producir una señal de salida (Gell et al., 2006)

Los datos proporcionados por los equipos de qPCR están generalmente basados en gráficas de amplificación donde se grafica en el eje X los ciclos del experimento, mientras que en el eje Y se observa el cambio de fluorescencia (ΔR_n). La cinética

de amplificación representada en este tipo de gráficos puede dividirse en 3 fases (Fig. 3):

- Fase geométrica: Todos los reactivos se encuentran en exceso por lo que la eficiencia de amplificación es cercana al 100% y la cinética de amplificación tiene un comportamiento que puede estar representado como 2^n , en donde n es el número de ciclos . Es en esta fase, se lleva a cabo la cuantificación del ADN amplificado.
- Fase exponencial o lineal: Los componentes (dNTPs, oligonucleótidos, buffer, Mg^{2+} , TaqPolimerasa) de la reacción comienzan a ser factores limitantes en el proceso de amplificación, se generan pirofosfatos y la actividad enzimática de la polimerasa comienza a decrecer.
- Fase Estacionaria: Se detiene la amplificación por lo que la cantidad de ADN se mantiene constante hasta el último ciclo programado en el equipo.

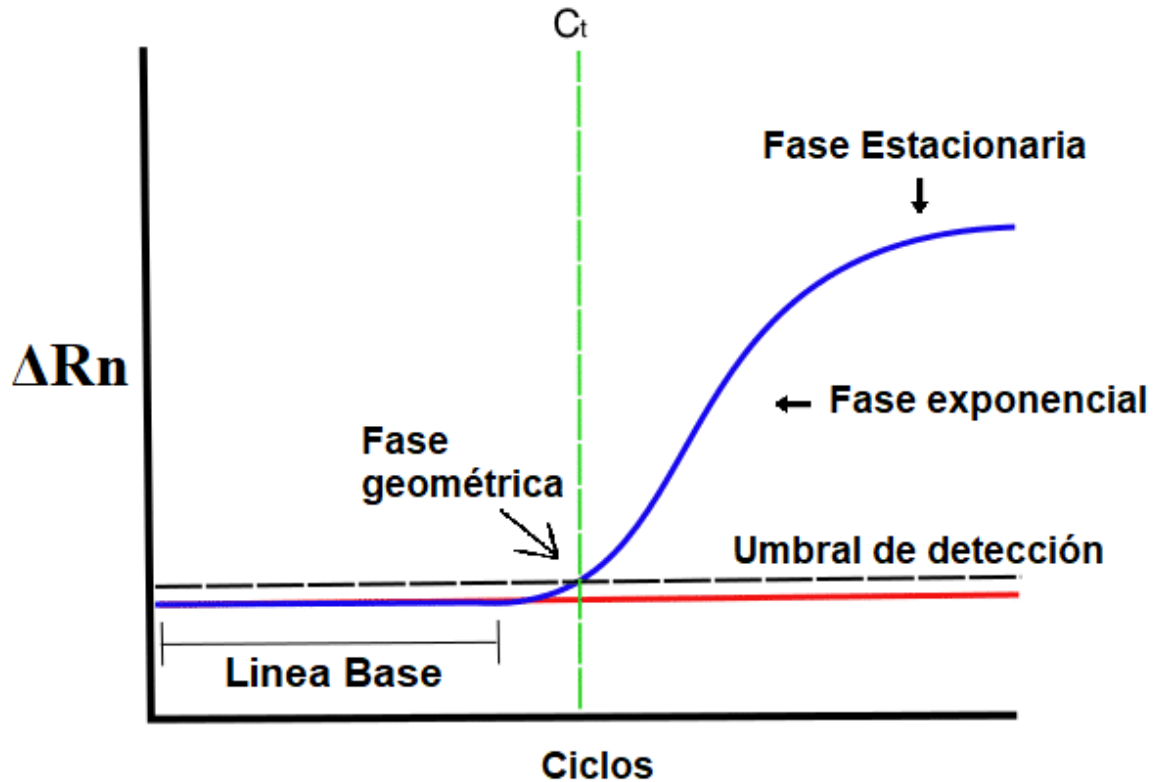


Fig. 3 Fases en una curva de amplificación de qPCR. Modificada de: (Huggett et al., 2014). La primera fase de amplificación es la fase geométrica, al cruzar el umbral de detección se determina el C_T , posteriormente se da la fase exponencial y finalmente la fase estacionaria la fluorescencia no cambia y la amplificación se detiene.

Para realizar los ensayos de cuantificación se define en los equipos de qPCR un umbral de detección (*threshold*), en el que las muestras pueden ser comparadas entre sí. Este umbral se establece basándose en el ruido de fondo para diferenciarlo de la fluorescencia que emiten las muestras, tomándose en cuenta las variaciones de fluorescencia de la línea base en los primeros 10- 15 ciclos donde los cambios en la señal son mínimos. Finalmente, el C_T (Ciclo de *threshold*, o Ciclo de umbral) es aquel ciclo donde la muestra genera suficiente fluorescencia para llegar al umbral de detección; de forma tal que el C_T es inversamente proporcional a la cantidad inicial de templado y es el fundamento de la qPCR para calcular la cantidad de ARN mensajero (ARNm) o de ADN (Wong, et al., 2005).

En un inicio, en el desarrollo de qPCR se utilizó como primer sistema de detección el bromuro de etidio (Higuchi et al., 1992), aunque después se descartó por su baja

sensibilidad, la falta de especificidad y la toxicidad que implica trabajar con este compuesto. Actualmente los agentes reporteros más comunes en los ensayos de qPCR son intercalantes químicos de ADN y sondas marcadas con fluorescencia (Kubista et al., 2006).

Los intercalantes de ADN más utilizados son las cianinas asimétricas, que contienen dos sistemas aromáticos, uno de los cuales está cargado positivamente. Estos colorantes no emiten fluorescencia cuando están libres en solución, debido a que las vibraciones que afectan a ambos sistemas aromáticos convierten la energía de excitación electrónica en calor que se disipa en el disolvente circundante. Sin embargo, este compuesto emite fluorescencia cuando se une al surco menor del ADN de doble cadena (Nygren et al., 1998). Los intercalantes de ADN más utilizados en la qPCR son SYBR Green y BEBO, estos sistemas de detección son considerados como reporteros no específicos, debido a que emiten fluorescencia en presencia de cualquier ADN de doble cadena, inclusive en la presencia de dímeros de oligonucleótidos. Para utilizar esta clase de sistemas de detección se requiere del empleo de buenas prácticas de laboratorio y la validación por medio de un ensayo de disociación.

Las sondas marcadas son secuencias específicas de ADN, complementarias a una región particular del ADN de interés. Se basan en ácidos nucleicos o en algunos de sus análogos sintéticos, como los ácidos nucleicos peptídicos (Egholm et al., 1992) y los ácidos nucleicos bloqueados (Costa et al., 2004). Los marcajes de estas sondas pueden ser de dos tipos: (i) fluoróforos con fluorescencia intrínseca, tales como los derivados de la fluoresceína y la rodamina (Sjöback et al., 1995), que a través del diseño estructural están en contacto con una molécula inhibidora; (ii) fluoróforos que cambian sus propiedades de fluorescencia cuando se unen a ácidos nucleicos (Kubista et al., 2006).

Existen sondas compuestas de dos moléculas: un fluoróforo y un apagador. De este tipo de sondas, las que son comúnmente utilizadas son las sondas de hidrólisis,

conocidas popularmente como sondas Taqman™ (Holland et al., 1991). Esta clase de sonda utiliza el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET por sus siglas en inglés), donde las moléculas forman un par donante-aceptor, en el cual existe una transferencia de energía de un donador o reportero fluorescente a un aceptor o un apagador. En las sondas de hidrólisis, cuando se encuentran libres en solución, las dos moléculas se encuentran unidas estrechamente, y la transferencia de energía es dependiente de la distancia. Una vez que la sonda se une a la secuencia, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el apagador, lo que permite que la polimerasa por medio de su actividad endonucleasa 5'-3' rompa la unión entre las dos moléculas, ocasionando que la fluorescencia emitida por el reportero deje de ser absorbida por el apagador y pueda ser detectada por el equipo (Kubista et al., 2006). **(Figura. 4)**

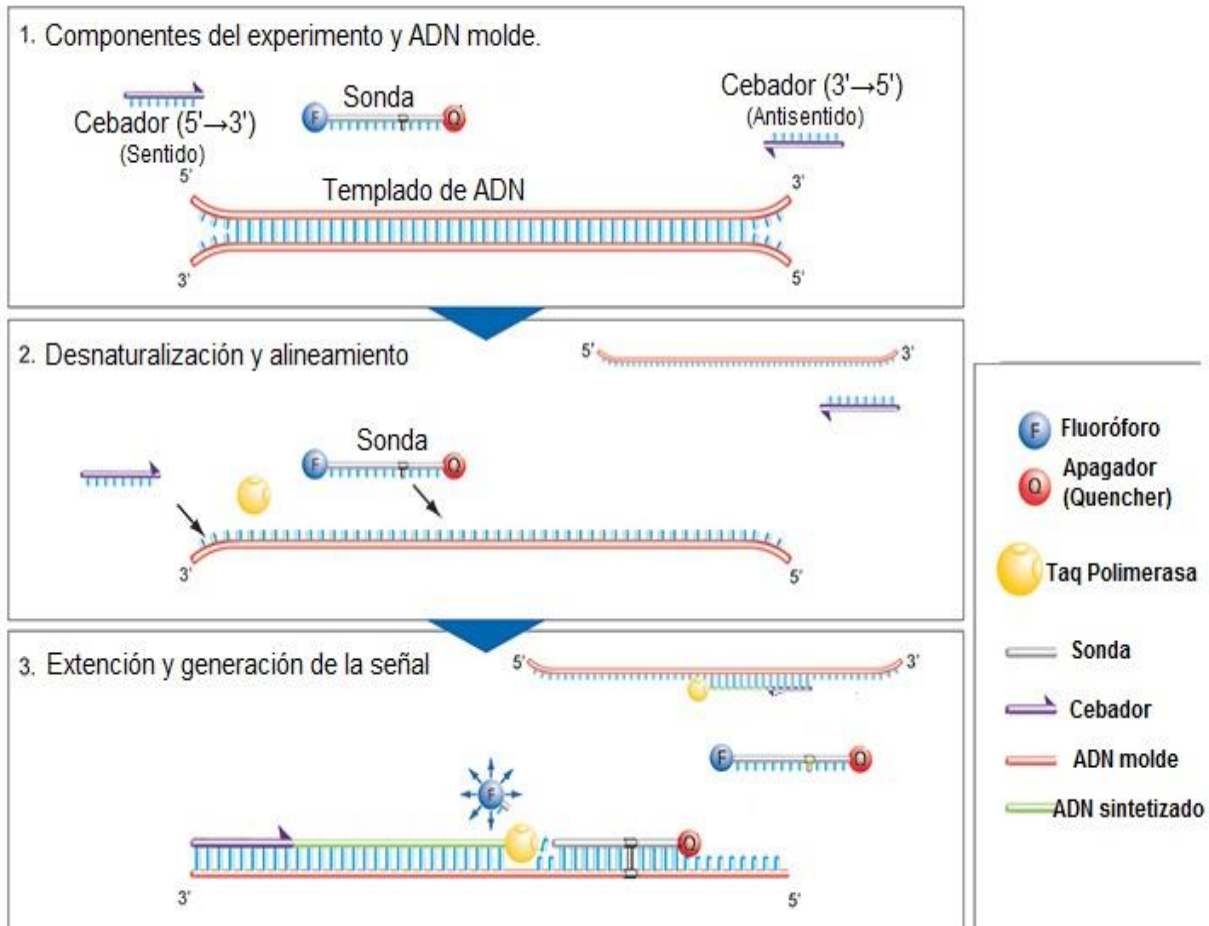


Fig. 4 Mecanismo de una sonda TaqMan. (Modificada de ThermoFisher: How TaqMan Assays Work? Disponible: <https://www.thermofisher.com/>). 1) La sonda no emite fluorescencia por la transferencia de energía entre el fluoróforo y el apagador, dado que se encuentran muy cerca. 2) la sonda se une a la secuencia de interés por complementariedad entre bases en la etapa del alineamiento 3) gracias a la acción de exonucleasa de la Taq polimerasa en la extensión, la sonda es degradada y el fluoróforo y el apagador son liberados y se alejan, haciendo imposible la transferencia de energía y permitiendo así que el fluoróforo emita fluorescencia.

La cuantificación de la expresión de un gen a través de la qPCR primero requiere de la síntesis de ADN complementario (ADNc) empleando la enzima retrotranscriptasa a partir del ARN total extraído de las células o tejido que se busca analizar. Este paso es crucial, debido a que, a diferencia de la ARN polimerasa, la ADN polimerasa necesita cebadores y es dependiente de ADN. La cuantificación del gen se puede llevar a cabo en forma absoluta y relativa. La cuantificación absoluta, calcula el número de copias del transcrito del gen explorado, al realizar una curva estándar e

interpolando la concentración inicial del templado con dicha curva. A diferencia de la cuantificación absoluta, en la cuantificación relativa expresión de un gen o la fase C_T de la curva de amplificación es comparada entre dos o más grupos experimentales. Aunque ambos métodos de cuantificación son empleados para cuantificar expresión génica, el método más utilizado es la cuantificación relativa. (Kubista et al., 2006).

En la cuantificación relativa, al comparar muestras biológicas, se requiere una normalización previa, debido a la gran heterogeneidad que existe entre ellas. Para llevar a cabo la normalización se emplea un gen de referencia interno o normalizador. Los genes normalizadores son genes que se expresan de forma constitutiva, es decir, son genes cuya expresión se mantiene homogénea o sin cambios en todos los tejidos. Los genes normalizadores comúnmente empleados son el ARN ribosomal 18S, la β -actina, la *GAPDH*, entre otros (Bas, et al. 2004).

Para efectuar un análisis de cuantificación relativa es posible utilizar métodos diferentes:

-Curva de calibración estándar: Se realiza una curva estándar con muestras de concentraciones conocidas y las muestras se interpolan en la muestra para determinar la concentración, se normalizan con un control endógeno y se comparan con un calibrador, ya sea una muestra o tratamiento, el calibrador puede tratarse de un grupo control o de un determinado tratamiento farmacológico. Este método difiere de la cuantificación absoluta, ya que en esta sólo se obtiene cantidad exacta de material genético y no se realiza comparación alguna con ningún calibrador.

-Método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$): Es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica, al obtener la diferencia relativa entre la muestra problema y la del calibrador o muestra control. Para este método, es necesario realizar un ensayo de validación, ya que las cinéticas de amplificación de la muestra y el calibrador deben ser similares. Aunque este método realiza una corrección en las eficiencias de amplificación no lineales, podrían existir errores en el modelo matemático cuando

las cinéticas de amplificación son diferentes entre el gen de interés y el gen normalizador. La validación se realiza por medio de una curva de eficiencias relativas, en la cual se realizan dos curvas de diluciones seriadas del gen de interés y del gen normalizador. Posteriormente, la curva de eficiencias relativas se construye graficando en el eje de las X el log de la concentración del ADN complementario [ADNc], es decir las diluciones para definir los límites inferiores de amplificación del ensayo de qPCR, y en eje Y, el valor de $\Delta C_T(C_{T(\text{Gen blanco})} - C_{T(\text{Gen normalizador})})$ para cada punto de las diluciones. Posteriormente, con los datos obtenidos, se calcula una regresión lineal, si el valor de la pendiente (m) está entre -0.1 y 0.1, se puede decir que la eficiencia en la amplificación es adecuada. Este método de cuantificación relativa es ampliamente usado para el análisis de la expresión génica, debido a que no requiere de una curva estándar, por lo cual es útil cuando se estudian muchas muestras. Sin embargo, es importante realizar la validación previa para asegurar datos confiables y reproducibles (Wong, et al., 2005).

El gen de receptor de glucocorticoides (*N3RC1*) y el TEPT.

Existen dos tipos de receptores de cortisol: el receptor de mineralocorticoide (RM) y el receptor glucocorticoide (RG). Por lo regular, el cortisol generalmente tiene mayor afinidad por los receptores mineralocorticoides, debido a que existe una diferencia en la afinidad de unión de los corticoesteroides al receptor (Herman et al., 2016). Los RM ayudan a mantener los niveles normales de cortisol que circula en la sangre durante el ritmo circadiano. Por el contrario, los RG presentan mayor afinidad al cortisol cuando la concentración de cortisol es alta, como en una situación de estrés, y esta unión termina cuando el factor estresante cesa (Herman et al., 2016).

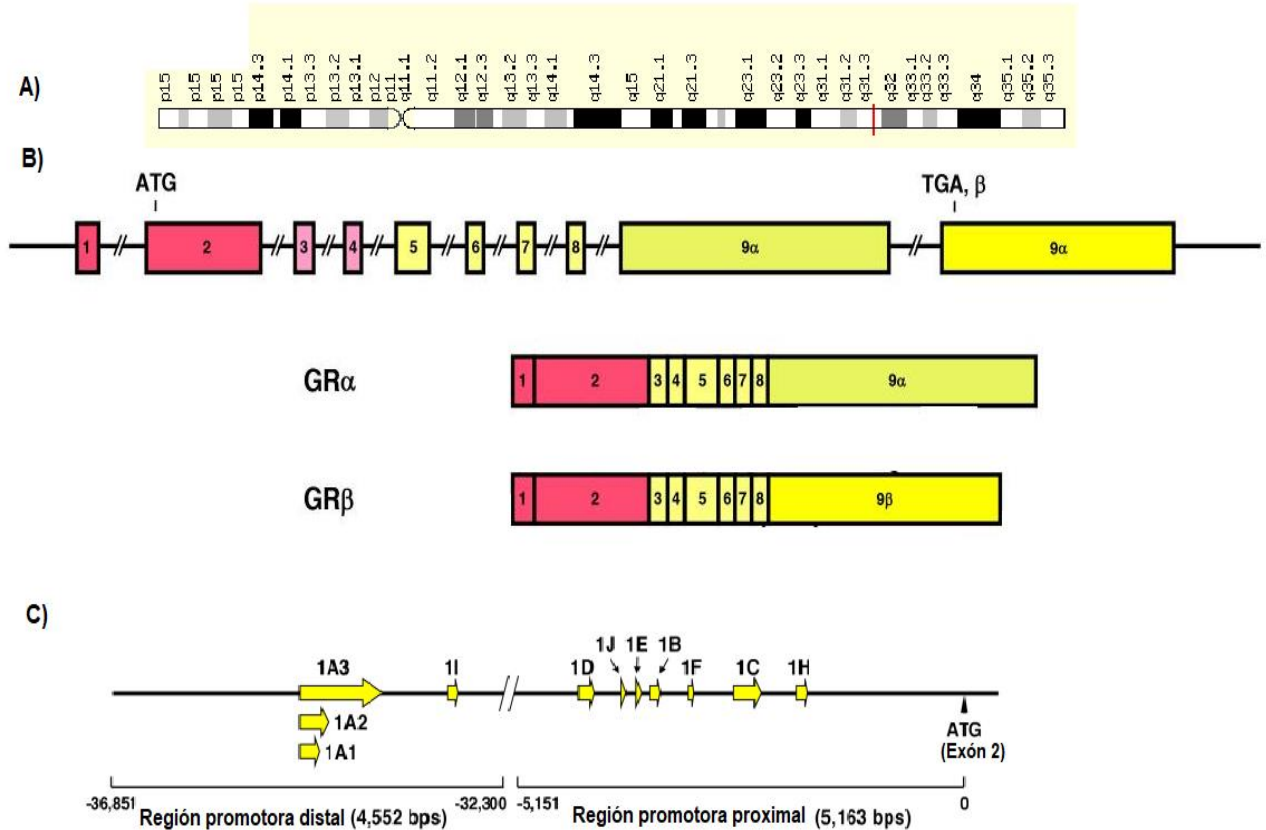


Fig 5. Gen *NR3C1*. Modificado de (Kino, 2017) **A)** Localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q31.3) **B)** El gen consta de 9 exones y tiene un tamaño de ~ 160 kb. Las dos principales isoformas, la isoforma α y la isoforma β son idénticas a lo largo de los primeros 8 exones, sin embargo la isoforma β en el aminoácido 727 presenta un codón de paro siendo más corta que la isoforma α . **C)** El gen *NR3C1* tiene 11 promotores diferentes que albergan secuencias específicas del exón 1. Los exones alternativos se muestran como flechas amarillas. La región flanqueante 5' del gen *NR3C1* tiene regiones promotoras proximal y distal, que abarcan respectivamente de ~ -37,000 a ~ -32,000 y de ~ -5,000 a ~ 0, corriente arriba del sitio de inicio de la traducción ubicado en el exón y contiene los exones 1A1, 1A2, 1A3 y 1I, y 1B, 1C, 1D, 1E, 1F y 1H, respectivamente.

El RG es codificado por el gen *NR3C1*, y se expresa en todos los tejidos y órganos del cuerpo (Androutsellis-Theotokis, et al 2013). El gen en humanos consta de 9 exones, se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (5q31.3) tiene un tamaño de ~ 160 kb. Aunque este gen genera varias isoformas de ARNm por medio de corte y empalme alternativo, existen dos isoformas principales, la isoforma α y la isoforma β , las cuales constan de 777 y 742 aminoácidos, respectivamente (**Fig.5**)

(Tomoshige Kino, 2017). Estas isoformas se generan por corte y empalme alternativo en el exón 9, siendo idénticas en los primeros 727 aminoácidos. Sin embargo, a partir del aminoácido 728, la isoforma β contiene 15 aminoácidos no homólogos en comparación con la isoforma α además de ser más corta. La isoforma α constituye el receptor clásico de glucocorticoides y funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando, regulando la expresión de los genes que responden a glucocorticoides, que corresponden aproximadamente del 3-10% del genoma humano (Galon, et al 2002). Mientras que la isoforma β no se une a los glucocorticoides y funciona como regulador negativo para la actividad transcripcional inducida por α (Chrousos et al 2005).

En ausencia de ligando, el GR reside principalmente en el citoplasma de las células como parte de un complejo multiproteico, que consta del receptor, dos moléculas de hsp90 y una proteína de unión, la chaperona FKBP5; en esta conformación el receptor tiene poca afinidad por el cortisol. En presencia del ligando éste se une al receptor, y la FKBP5 es intercambia por otra proteína chaperona FKBP4 que es capaz de reclutar dineína en el complejo, permitiendo su translocación nuclear y su actividad transcripcional (Lu, et al 2005).

El gen *NR3C1* cuenta con 11 promotores diferentes, por lo que puede producir 11 transcritos distintos que codifican para el mismo receptor y estos comparten el exón 2, que contiene el codón de inicio de la traducción. Como resultado del uso diferencial de estos promotores, los niveles de expresión de las isoformas del RG pueden variar en forma significativa entre los tejidos. De igual forma existen reportes que indican que en la presencia o ausencia de una enfermedad, sobre todo las enfermedades que afectan al HHA, como la depresión o el TEPT puede existir una variación diferencial en las isoformas del transcrito (Presul, et al 2007; Turner et al 2005). Así mismo, el uso selectivo de estos promotores en conjunto con la activación/inactivación controlan de manera diferencial la estabilidad y la eficiencia de traducción del ARNm, lo cual aporta a la expresión diferencial tisular del receptor (Bockmuhl, et al 2011).

Debido a que este receptor actúa activamente en el mecanismo de la respuesta al estrés, se han reportado alteraciones en la expresión de este receptor en TEPT (Girgenti, et al., 2017). Algunos autores atribuyen estos cambios de expresión a cambios en los patrones de metilación en los diferentes promotores del gen (menor metilación de promotores 1B, 1C y 1F) (**Fig. 5C**) resultando en una expresión relativa de 3.9 veces mayor del gen *NR3C1* en pacientes que padecía TEPT a aquellos sanos (Labonté et al., 2014; Yehuda et al., 2015). Los niveles de expresión del gen *NR3C1* han sido estudiados en modelos murinos anteriormente, mostrando una sobreexpresión en las ratas sometidos a estrés crónico (Liberzon, et al 2001) y otros estudios en los cuales se observó una mayor expresión del gen *NR3C1* durante situaciones de estrés agudo (Fujikawa et al., 2000). Sin embargo, también hay estudios en donde se compararon los niveles de expresión del gen *NR3C1* en pacientes con y sin TEPT, aunque los resultados no han sido concluyentes entre sí (Zaba, et al 2015; Van Zuiden, et al 2011). De igual forma se ha reportado que la presencia de variantes en el gen *NR3C1* rs41423247 y rs258747 aumenta el riesgo de padecer TEPT (Lian et al. 2014)

De igual forma RG actúa como factor de transcripción de genes regulatorios que actúan en el eje HHA, como el gen *FKBP5*, que codifica para la proteína de unión 5. El gen *FKBP5* es una proteína chaperona que evita la translocación del RG al núcleo, y cuyo gen se encuentra subexpresado en pacientes con TEPT (Van Zuiden, et al., 2012), siendo esto un punto clave en la desregularización del eje HHA en pacientes con TEPT. Así este gen podría ser un candidato en la búsqueda de biomarcadores diagnósticos para el TEPT.

II. Justificación

En la actualidad, existen pocos estudios sobre el estrés postraumático en México, no hay datos claros acerca de la prevalencia ni de la resiliencia de esta enfermedad en el país; de igual forma no hay investigaciones que se enfoquen en estudios genómicos o genéticos enfocados en TEPT. Por otra parte, aunque la Secretaría de Salud de México cuenta con manuales y guías sobre el diagnóstico y tratamiento, éstas no se han actualizado desde el 2011. Así mismo, estas guías siguen las mismas recomendaciones para el diagnóstico basadas en el DMS-V, haciendo el proceso de diagnóstico complejo y poco preciso.

De igual forma, el país ha experimentado en los últimos años un incremento en la violencia, lo que ha permitido que cada vez más personas estén expuestas a sucesos traumáticos. Lo anterior sugiere que la prevalencia en el país del TEPT podría también verse incrementado en nuestro país. Por tal motivo, sigue siendo necesario que se desarrollen nuevas técnicas que faciliten el diagnóstico de esta enfermedad, permitiendo así, que los pacientes reciban una terapia oportuna, para superar el trauma y mejorar su calidad de vida.

El presente trabajo pretende ayudar a comprender de mejor forma el mecanismo molecular subyacente a la fisiopatología del TEPT relacionado con el receptor de glucocorticoides, y a su vez desarrollar un diagnóstico molecular más preciso.

III. Objetivos

Objetivo general

Analizar la expresión del gen *NR3C1* en pacientes con trastorno por estrés postraumático e individuos sanos.

Objetivos Particulares

- Extraer el ARN total de muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con TEPT, e individuos sanos.
- Sintetizar ADNc a partir del ARN total de muestras de sangre periférica de pacientes con TEPT, e individuos sanos.
- Realizar la estandarización y normalización del ensayo de cuantificación relativa de la expresión génica del gen *NR3C1* utilizando como gen normalizador al *18S*.
- Comparar la expresión del gen *NR3C1* en pacientes con TEPT e individuos sanos.
- Evaluar si la expresión del gen *NR3C1* pudiera ser un posible biomarcador diagnóstico de TEPT.

IV. Hipótesis

Si el gen *NR3C1* participa activamente en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el cual se ha reportado como disfuncional en pacientes con TEPT, entonces la expresión del gen *NR3C1* se encontrará alterada en esta enfermedad, por lo cual su estudio y comprensión del mecanismo molecular de la transcripción permitirá diferenciar a pacientes sanos de aquellos que sufren la patología.

V. Sujetos y métodos

Muestras analizadas

Posterior a la firma de un consentimiento informado, se tomaron muestras de sangre periférica de 32 elementos de la Secretaría de Marina (SEMAR) retirados con diagnóstico de Trastorno por Estrés Postraumático durante el periodo de noviembre del año 2017 a enero del 2018 en la Clínica Naval de Cuernavaca. Estos elementos fueron diagnosticados de acuerdo con los criterios del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría en su cuarta edición (DSM-IV) por al menos dos médicos psiquiatras. De estos 32 pacientes con TEPT, 27 (84.3%) de los pacientes fueron hombres y 5 mujeres (15.7%) con edades entre los 28 y 58 años. Todos los pacientes con TEPT son mexicanos y con dos generaciones de ancestros (abuelos) nacidos en México (**Ver Tabla 3**).

A la par, como grupo control, se incluyeron 69 elementos en activo (edad 18-47) pertenecientes a las fuerzas armadas de la SEMAR, a los cuales se les tomaron muestras de sangre periférica posterior a la aplicación de un cuestionario y la obtención de la firma de un consentimiento informado. Estos elementos fueron individuos clínicamente sanos y recibieron una evaluación clínica por al menos dos médicos psiquiatras de acuerdo con los criterios del Manual DSM-IV para descartar TEPT. Todos los controles fueron nacidos en México, al igual que sus ancestros dos generaciones atrás. Sin embargo, para el presente estudio únicamente se incluyeron 59 individuos sanos, de los cuales 55 (93.2%) fueron hombres y 4 (6.8%) mujeres. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México con No. De registro 048-2016.

Tabla 3. Datos de los participantes en el estudio.

| | Caso | Control |
|-------------------------------|------------|------------|
| N | 32 | 59 |
| Promedio Edad +/- D.E. | 36+/-6.4 | 29+/-6.8 |
| Grupo Edad | n (%) | n (%) |
| <29 años | 6 (18.7%) | 32 (54.2%) |
| 30- 40 años | 20 (62.5%) | 24 (40.7%) |
| >41 años | 6 (18.7%) | 3 (5.1%) |
| Sexo | | |
| Masculino | 27 (84.4%) | 55 (93.2%) |
| Femenino | 5 (15.6%) | 4 (6.8%) |

Análisis de la expresión del gen *NR3C1*.

Previo a la extracción del ARN de las muestras de sangre periférica, se aislaron los leucocitos a partir de la sangre total. Para ello se empleó un buffer de lisis de eritrocitos que fue añadido a las muestras en proporción 2:1 posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 15min para obtener el paquete blanco con leucocitos en tubos de 2 mL. A cada tubo con el *pellet* de leucocitos se le añadió 750 µL de TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A) y fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis. La extracción del ARN total fue llevada a cabo de acuerdo con el protocolo de extracción empleando TRIzol™ siguiendo las recomendaciones del fabricante. En breve, el protocolo, se llevó a cabo de la siguiente manera: Las muestras fueron descongeladas y mantenidas en hielo, posteriormente el *pellet* fue resuspendido en el TRIzol™ por inversión, se añadieron 200 µL de cloroformo, se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo por 10 min; posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min a 4°C, se tomaron 300 µL de la fase acuosa y se transfirieron a un tubo nuevo de 1.5 mL, posteriormente se añadieron 500 µL de isopropanol, se resuspendio el *pellet* y se dejó incubando 10 min en hielo, después se centrifugó a 1120 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante. Luego se realizaron dos lavados con 1 mL de etanol al 75%, resuspendiendo el *pellet* y centrifugando a 1120 rpm por 10 min a 4°C; después del segundo lavado se descartó el sobrenadante y

se dejó secar el *pellet* aproximadamente 15 min, finalmente se resuspendió en 60 μ L de agua grado biología molecular.

Para determinar la integridad y pureza del material genético de forma semicuantitativa, se realizaron geles de agarosa al 1.5% marcados con Red Gel™ en condiciones desnaturalizantes añadiendo NaClO al 0.02%. Las concentraciones absolutas del ARN, así como los cocientes 260/280 y 260/230 fueron determinadas por medio de un espectrofotómetro de NanoDrop™ (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.*). A partir del ARN total, se sintetizó ADNc empleando el kit comercial High-Capacity ADNc Reverse Transcription Kit (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.*). El ADNc sintetizado fue nuevamente cuantificado empleando un espectrofotómetro de NanoDrop™ (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.*).

El ADNc sintetizado de las muestras de los casos y los controles se empleó para cuantificar relativamente el transcrito del gen *NR3C1* (Hs00353740_m1) utilizando sondas TaqMan® Gene Expression Assays (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.*) TaqMan® Gene Expression Assays (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.*). Como gen de control interno, se emplearon sondas TaqMan® para el gen constitutivo *18S* (Hs99999901_s1). Previo a la cuantificación, con el ADNc de una muestra control, se realizó una curva estándar de amplificación con ambas sondas utilizando las siguientes concentraciones: 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 ng/ μ L. Una vez que se llevó a cabo la validación, se procedió a analizar la expresión de *NR3C1* en los casos y los controles. Para la cuantificación relativa, se preparó una mezcla para cada reacción, la cual contiene 45ng de ADNc total, 1 μ L de sonda TaqMan y 10 μ L de Master Mix TaqMan™ Universal PCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.*), en un volumen total de reacción de 20 μ L. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos por triplicado y cada gen fue analizado por separado en un equipo de PCR en tiempo real Quantstudio 5 (*Thermo Fisher*

Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A). Las condiciones de las temperaturas en las que se llevó a cabo la cuantificación están en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de las reacciones de qPCR

| Fase de la reacción | | Temperatura | Tiempo (min) |
|---------------------|------------------------|-------------|--------------|
| Hold | Incubación de UNG | 50 °C | 02:00 |
| | Activación Polimerasa | 95 °C | 10:00 |
| PCR (x40) | Desnaturalización | 90°C | 00:15 |
| | Alineamiento/Extensión | 60°C | 01:00 |

Análisis de los datos de la PCR en tiempo real

Para la validación de Método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$), se consideró a la cinética de amplificación de la PCR como (Livak, et al; 2001):

$$X_n = X_o (1+E_x)^n \dots\dots\dots [1]$$

Donde X_n es el número de moléculas del gen blanco a un ciclo n de la reacción, X_o es el número inicial de moléculas del gen blanco. E_x es la eficiencia de la amplificación y n es el número de ciclos.

Dado que el ciclo de umbral (CT) indica el ciclo en donde la cantidad amplificada cruza el umbral,

$$X_T = X_o (1+E_x)^{C_{T,X}} = K_x \dots\dots\dots [2]$$

Donde X_T es la cantidad de moléculas necesarias para alcanzar el umbral, $C_{T, x}$ es el ciclo en el que se cruza el umbral, mientras que K_x representa una constante. Para el gen de referencia se asume una ecuación similar

$$R_T = R_o (1+E_R)^{C_{T,R}} = K_R \dots\dots\dots [3]$$

Donde R_T es la cantidad de moléculas necesarias del gen endógeno para alcanzar el umbral, $C_{T, R}$ es el ciclo en el que se cruza el umbral, E_R la eficiencia de amplificación del gen endógeno, mientras que K_R representa una constante.

Si se dividen [2] entre [3], se obtiene la expresión:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o (1 + E_x)^{C_{T,x}}}{R_o (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K \dots\dots\dots [4]$$

Asumiendo que ambas eficiencias de amplificación son iguales:

$$E_X = E_R = E,$$

$$\frac{X_o}{R_o} x (1 + E)^{C_{t,x} - C_{t,R}} = K \dots\dots\dots [5]$$

Se puede llegar a la siguiente expresión

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_t} = K \dots\dots\dots [6]$$

Donde X_N es la cantidad normalizada de moléculas del gen blanco (X_o/R_o), y la expresión ΔC_T es la diferencia entre el C_T del gen blanco y el de la referencia ($C_{T,x} - C_{T,R}$). Y al simplificar [6], resulta la siguiente expresión:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_t} \dots\dots\dots [7]$$

Finalmente, cuando se calcula la cuantificación relativa, se comparan las cantidades normalizadas del gen blanco entre las muestras (casos con TEPT) y muestras calibradores (Controles sin TEPT):

$$\frac{X_{N,caso}}{X_{N,Control}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,caso}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,control}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \dots\dots\dots [8]$$

$$\text{Donde } -\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T, caso} - \Delta C_{T, control})$$

En qPCR, donde los amplicones son menores a 150 pb y en los cuales los componentes están en condiciones óptimas, la eficiencia es cercana a 1, por lo cual la cantidad de moléculas del gen blanco, puede resumirse como:

$$\text{Cantidad de gen blanco} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Para utilizar este método se validó que la eficiencia de amplificación para el gen *NR3C1* y la del *18S* a las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción fueran cercanas al 100% e iguales entre sí. Las eficiencias de PCR en tiempo real (E) se calcularon a partir de las pendientes determinadas, de acuerdo con la ecuación

$$E = 10^{-1 / \text{pendiente}} - 1$$

Donde E = 1 corresponde al 100% de eficiencia

Las pendientes se determinaron realizando regresiones lineales de las curvas de calibración realizadas para ambos genes; graficando en el software GraphPad Prism 6 los C_T obtenidos en el eje de las ordenadas y en el eje de las abscisas los logaritmos base 10 de las concentraciones conocidas. Para determinar si las eficiencias de amplificación eran iguales se realizó una curva de eficiencias relativas, en la cual se calcularon los $\Delta C_T = C_{T, NR3C1} - C_{T, 18S}$ para cada punto de la curva de calibración, y se graficaron en el software GraphPad Prism 6 los ΔC_T calculados en el eje de las ordenadas y en el eje de las abscisas los logaritmos base 10 de las concentraciones conocidas, posteriormente se realizó una regresión lineal.

Una vez validado el método, los datos crudos de C_T fueron analizados para determinar la cantidad del gen blanco en todas las muestras siguiendo el siguiente algoritmo de cálculo:

$$\Delta C_T = C_{T, NR3C1} - C_{T, 18S}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T, \text{caso}} - \Delta C_{T, \text{control}}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Análisis estadístico

La media del incremento en la expresión relativa del gen *NR3C1* expresada en *fold change* (FC) fue comparada entre los casos y los controles utilizando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Esta prueba también fue utilizada para

comparar los casos y los controles agrupados por edad y sexo (**Tabla 3**). Para determinar si existe una correlación entre la expresión del gen *NR3C1* y la edad se utilizó la correlación de Pearson y con el Coeficiente de Correlación (r), se calculó el Coeficiente de Determinación (r^2). El *fold change* (FC) de la expresión del gen *NR3C1* fue comparada entre los controles y los casos de acuerdo con el tipo de TEPT (agudo, crónico y de inicio retardado; **Tabla 4**) utilizando la prueba de ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una comparación post-hoc con Bonferroni. Con el FC de expresión del gen *NR3C1* se construyó un modelo de regresión lineal para determinar si al incrementarse el tiempo con la sintomatología de los pacientes con TEPT disminuye la expresión de este gen. Para evaluar si la expresión del gen *NR3C1* puede ser útil como prueba diagnóstica del TEPT, se construyó con los datos de expresión de este gen una curva ROC (del inglés Receiver Operative Curve) y se calculó el Área Bajo la Curva (ABC). Para determinar el punto de corte en la expresión del gen *NR3C1* que representa una mayor sensibilidad y especificidad para utilizarla como prueba diagnóstica, se calculó el índice de Youden (sensibilidad+especificidad-1) para cada coordenada de la curva. Con este punto de corte, se categorizó en forma dicotómica la expresión del gen *NR3C1* de los pacientes con TEPT y los controles. Se calculó especificidad, sensibilidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) con la expresión del gen *NR3C1* re-categorizada. Además, se calculó el riesgo (Razón de Momios) empleando un modelo regresión logística múltiple ajustado para el sexo y la edad. Todas las pruebas estadísticas se realizaron empleando el paquete estadístico SPSS™ versión 20. A excepción del análisis post hoc de Bonferroni ($p < 0.001$), el valor de $p < 0.01$ fue considerado como significativo.

Tabla 4. Datos clínicos sobre de los pacientes con TEPT

| | Casos |
|---|--------------|
| Años con la sintomatología | 5 (\pm 3) |
| Tiempo sucedido entre el evento traumático y el comienzo de los síntomas | |
| | n (%) |
| Agudo (<3 meses) | 18 (56.3%) |
| Crónico (3-6 meses) | 6 (18.8%) |
| Inicio demorado (>6 meses) | 8 (25%) |
| Tipo de evento que generó la sintomatología | |
| Accidente | 3 (9.4%) |
| Emboscada | 2 (6.3%) |
| Enfrentamiento | 13 (40.6%) |
| Operativo de alto impacto | 9 (28.1%) |
| Secuestro | 3 (9.4%) |
| Tortura | 1 (3.1%) |
| Violencia a terceros | 1 (3.1%) |
| Tratamiento | |
| Sí | 30 (96%) |
| No | 2 (6.4%) |
| Tipo de tratamiento | |
| Ansiolítico * | 18 (60%) |
| Antidepresivos | 3 (10%) |
| Desensibilización | 4 (13.3%) |
| Terapia | 2 (6.7%) |
| Desconocido | 3 (10%) |

*Únicamente ansiolíticos o en conjunto con otro tratamiento.

VI. Resultados y discusión

Estandarización del método $2^{-\Delta\Delta CT}$

Se extrajo el RNA total de las 91 muestras de sangre periférica obtenidas, y al evaluar su integridad mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa (**Fig. 6**), se obtuvieron las dos bandas esperadas para las subunidades ribosomales 28S y 18S, asegurando así la integridad del RNA extraído.

Todas las muestras fueron sometidas a retrotranscripción para sintetizar ADNc, y únicamente se seleccionaron dos muestras para realizar las curvas de calibración y validar el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para cuantificar el gen *NR3C1*.

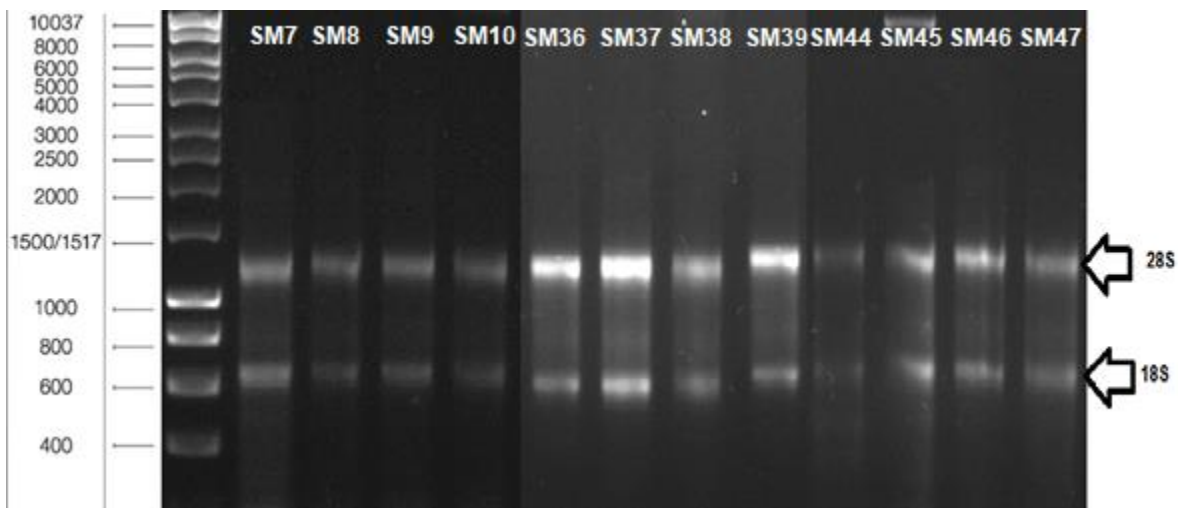


Fig 6. Electroforesis del ARN extraído de los pacientes con TEPT. En la figura se muestra un gel de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturalizantes con NaClO al 0.02% de la extracción de RNA total con Trizol. Utilizando como marcador de peso al HyperLadder™ 1kb, se observan las bandas esperadas 28S y 18S, con una proporción 2 a 1, respectivamente. En cada carril se encuentran muestras de pacientes con TEPT.

Se obtuvieron los datos de ciclo de umbral (C_T) de las diluciones seriadas correspondientes a la curva de calibración. En ambas curvas se obtuvieron en cada uno de los puntos de la curva coeficientes de variación menores a 1%, lo que indica que los datos no se encontraban dispersos y eran homogéneos entre sí. Con ambas

regresiones lineales el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9980 para el gen normalizador *18S* y de 0.9973 para el gen *NR3C1* (**Fig. 7**). De acuerdo con la literatura, los datos obtenidos se ajustaron de manera óptima a la línea de regresión, debido a que es deseable que los datos de R^2 sean mayor de 0.997 en los ensayos de RT-qPCR (Taylor, et a; 2010). Es posible que el valor de los coeficientes de determinación no fuera 1 por las variaciones entre réplicas, sin embargo, cuando se trata de muestras biológicas es sumamente complejo tener un ajuste ideal (Taylor, et a; 2010). En la regresión lineal no fue necesario eliminar puntos en ninguno de los extremos de la línea de regresión para obtener un $R^2 > 0.997$, por lo que esta serie de diluciones podría sugerirse como un rango de detección del modelo experimental. Por tal motivo, se eligió una concentración de ADNc de 5ng/ μ L para los ensayos de cuantificación, ya que el coeficiente de variación entre réplicas de ambos genes es bajo (*18S*= 0.33% *NR3C1*=0.28%) (Taylor, et a; 2010).

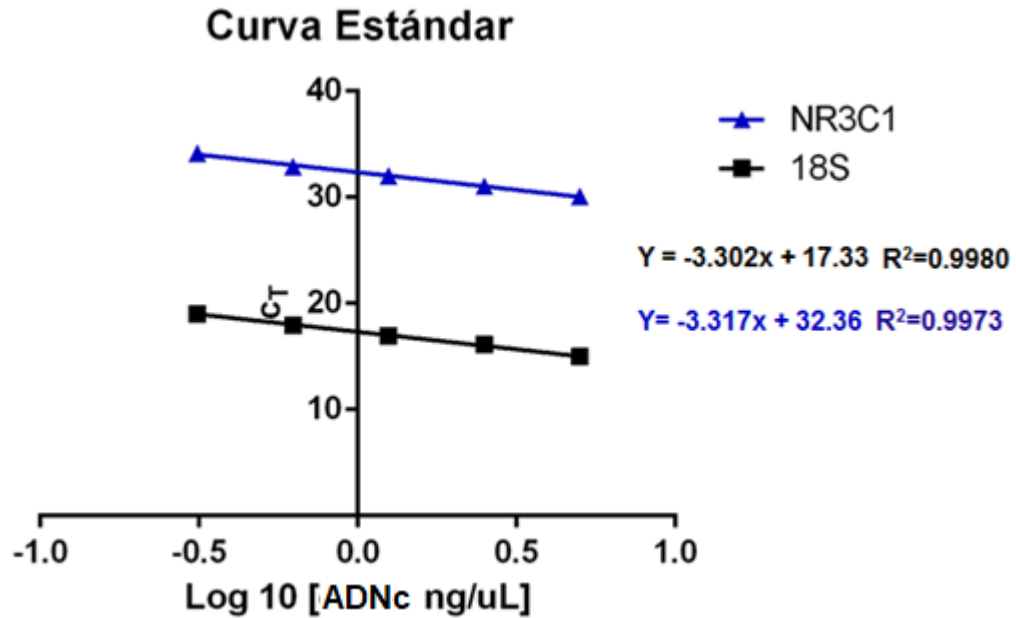


Fig 7. Curvas estándar del gen *NR3C1* Y *18S*. Regresión lineal de los C_T en función de los Log_{10} de las concentraciones de ADNc. ■ Curva estándar del gen normalizador *18S* resultado con ecuación de la recta de $y=-3.302x+17.33$ y un coeficiente de determinación $R^2= 0.9980$ ▲ Curva estándar del gen de interés *NR3C1* resultado con ecuación de la recta de $y=-3.317x+32.36$ y un coeficiente de determinación $R^2= 0.9973$

Al realizarse la regresión lineal ambas curvas mostraron una pendiente de -3.302 para el gen normalizador *18S* y -3.317 para el gen *NR3C1*, ya que en una regresión lineal de los C_T vs los log_{10} de las concentraciones empleadas, se espera una recta con una pendiente negativa con un valor de -3.333 cuando la eficiencia es 100% o 1. Las eficiencias calculadas con la fórmula $E = 10 (-1 / \text{pendiente}) - 1$ para el gen *18S* y *NR3C1* resultaron en 100.84% y 100.21% respectivamente, por lo cual se puede asegurar que la cantidad de moléculas tanto del gen blanco y del gen normalizador se duplican en cada ciclo (Svec, et al; 2014). Es importante mencionar que es deseable que la eficiencia sea cercana al 100%, ya que la robustez y precisión de los ensayos de qPCR está relacionada con una alta eficiencia en la amplificación (Bustin et al; 2009). Las eficiencias en la amplificación mayores al 100% pueden deberse a inhibidores de la PCR, baja pureza de los ácidos nucleicos, muestras muy concentradas, error de pipeteo o baja eficiencia en la retrotranscripción y pueden conducir a errores en la estimación de cambios en la

expresión génica. Sin embargo, es ampliamente aceptado que un ensayo optimizado y confiable de qPCR, presente pendientes en las curvas de calibración entre -3.5 y -3.2, los cuales corresponden a eficiencias de 93.07% y 105.35%, respectivamente (Nolan, et al; 2006). Las eficiencias de la qPCR para ambos genes en el presente trabajo están dentro de los valores mencionados, por lo cual podemos decir que las condiciones empleadas son confiables y adecuadas para ser utilizadas en análisis posteriores.

Al realizar la regresión lineal del diagrama de eficiencias relativas de los genes *18S* y *NR3C1* se obtuvo una pendiente de $m=0.01528 \pm 0.09931$ (**Fig. 7**), que resulta en un valor aceptable y nos permite asumir que las eficiencias de amplificación del gen *18S* y la del *NR3C1* son iguales entre sí. Un valor de pendiente entre -0.1 y 0.1 asegura que la corrección que se hace en el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ al suponer ambas eficiencias de amplificación iguales no cause errores en la estimación del cambio en la expresión relativa de los genes de interés (Wong, et al; 2005), demostrando así que el gen *18S* puede utilizarse como gen normalizador en el cálculo de los cambios de expresión del gen *NR3C1* en una cuantificación relativa utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ obteniendo datos confiables y exactos.

Diagrama de eficiencia relativa de los genes 18S y NR3C1

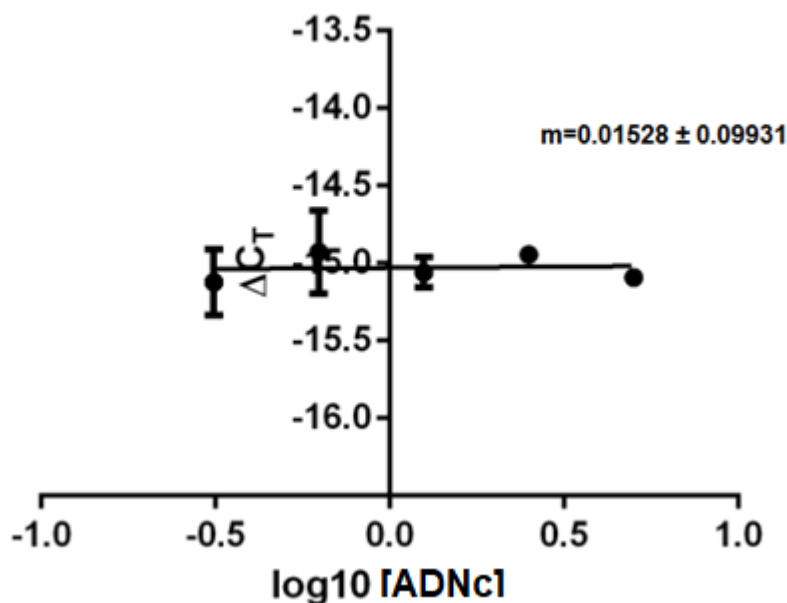


Fig 8. Diagrama de eficiencia relativa de los genes 18S y NR3C1. En el eje de las abscisas se encuentran el log10 de las concentraciones de cADN, mientras que en el eje de las ordenadas se encuentran las $\Delta C_T = C_{T\ 18s} - C_{T\ NR3C1}$ de la regresión lineal se obtuvo una pendiente de $m=0.01528 \pm 0.09931$

Análisis en los cambios de la expresión relativa del gen NR3C1

Al analizar la expresión relativa en leucocitos del gen NR3C1 entre el grupo de casos con TEPT y el grupo control sin TEPT se encontró una diferencia estadísticamente significativa (U de Mann-Whitney, $p < 0.01$) (**Fig. 9**). Este gen se encontró 4.3 veces más sobre-expresado en el grupo de casos con TEPT que en el grupo control. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de este gen pudiera estar directamente relacionado con el trastorno por estrés postraumático y participar en la desregularización del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal.

La sobreexpresión de este gen podría implicar cambios fisiológicos que pudieran estar relacionados con la fisiopatología de la enfermedad. Anteriormente se había reportado en pacientes con TEPT un incremento en la retroalimentación

negativa, junto con niveles de cortisol sérico disminuidos (Gill et al, 2008; Mason et al, 1986; Yehuda et, al 2000). La sobreexpresión del gen *NR3C1* podría tratarse de una respuesta compensatoria en pacientes con esta enfermedad para tratar de mantener la homeostasis y contrarrestar los síntomas continuos que conlleva la patología (Yehuda et, al 2000). Por ejemplo, se ha reportado que existe un incremento en el número de receptores de glucocorticoides en leucocitos en pacientes con TEPT (Yoon y Kim, 2018).

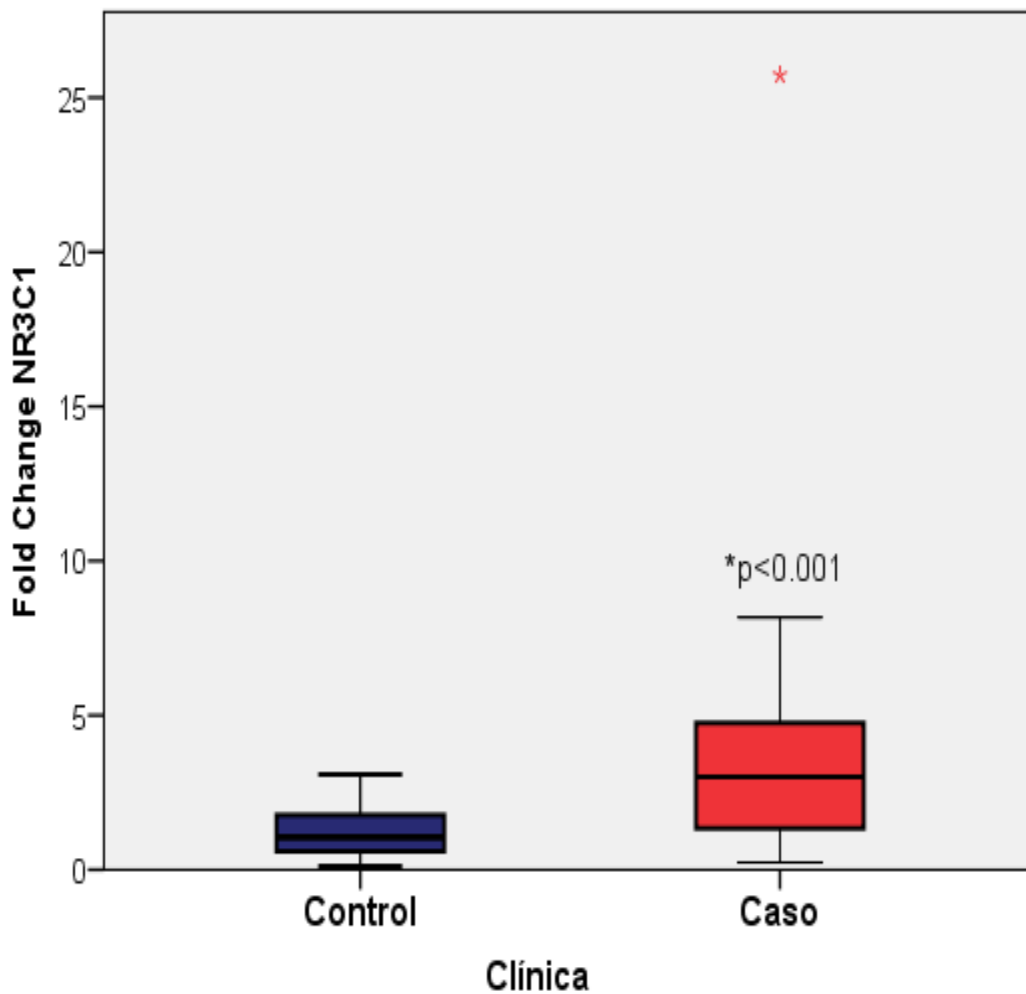


Fig 9. Cambio en la expresión relativa del gen *NR3C1* entre el grupo control y el grupo de casos. Se muestra una sobreexpresión significativa del gen *NR3C1* (U de Mann-Whitney, $p < 0.01$).

Sin embargo, existen investigaciones que reportan que en pacientes con TEPT, los receptores de glucocorticoides no son funcionales para mantener la homeostasis

(Van Zuiden et al., 2011). En este caso, aunque existe una sobreexpresión del gen, esta sobreexpresión podría tratarse de la isoforma β , la cual no se une a cortisol y por lo tanto no tiene los efectos como factor de transcripción de los genes necesarios para mantener regulado de forma correcta el eje HHA (Gola et al., 2014). Además se ha reportado que la isoforma β también inhibe la represión mediada por GR- α de los promotores que responden a NF- κ B y AP-1, que son necesarios para el correcto funcionamiento de HHA (Lu y Cidlowski, 2014).

En el presente trabajo la detección del gen se realizó con una sonda comercial TaqMan™ (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A*), la cual es inespecífica para las isoformas del gen *NR3C1*. Se ha reportado que la isoforma α , que es la principal isoforma que se encuentra para mantener regulado el eje HHA, se encuentra disminuida en pacientes con TEPT, así como una menor eficiencia en la unión del cortisol a los receptores en pacientes que experimentan estrés crónico y TEPT (Matic et al; 2013.; Gola et al; 2014).

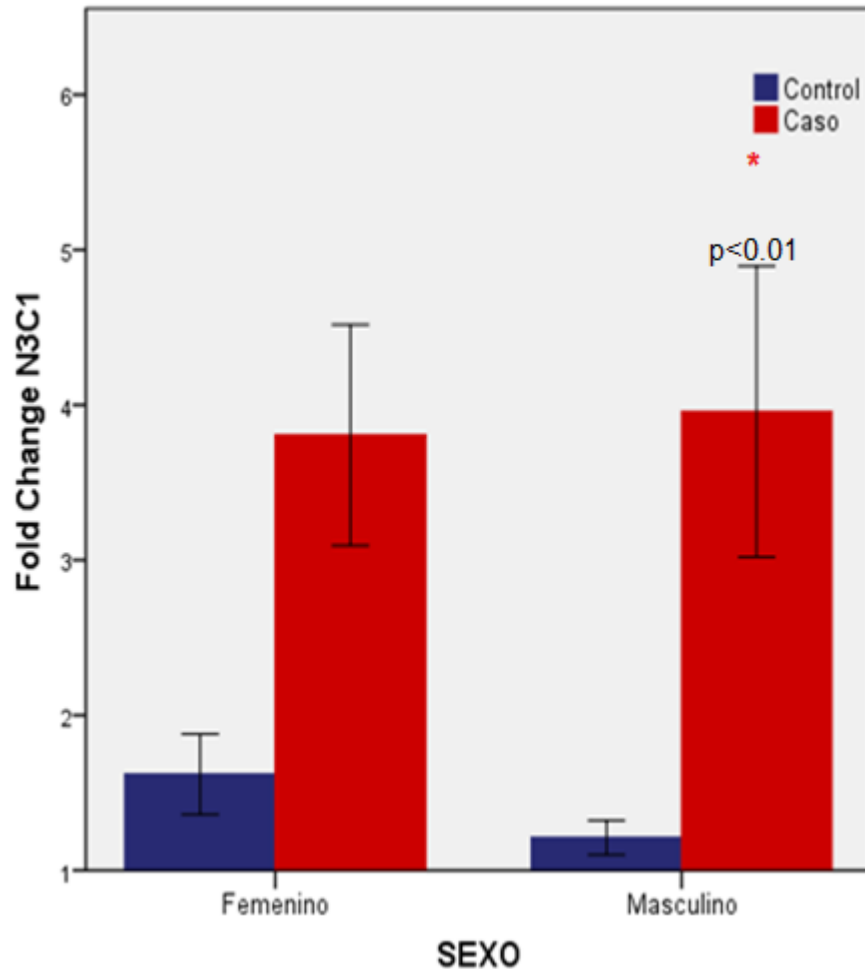


Fig 10. Cambios en la expresión relativa del gen *NR3C1* en los grupos control y casos por sexo. La diferencia en los cambios de expresión en las mujeres no resulta significativo (U de Mann-Whitney $p > 0.05$); mientras que en el grupo de los varones la diferencia resulta estadísticamente significativa. (U de Mann-Whitney, $p < 0.01$)

Al analizar el cambio en la expresión de *NR3C1* por sexo entre el grupo de casos con TEPT y el grupo de controles sin TEPT, se observó que el *fold change* en la expresión fue estadísticamente significativo en el grupo de los varones (U de Mann-Whitney, $p < 0.01$), a diferencia de las mujeres (U de Mann-Whitney $p > 0.05$). Esto podría deberse a diferencias en el tamaño de muestra, aunque de manera basal, la expresión de las mujeres fue mayor en las mujeres en comparación que los hombres (1.6 vs. 1.2; **Fig. 10**).

Estos datos coinciden con estudios llevados a cabo en un modelo murino, en donde estudian la expresión del gen del receptor de glucocorticoides en respuesta al estrés crónico (Keller et al; 2015). En este estudio, se observaron diferencias de acuerdo con el sexo en la expresión del gen *NR3C1* en el hipotálamo, al encontrarse una mayor expresión en las hembras que no habían sido sometidos a estrés. Lo anterior se pudiera deber a una diferencia entre hombres y mujeres en la retención de la extinción del miedo. Al existir una mayor cantidad de receptores de glucocorticoides en el hipocampo de las mujeres, ocurre una sensibilidad aumentada del HHA al cortisol. Aunque los datos de expresión son en cerebro, los autores sugieren que los niveles de expresión del receptor en sangre pudieran reflejar los efectos del estrés traumático en la expresión de GR en el cerebro (Keller et al; 2015).

Se ha reportado una mayor frecuencia del TEPT en mujeres que en hombres, probablemente debido a que las mujeres están más expuestas a eventos relacionados al trauma, como abuso sexual y violación, teniendo mayor probabilidad de ser sometidas a formas múltiples de violencia a lo largo su vida (Olf 2017). Sin embargo contrarrestando con lo anterior, encuestas epidemiológicas sugieren que la mayor prevalencia de TEPT en mujeres no es sólo porque estas están más expuestas a situaciones traumáticas a lo largo de su vida, sino que deben de existir otros factores, tal vez fisiológicos que las hagan más vulnerables a padecer TEPT (Breslau et al; 2007).

Debido a que los controles no fueron pareados por edad, para descartar que el incremento en la expresión del gen *NR3C1* esté relacionado con la edad, se agruparon los casos y los controles en tres grupos de edad (Ver tabla 4). En los tres grupos de edad la sobre expresión se mantuvo, aunque sólo se observó una diferencia significativa en la expresión del gen *NR3C1* en los grupos de edad de 30-40 años (U de Mann-Whitney , $p < 0.05$) y en el grupo que corresponde a ≥ 41 años (U de Mann-Whitney , $p = 0.045$; **Fig. 11.A**). Interesantemente, la sobreexpresión más notoria fue en los pacientes de 30- 40 años, con un *fold change* promedio de 4.62. Esto podría deberse a que los individuos menores a 29 años no han sido expuestos

a sucesos traumáticos de forma prolongada en comparación con los individuos de mayor edad.

Además de agrupar los casos y los controles por edad, se calculó un coeficiente de correlación de Pearson con los datos de expresión y la edad (**Fig.12**). Aunque el *fold change* de la del gen *NR3C1* disminuye en los controles y aumenta en los casos conforme a la edad, los coeficientes de correlación obtenidos fueron de $R^2=0.044$ y $R^2=0.019$ para el grupo de casos con TEPT, respectivamente. Esto indica que no existe una relación directa entre la edad y la expresión del gen *NR3C1*. Aunque se ha reportado que la secreción de cortisol y de otras hormonas relacionadas con el eje se ven afectadas con el envejecimiento (Gupta y Marley, 2014) , no se han encontrado que indiquen que la edad pudiera ser un factor de riesgo para el desarrollo de TEPT.

A)

| | Expresión <i>NR3C1</i> (Media \pm E.E.) | | valor de p |
|------------|---|-----------------|------------|
| | Controles | Casos | |
| Grupo Edad | | | |
| ≤ 29 años | 1.35 \pm 0.14 | 2.45 \pm 0.98 | > 0.05 |
| 30-40 años | 1.15 \pm 0.15 | 4.62 \pm 1.20 | < 0.01 |
| ≥41 años | 0.69 \pm 0.27 | 3.12 \pm 0.80 | 0.045 |
| SEXO | | | |
| Femenino | 1.61 \pm 0.26 | 3.80 \pm 0.71 | > 0.05 |
| Masculino | 1.21 \pm 0.10 | 3.95 \pm 0.93 | < 0.01 |

B)

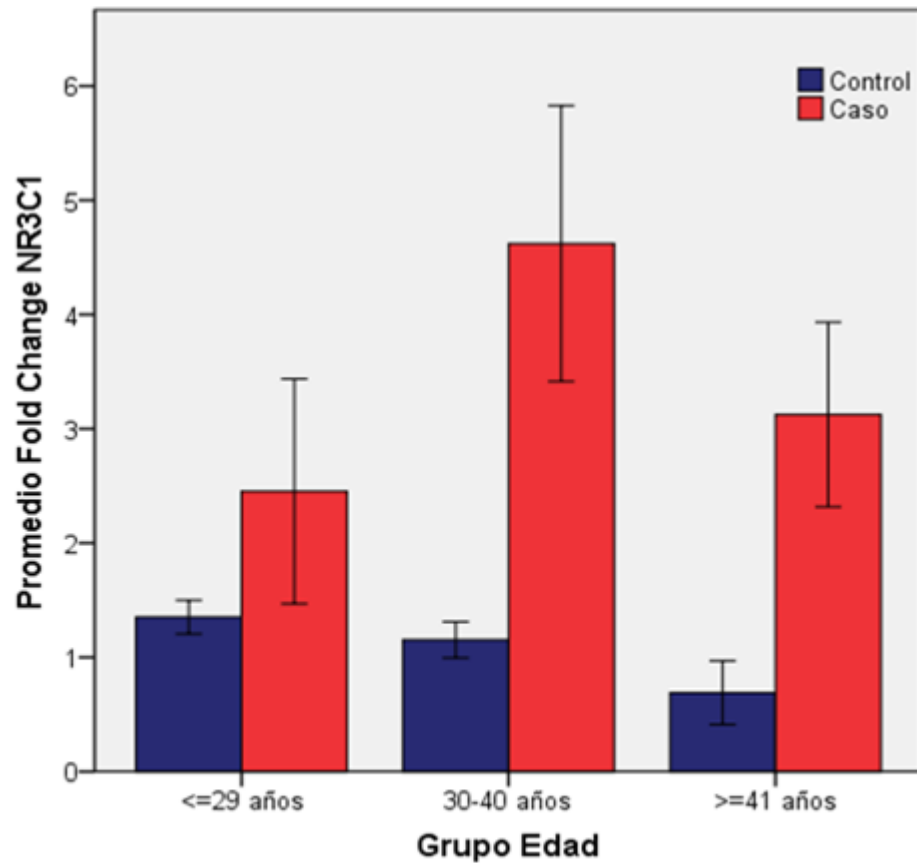


Fig 11. A) Valores de dispersión y de significancia de los cambios en la expresión relativa del gen *NR3C1* por grupos de edad y sexo: La sobreexpresión del gen *NR3C1* aumenta significativamente en los casos con TEPT en los participantes de sexo masculino (U de Mann-Whitney, $p < 0.01$), en los participantes que se encuentran en el grupo de edad de 30-40 años (U de Mann-Whitney, $p < 0.001$), y en los pacientes con más de 41 años (U de Mann-Whitney, $p = 0.045$) B) Cambios en la expresión relativa del gen *NR3C1* por grupos de edad.

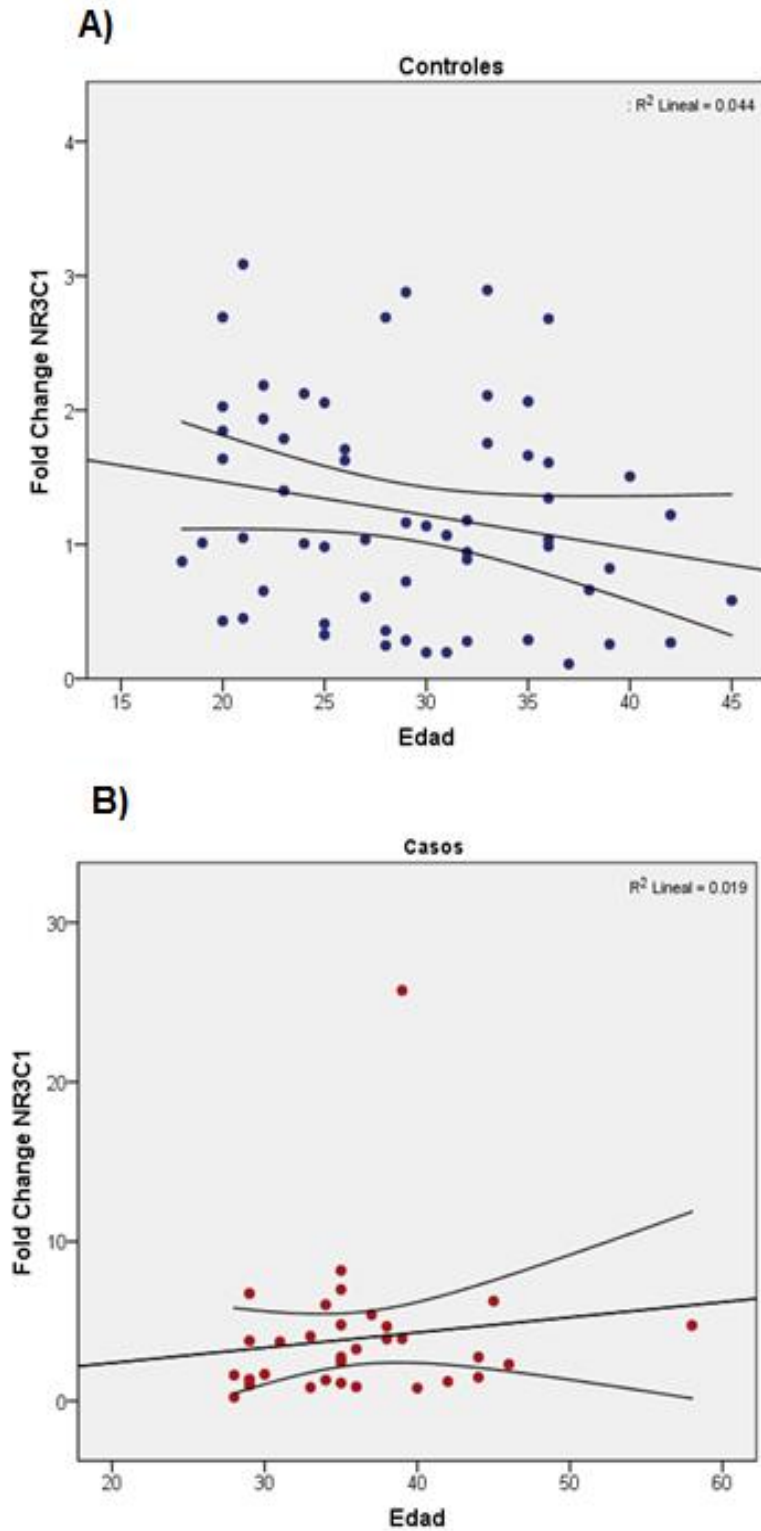


Fig 12. A) Correlación entre el cambio de la expresión relativa del gen *NR3C1* con la edad del grupo control ($R^2=0.044$). B) Correlación entre el cambio de la expresión relativa del gen *NR3C1* con la edad del grupo de casos ($R^2=0.019$)

Cuando se analizó la expresión del gen *NR3C1* de acuerdo con el tipo de TEPT (agudo, crónico, de inicio demorado), se observó que el cambio de expresión del gen *NR3C1* fue significativamente mayor en pacientes con TEPT agudo (**Fig. 13**).

Este resultado sería de gran utilidad en el diagnóstico de TEPT, debido a que se ha observado que cuando se presenta TEPT agudo y no se tiene tratamiento inmediato esto puede desencadenar en la gran mayoría de los casos a la cronicidad de la enfermedad y empeoramiento de los síntomas (Bryant, et al; 2017). Dado que se plantea que los síntomas del TEPT están vinculados entre sí, por ejemplo las pesadillas pueden contribuir al insomnio y esto contribuir a la fatiga, lo que puede conducir a una disminución de la concentración y la irritabilidad; así pues, mientras más tiempo pase entre la aparición de los síntomas, el diagnóstico y tratamiento, mayor probabilidad de presentar un TEPT crónico y probablemente con síntomas más severos (Bryant, et al; 2017). Resulta evidente pensar que mientras más oportuno sea el tratamiento más rápido y eficazmente se lograra la remisión del trastorno (Javidi y Yadollahie, 2012).

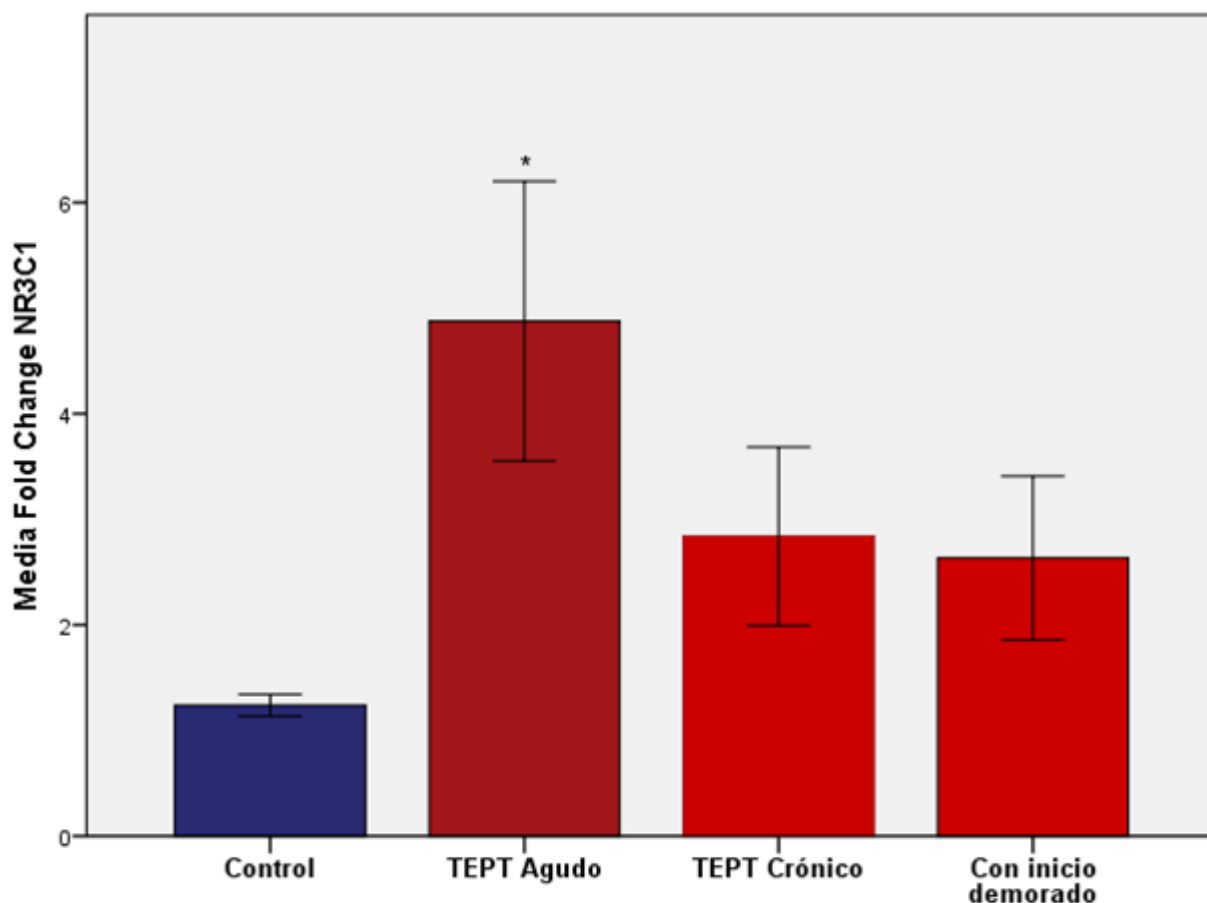


Fig 13. Cambio en la expresión relativa del gen *NR3C1* respecto al inicio de los síntomas. TEPT agudo (3 meses), TEPT crónico (3-6 meses), Con inicio demorado (>6 meses). Se distingue una sobreexpresión en todos los casos, sin embargo sólo el TEPT agudo muestra una sobreexpresión significativa (U de Mann-Whitney, $p < 0.0.1$)

Para analizar si el tiempo con la sintomatología estaba asociado a la expresión del gen *NR3C1* se realizó un modelo de regresión lineal simple. Se observó que existe una correlación negativa ligera entre los años con la sintomatología y la expresión del gen *NR3C1* en pacientes con TEPT ($R^2 = 0.121$, $m = -3.48$), aunque no fue estadísticamente que significativa (regresión lineal, $p = 0.051$). Pese a que estos resultados no fueron significativos, coinciden con la asociación del TEPT agudo al sobre-expresión del gen *NR3C1*, a diferencia del TEPT crónico o de inicio retardado.

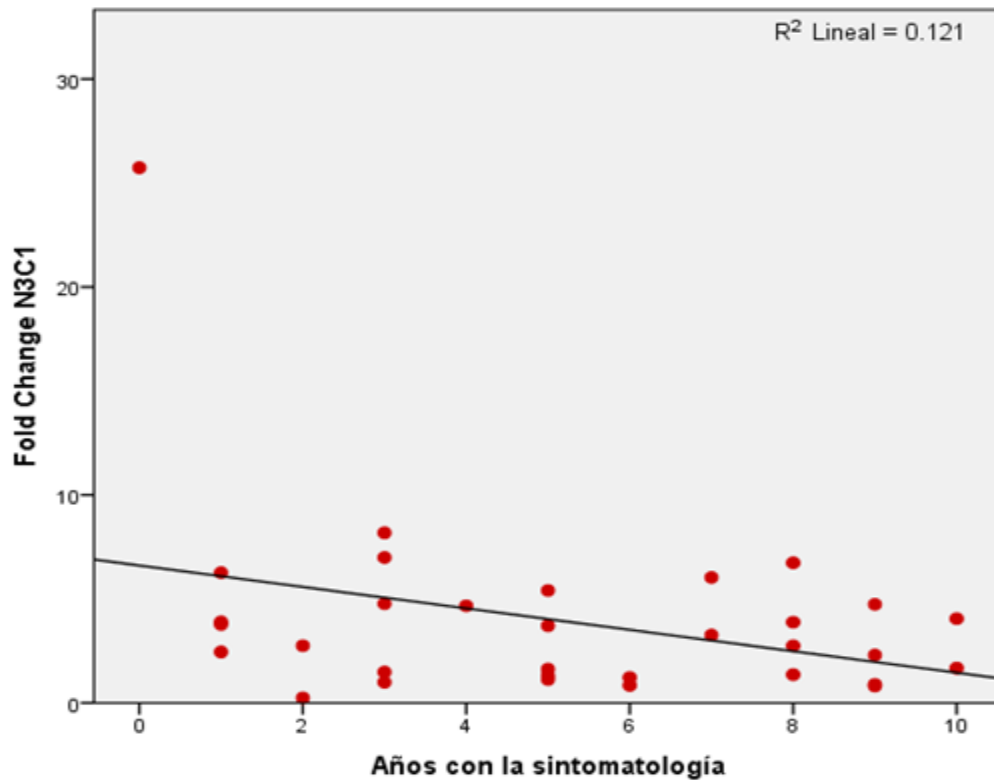


Fig. 14. Cambios en la expresión relativa de la expresión relativa del gen *NR3C1* del grupo de casos con TEPT, en función de los años con sintomatología. $R^2=0.121$, $m= -3.48$, $t= -2.034$, $p=0.051$.

La expresión relativa del gen NR3C1 como biomarcador diagnóstico

Con los datos de expresión del gen *NR3C1*, se construyó una curva ROC para evaluar si la expresión de este gen pudiera ser utilizado como biomarcador diagnóstico (**fig. 15**). El área bajo la curva calculado fue de 0.797 ($p<0.001$), lo cual sugiere que la prueba diagnóstica propuesta en el presente trabajo realmente es apta para discriminar entre individuos con y sin TEPT el 79.7% de las veces (Zweig & Campbell, 1993). Con las coordenadas de la curva ROC, se calculó el índice de Youden (ver sujetos y métodos) para identificar el valor de expresión del gen *NR3C1* que representa una mayor sensibilidad y especificidad. El valor más alto del índice de Youden correspondió a un valor igual o mayor a 2.24, con el cuál se obtiene una sensibilidad del 62.5% y una especificidad del 89.9%. (**Tabla 6**).

Aplicando este valor de corte, el 10.2% de los controles resultaron falsos positivos, pues resultaron con TEPT según su *fold change* en la expresión del gen *NR3C1*, aunque no fueron diagnosticados por el DMS-VI. Por otra parte, el 89.8% resultaron verdaderos negativos, resultando negativos en ambos sistemas de diagnóstico. En cuanto al grupo de casos con TEPT 62.5% de los pacientes resultó como verdaderos positivos, cumpliendo el valor de corte y el diagnóstico según DMS-VI, y mientras que el resto (37.5%) resultaron falsos negativos debido a que su cambio de *foldchange* sugirió que eran individuos sanos, sin embargo fueron diagnosticados según los criterios del DMS-VI como pacientes con TEPT (**Tabla 5**).

Así mismo al evaluar si el test posee la capacidad de diferenciar entre casos de TEPT agudo, crónico y de inicio demorado, sólo mostró capacidad para diferenciar a aquellos pacientes diagnosticados con TEPT agudo, teniendo un 72.2% de verdaderos positivos; mientras que para los pacientes con TEPT crónico/inicio demorado, la prueba no fue capaz de discernir entre pacientes sanos y enfermos, teniendo un 50% de verdaderos positivos, y 50% de verdaderos negativos.

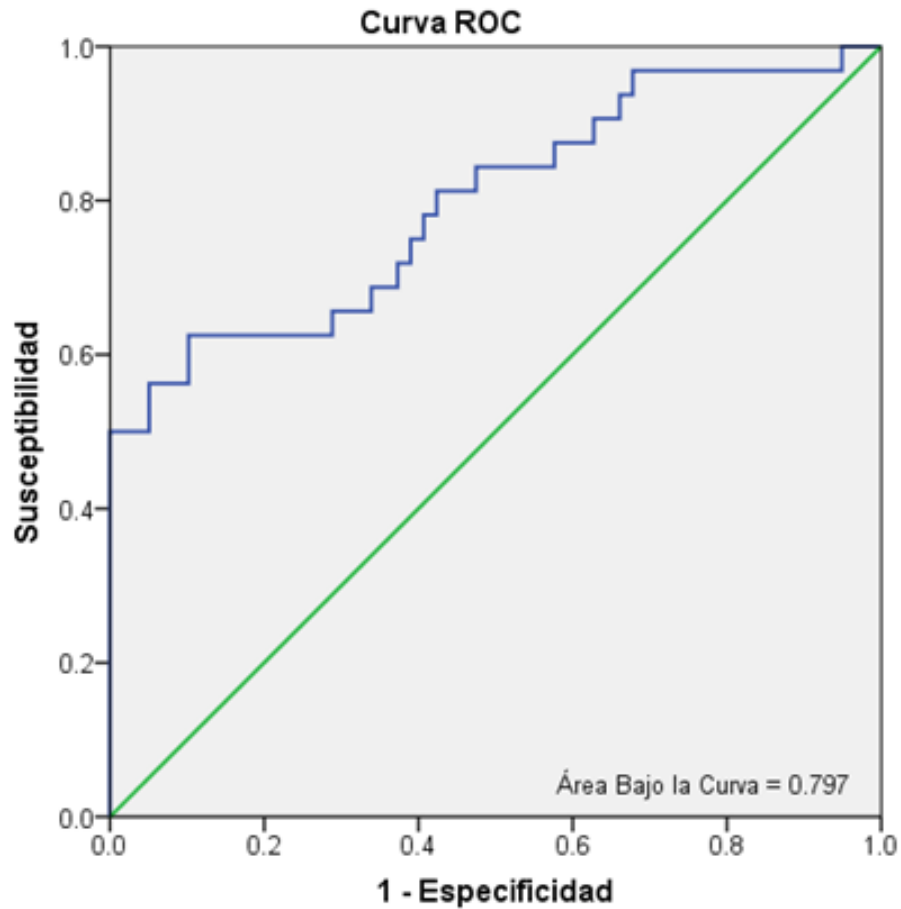


Fig 15. Curva ROC correspondiente al cambio en la expresión relativa del gen *NR3C1*, con un área bajo la curva de 0.797, con un valor máximo de 2.24. Se muestra en el eje de las x (1-especificidad), mientras que en el eje y se muestra la susceptibilidad.

Tabla 5. Valores de la curva ROC

| ROC ¹ | Control n (%) | Caso n (%) |
|------------------|---------------|-------------------------------|
| 1 | 6 (10.2) | 20 (62.5) ^{2, 03, 4} |
| 0 | 53 (89.8) | 12 (37.5) |
| Total | 59 (100) | 32 (100) |

¹ $1 \geq 2.24224386317302$ *Fold Change NR3C1*

² valor de $p < 0.01$

³ RM = 14.7 (4.8- 44.5, 95% IC).

⁴ RM de ROC ajustado por edad y sexo = 12.8 (4.0- 41.4, 95% IC).

A pesar de que la sensibilidad de la prueba diagnóstica propuesta en el presente trabajo es baja (62.5%), se cuenta con una especificidad alta de 89.8%, lo cual permite identificar a los verdades negativos. De igual forma se determinó que el valor predictivo positivo es de 76.9%, mientras que el valor predictivo negativo resultó de 81.5% (**Tabla 6**).

Considerando esto, la prueba podría plantearse como una prueba de tamizaje, en la cual un resultado negativo es 81.5% probable que realmente sea negativo, esperando que al menos el 18.5% sean falsos negativos. Por el contrario 3 de cada 4 individuos con un incremento en la expresión del gen *NR3C1* realmente tendrá TEPT, aunque los resultados deberán corroborarse con una evaluación clínica detallada. Sin embargo, estos resultados deberán corroborarse con otros estudios en una población mayor (Poste et al., 2001).

Tabla 6. Especificidad y sensibilidad del valor de corte propuesto para el cambio en la expresión del gen *NR3C1* como prueba diagnóstica para TEPT.

| <i>NR3C1</i> expresión | Sensibilidad | Especificidad | Valor Predictivo Positivo (VPP) | Valor Predictivo Negativo (VPN) |
|---|--------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Fold Change <i>NR3C1</i> \geq 2.24 | 62.5 | 89.8 | 76.9 | 81.5 |

Finalmente se calculó el riesgo de presentar TEPT al tener un sobre-expresión del gen *NR3C1* mayor a 2.24 inicialmente con una tabla de contingencia. Aquellas personas con niveles de expresión mayores a 2.24 tienen 14.7 veces más riesgo de presentar TEPT en comparación con aquellos individuos que cuya expresión está por debajo de este valor (4.8- 44.5, 95% IC; Tabla 5). Sin embargo, debido a que los casos y los controles no están pareados por edad, se realizó un modelo de regresión logística ajustado por la edad y el sexo. El riesgo para desarrollar TEPT ajustado por edad y sexo fue de 12.8 (4.0- 41.4, IC 95%), cuando se trata de hombres mayores de 30 años. (Breslau et al.,2007. Altz el al 2019).

VII. Conclusiones

Los resultados de los experimentos del presente trabajo indican que existe una asociación entre la sobreexpresión del gen *NR3C1* con el padecimiento de TEPT. Cabe mencionar que la sobreexpresión de este gen está claramente más relacionada el TEPT agudo. La expresión del gen *NR3C1* como prueba diagnóstica presenta una mayor especificidad que sensibilidad, lo cual pudiera ser de utilidad como una prueba de tamizaje, identificando con una alta probabilidad aquellos que no sufren de TEPT. De igual forma si se utiliza para identificar a los pacientes con TEPT agudo, podría significar una detección en menor tiempo, lo que a la larga podría evitar que estos pacientes desarrollan cronicidad y la remisión sea más oportuna; ahorrando así tiempo y recursos en la clínica.

VIII. Perspectivas

Como ya se sabe el trastorno por estrés postraumático es una enfermedad altamente deshabilitante, de la cual muchos de los mecanismos de patogenia son desconocidos o no están del todo claros o descritos. Si bien el test diagnóstico aquí propuesto no es del todo robusto; podría ser una herramienta útil para ayudar en el diagnóstico. Así mismo los estudios genéticos y genómicos de esta enfermedad en población Mexicana son casi inexistentes, aunado a eso los datos sobre prevalencia son escasos y poco actuales. Considerando la condición del país es posible imaginar que los casos en los próximos años aumenten, y entender los mecanismos de este padecimiento serán necesarios para combatir los daños que esta pudiera traer a nuestra sociedad. En el laboratorio de Genética de la Licenciatura de Ciencia Forense se pretende seguir con la presente línea de investigación para elucidar el papel del gen *NR3C1* en el TEPT.

IX. Bibliografía. (Generada con ENDNOTE)

Androutsellis-Theotokis, A., Chrousos, G. P., McKay, R. D., DeCherney, A. H., & Kino, T. (2013). Expression profiles of the nuclear receptors and their transcriptional coregulators during differentiation of neural stem cells. *Horm Metab Res*, 45(2), 159-168. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990992>. doi:10.1055/s-0032-1321789

Association, A. P. (2014). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-V*. Washington D. C.: American Psychiatric Association.

Baker, D. G., West, S. A., Nicholson, W. E., Ekhtor, N. N., Kasckow, J. W., Hill, K. K., . . . Geraciotti, T. D. (1999). Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*, 156(4), 585-588. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200738>. doi:10.1176/ajp.156.4.585

Bell, J. (2004). Predicting disease using genomics. *Nature*, 429(6990), 453-456. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15164070>. doi:10.1038/nature02624

Benjet, C., Guilherme, B., Medina-Mora, M., Enrique, M., Fleiz, C., Estela, R., & Carlos, C. (2009). Diferencias de sexo en la prevalencia y severidad de trastornos psiquiátricos en adolescentes de la Ciudad de México. *Salud Mental*, 32, 155-163. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252009000200008&lng=es&nrm=iso.

Berger, W., Mehra, A., Lenoci, M., Metzler, T. J., Otte, C., Tarasovsky, G., . . . Neylan, T. C. (2010). Serum brain-derived neurotrophic factor predicts responses to escitalopram in chronic posttraumatic stress disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(7), 1279-1284. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643177>. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.07.008

Bockmühl, Y., Murgatroyd, C. A., Kuczynska, A., Adcock, I. M., Almeida, O. F., & Spengler, D. (2011). Differential regulation and function of 5'-untranslated GR-exon 1 transcripts. *Mol Endocrinol*, 25(7), 1100-1110. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527501>. doi:10.1210/me.2010-0436

Bremner, J. D., Licinio, J., Darnell, A., Krystal, J. H., Owens, M. J., Southwick, S. M., . . . Charney, D. S. (1997). Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*, 154(5), 624-629. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137116>. doi:10.1176/ajp.154.5.624

Breslau, N., & Anthony, J. C. (2007). Gender differences in the sensitivity to posttraumatic stress disorder: An epidemiological study of urban young adults. *J*

Abnorm Psychol, 116(3), 607-611. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696716>. doi:10.1037/0021-843X.116.3.607

Breslau, N., Chilcoat, H. D., Kessler, R. C., Peterson, E. L., & Lucia, V. C. (1999). Vulnerability to assaultive violence: further specification of the sex difference in post-traumatic stress disorder. *Psychol Med*, 29(4), 813-821. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473308>.

Brewin, C. R., Cloitre, M., Hyland, P., Shevlin, M., Maercker, A., Bryant, R. A., . . . Reed, G. M. (2017). A review of current evidence regarding the ICD-11 proposals for diagnosing PTSD and complex PTSD. *Clin Psychol Rev*, 58, 1-15. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029837>. doi:10.1016/j.cpr.2017.09.001

Bruenig, D., Mehta, D., Morris, C. P., Harvey, W., Lawford, B., Young, R. M., & Voisey, J. (2017). Genetic and serum biomarker evidence for a relationship between TNF α and PTSD in Vietnam war combat veterans. *Compr Psychiatry*, 74, 125-133. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28160694>. doi:10.1016/j.comppsy.2017.01.015

Bryant, R. A., Creamer, M., O'Donnell, M., Forbes, D., McFarlane, A. C., Silove, D., & Hadzi-Pavlovic, D. (2017). Acute and Chronic Posttraumatic Stress Symptoms in the Emergence of Posttraumatic Stress Disorder: A Network Analysis. *JAMA Psychiatry*, 74(2), 135-142. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28002832>. doi:10.1001/jamapsychiatry.2016.3470

Carvajal, C. (2002). Posttraumatic stress disorder : clinical profile. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 40, 20-34. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272002000600003>

Chrousos, G. P., & Kino, T. (2005). Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE*, 2005(304), pe48. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16204701>. doi:10.1126/stke.3042005pe48

Cohen, H., Kozlovsky, N., Savion, N., Matar, M. A., Loewenthal, U., Loewenthal, N., . . . Kaplan, Z. (2009). An association between stress-induced disruption of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and disordered glucose metabolism in an animal model of post-traumatic stress disorder. *J Neuroendocrinol*, 21(11), 898-909. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732290>. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01913.x

Costa, J. M., Ernault, P., Olivi, M., Gaillon, T., & Arar, K. (2004). Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR. *Clin Biochem*, 37(10), 930-932. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369726>. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.020

Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E., & Berg, R. H. (1992). Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *Journal of the American Chemical Society*, 114(5), 1895-1897. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/ja00031a062>. doi:10.1021/ja00031a062

Encuesta Nacional de Victimización y Percepción Sobre la Seguridad Pública. (2017). Retrieved from

Forman, H. V., Cook, M. J., Cynthia, F., Bradley, G., Palmieri, W. R., Carla, B., . . . Joshua, G. (2018). Psychological and Pharmacological Treatments for

Adults With Posttraumatic Stress Disorder: A Systematic Review Update. *Comparative*

Effectiveness Review No. 207. In.

Fujikawa, T., Soya, H., Fukuoka, H., Alam, K. S., Yoshizato, H., McEwen, B. S., & Nakashima, K. (2000). A biphasic regulation of receptor mRNA expressions for growth hormone, glucocorticoid and mineralocorticoid in the rat dentate gyrus during acute stress. *Brain Res*, 874(2), 186-193. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960603>.

Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Ehrhart-Bornstein, M., . . . Bornstein, S. R. (2002). Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J*, 16(1), 61-71. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772937>. doi:10.1096/fj.01-0245com

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013a). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133(3), 1-4. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399825>. doi:10.1038/jid.2013.1

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013b). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133(3), 1-4. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399825>. doi:10.1038/jid.2013.1

Gell, C., Brockwell, D., & Smith, A. (2006). *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy* (O. U. Press Ed.).

Gill, J., Vythilingam, M., & Page, G. G. (2008). Low cortisol, high DHEA, and high levels of stimulated TNF-alpha, and IL-6 in women with PTSD. *J Trauma Stress*, 21(6), 530-539. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19107725>. doi:10.1002/jts.20372

Girgenti, M. J., & Duman, R. S. (2017). Transcriptome Alterations in Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*, 83(10), 840-848. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.023>. doi:10.1016/j.biopsych.2017.09.023

Godbey, W. T. (2014). Fluorescence. *The Science, Technology and Medical Applications*, 173-186.

Gola, H., Engler, A., Morath, J., Adenauer, H., Elbert, T., Kolassa, I. T., & Engler, H. (2014). Reduced peripheral expression of the glucocorticoid receptor α isoform in individuals with posttraumatic stress disorder: a cumulative effect of trauma burden. *PLoS One*, 9(1), e86333. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466032>. doi:10.1371/journal.pone.0086333

Gupta, D., & Morley, J. E. (2014). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis and Aging. *Comprehensive Physiology*, 4, 1495-1510.

Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., . . . Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol*, 6(2), 603-621. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065163>. doi:10.1002/cphy.c150015

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4), 413-417. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1368485>.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7276-7280. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1871133>.

Javidi, H., & Yadollahie, M. (2012). Post-traumatic Stress Disorder. *Int J Occup Environ Med*, 3(1), 2-9. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022845>.

Keller, S. M., Schreiber, W. B., Staib, J. M., & Knox, D. (2015). Sex differences in the single prolonged stress model. *Behavioural brain research*, 286, 29-32.

Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives Of General Psychiatry* 62, 593–602. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.593>. doi:10.1001/archpsyc.62.6.593

Kino, T. (2015). Glucocorticoid Receptor. In D. G. L.J., C. G., & D. K. (Eds.), *ENDOTEXT Comprehensive Endocrinology Book*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279171/?report=classic>

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., . . . Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-

3), 95-125. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460794>. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007

Labonté, B., Azoulay, N., Yerko, V., Turecki, G., & Brunet, A. (2014). Epigenetic modulation of glucocorticoid receptors in posttraumatic stress disorder. *Transl Psychiatry*, 4, e368. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24594779>. doi:10.1038/tp.2014.3

Laterza, O. F., Hendrickson, R. C., & Wagner, J. A. (2007). Molecular Biomarkers. *Drug Information Journal*, 41, 573-585. Retrieved from <https://doi.org/10.1177/009286150704100504>. doi:10.1177/009286150704100504

Liberzon, López, Flagel, Vázquez, & Young. (1999). Differential Regulation of Hippocampal Glucocorticoid Receptors mRNA and Fast Feedback: Relevance to Post-Traumatic Stress Disorder. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(1), 11-17.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>. doi:10.1006/meth.2001.1262

Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2004). The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci*, 1024, 102-123. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265776>. doi:10.1196/annals.1321.008

Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell*, 18(3), 331-342. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866175>. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.025

Maron, E., Lan, C. C., & Nutt, D. (2018). Imaging and Genetic Approaches to Inform Biomarkers for Anxiety Disorders, Obsessive-Compulsive Disorders, and PTSD. *Curr Top Behav Neurosci*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29796838>. doi:10.1007/7854_2018_49

Mason, J. W., Giller, E. L., Kosten, T. R., Ostroff, R. B., & Podd, L. (1986). Urinary free-cortisol levels in posttraumatic stress disorder patients. *J Nerv Ment Dis*, 174(3), 145-149. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3950596>.

Matić, G., Milutinović, D. V., Nestorov, J., Elaković, I., Jovanović, S. M., Perišić, T., . . . Savić, D. (2013). Lymphocyte glucocorticoid receptor expression level and hormone-binding properties differ between war trauma-exposed men with and without PTSD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 43, 238-245. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333536>. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.01.005

Medina-Mora, M., Lara, C., Ramos Lira, L., Zambrano, J., Fleiz, C., & Borges Guimaraes, G. (2005). Prevalencia de sucesos violentos y de trastorno por estrés

postraumático en la población mexicana. *Salud Pública de México*, 47, 8-22. doi:10.1590/s0036-36342005000100004

Medina-Mora, M. E., Borges, G., Lara Munoz, C., Benjet, C., Blanco Jaimes, J., Fleiz Bautista, C., . . . Aguilar, G. (2003). Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. Retrieved from http://revistasaludmental.mx/index.php/salud_mental/article/view/956.

Miranda, O. (2017). Sex and gender differences in post-traumatic stress disorder: an update. In (Vol. 8): *European Journal of Psychotraumatology*.

Molecular Diagnostics: Current Research and Applications. (2014). (J. Huggett & O. G. Justin Eds.): Caister Academic Press.

México, S. d. G. d. (20188). Víctimas de Delitos del Fuero Común. In.

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1(3), 1559-1582. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406449>. doi:10.1038/nprot.2006.236

Nygren, J., Svanvik, N., & Kubista, M. (1998). The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers*, 46(1), 39-51. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612138>. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199807)46:1<39::AID-BIP4>3.0.CO;2-Z

Pietrzak, R. H., Goldstein, R. B., Southwick, S. M., & Grant, B. F. (2011). Prevalence and Axis I comorbidity of full and partial posttraumatic stress disorder in the United States: results from Wave 2 of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Anxiety Disord*, 25(3), 456-465. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21168991>. doi:10.1016/j.janxdis.2010.11.010

Pieyezal, R. H., Goldstein, R. B., Southwick, S. M., & Grant, B. F. (2011). Prevalence and Axis I comorbidity of full and partial posttraumatic stress disorder in the United States: results from Wave 2 of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Anxiety Disord*, 25(3), 456-465.

Pinna, G. (2018). Biomarkers for PTSD at the Interface of the Endocannabinoid and Neurosteroid Axis. *Front Neurosci*, 12, 482. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30131663>. doi:10.3389/fnins.2018.00482

Poste, G. (2001). Molecular diagnostics: a powerful new component of the healthcare value chain. *Expert Rev Mol Diagn*, 1(1), 1-5. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901792>.

Presul, E., Schmidt, S., Kofler, R., & Helmberg, A. (2007). Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human

glucocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol*, 38(1-2), 79-90. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242171>. doi:10.1677/jme.1.02183

Publishing, A. P. (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR*. In (4th ed.). 1400 K Street, N.W., Washington, DC.

Roberts, N. P., Roberts, P. A., Jones, N., & Bisson, J. I. (2015). Psychological interventions for post-traumatic stress disorder and comorbid substance use disorder: A systematic review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev*, 38, 25-38. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25792193>. doi:10.1016/j.cpr.2015.02.007

Salud, S. N. d. (2011). *Guía Práctica Clínica: Diagnóstico y manejo del Estrés Postraumático*. In.

Schmidt, U., Kaltwasser, S. F., & Wotjak, C. T. (2013). Biomarkers in posttraumatic stress disorder: overview and implications for future research. *Dis Markers*, 35(1), 43-54. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167348>. doi:10.1155/2013/835876

Scientific, T. How Taqman Assays Work. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>

Simsek, S., Uysal, C., Kaplan, I., Yuksel, T., & Aktas, H. (2015). BDNF and cortisol levels in children with or without post-traumatic stress disorder after sustaining sexual abuse. *Psychoneuroendocrinology*, 56, 45-51. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25800148>. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.02.017

Sjöback, R., Nygren, J., & Kubista, M. (1995). Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(6), L7-L21.

Spivak, B., Shohat, B., Mester, R., Avraham, S., Gil-Ad, I., Bleich, A., . . . Weizman, A. (1997). Elevated levels of serum interleukin-1 β in combat-related posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, 42(5), 345 - 348.

Sunde, R. A. (2010). mRNA transcripts as molecular biomarkers in medicine and nutrition. *J Nutr Biochem*, 21(8), 665-670. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303730>. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.11.012

Survey, N. C. (2005). NCS-R appendix tables. In T. a. L. p. o. D.-I. W.-C. d. b. s. a. c. T. T.-m. p. o. D.-I. W.-C. d. b. s. a. cohort. (Ed.).

Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR

efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*, 3, 9-16. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077029>. doi:10.1016/j.bdq.2015.01.005

Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, 53(4), 865-871. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377295>.

Turner, J. D., & Muller, C. P. (2005). Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol*, 35(2), 283-292. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216909>. doi:10.1677/jme.1.01822

Ursano, R. J., Bell, C., Eth, S., Friedman, M., Norwood, A., Pfefferbaum, B., . . . Yager, J. (2004). Practice guideline for the treatment of patients with acute stress disorder and posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*, 161(11 Suppl), 3-31.

van Zuiden, M., Geuze, E., Willemen, H. L., Vermetten, E., Maas, M., Amarouchi, K., . . . Heijnen, C. J. (2012). Glucocorticoid receptor pathway components predict posttraumatic stress disorder symptom development: a prospective study. *Biol Psychiatry*, 71(4), 309-316. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137507>. doi:10.1016/j.biopsych.2011.10.026

van Zuiden, M., Geuze, E., Willemen, H. L., Vermetten, E., Maas, M., Heijnen, C. J., & Kavelaars, A. (2011). Pre-existing high glucocorticoid receptor number predicting development of posttraumatic stress symptoms after military deployment. *Am J Psychiatry*, 168(1), 89-96. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21078706>. doi:10.1176/appi.ajp.2010.10050706

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060372>. doi:10.2144/05391RV01

Yehuda, R., Bierer, L. M., Schmeidler, J., Aferiat, D. H., Breslau, I., & Dolan, S. (2000). Low cortisol and risk for PTSD in adult offspring of holocaust survivors. *Am J Psychiatry*, 157(8), 1252-1259. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910787>. doi:10.1176/appi.ajp.157.8.1252

Yoon, S., & Kim, Y.-K. (2018). Neuroendocrinological treatment targets for posttraumatic stress disorder. In *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*.

Zaba, M., Kirmeier, T., Ionescu, I. A., Wollweber, B., Buell, D. R., Gall-Kleebach, D. J., . . . Schmidt, U. (2015). Identification and characterization of HPA-axis reactivity endophenotypes in a cohort of female PTSD patients. *Psychoneuroendocrinology*,

55, 102-115. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25745955>.
doi:10.1016/j.psyneuen.2015.02.005

Zweig, M. H., & Campbell, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*, 39(4), 561-577. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/847234>