



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN CIENCIAS, CAMPO DEL CONOCIMIENTO DE LAS CIENCIAS MÉDICAS

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA 'RAMÓN DE LA FUENTE'

**EFFECTO DE LA FLUOXETINA SOBRE EL NIVEL SÉRICO DEL BDNF, Y LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE BDNF  
Y CREB EN LEUCOCITOS DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DUAL DE DEPENDENCIA A ALCOHOL Y  
TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR**

Tesis que para Optar por el Grado de:

Maestría en Ciencias Médicas

**Presenta.**

Dr. Edén Cristian Sánchez Rosas

**Tutor Principal.**

Dr. Carlos Sabás Cruz Fuentes

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**México D.F., Enero 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Índice

INTRODUCCIÓN.....	3
EPIDEMIOLOGÍA.....	3
ANTECEDENTES.....	4
A) NEUROBIOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN.....	5
B) NEUROBIOLOGÍA DE LA DEPENDENCIA AL ALCOHOL.....	8
C) NEUROBIOLOGÍA DE LA COMORBILIDAD DEPENDENCIA AL ALCOHOL-DEPRESIÓN...11	
D) EL TRATAMIENTO CON ANTIDEPRESIVOS EN LOS PACIENTES ALCOHÓLICOS- DEPRIMIDOS.....	12
E) CÉLULAS SANGUÍNEAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS COMO MARCADOR BIOLÓGICO.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
A) PRINCIPAL.....	19
B) SECUNDARIOS.....	19
METODOLOGÍA GENERAL.....	19
A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	19
B) CONFORMACIÓN DE GRUPO.....	20
C) EVALUACIÓN DE LOS SUJETOS.....	20
D) VARIABLES DEL ESTUDIO.....	22
E) ESQUEMA FARMACOLÓGICO.....	23
F) OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	23
I. Obtención de la muestra sanguínea.....	23
II. Análisis de la expresión de los genes candidatos.....	24
III. Amplificación por RT-PCR.....	24
IV. Medición de los niveles séricos de BDNF.....	25
G) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
H) CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	26
RESULTADOS.....	26
A) CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS BASALES.....	26
B) CAMBIO EN LA INTENSIDAD DE LOS SÍNTOMAS Y EL TIPO RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO.....	27
C) CAMBIOS EN LOS NIVELES SÉRICOS DEL BDNF Y DE LA EXPRESIÓN DEL GEN CREB.....	28
D) CORRELACIONES DE LAS VARIABLES DE DEPRESIÓN Y ALCOHOLISMO CON LOS NS DE BDNF Y LA EXPRESIÓN DEL GEN CREB.....	28
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	33
CUADROS Y GRÁFICAS.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	41

## **Introducción**

El diagnóstico dual se refiere a la comorbilidad o la coexistencia de un trastorno por uso de sustancias psicoactivas y de otro trastorno psiquiátrico en el mismo sujeto. En el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV-TR) de la Asociación Psiquiátrica Americana se reconoce que el trastorno depresivo puede ser inducido por el alcohol, sin embargo, no especifica una relación causal en sentido opuesto.<sup>15,58</sup>

En adición a lo anterior, los estudios epidemiológicos si han demostrado que la presencia de depresión aumenta el riesgo de presentar un trastorno por uso de sustancias, y viceversa. Por ejemplo, el riesgo de tener depresión en sujetos con un trastorno por uso de sustancias es de 1.4-2.9, y el riesgo específico de manifestar alcoholismo en sujetos con depresión es de 1.3-3.8.<sup>56,57</sup>

Un aspecto particularmente relevante para este trabajo de tesis es el hecho de que en la depresión y el alcoholismo, existen cambios neuroadaptativos tanto agudos como crónicos, cuya representación clínica posterior incluye un conjunto de síntomas físicos, cognitivos y del estado de ánimo. En éste sentido, tanto al factor de transcripción génica CREB (*cAMP Response Element-Binding*; elemento de unión en respuesta a AMPc), como a uno de sus genes blanco, el BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*; factor de crecimiento derivado del cerebro), se les han relacionado como algunos de los mediadores más destacados de la respuesta de adaptación neuronal alterada en la fisiopatología de los dos trastornos.<sup>1,4,5,6,7,8,12,13</sup>

Por otra parte, la información sobre el efecto terapéutico de los antidepresivos en ésta comorbilidad se ha limitado a la evaluación de la respuesta clínica, siendo consistentemente favorable para la depresión pero menos sólida para el control del consumo del alcohol. Recientemente se ha documentado que los cambios en la actividad del gen CREB y en genes blanco como el BDNF podrían tener una relación, no solo en la fisiopatología, sino también, con la respuesta clínica por el uso de tratamientos con antidepresivos.<sup>29,11,45</sup>

Es por ello que en este trabajo decidimos abordar la exploración de la expresión de estos genes en los linfocitos y de sus productos proteicos en el suero, en un intento de que los datos obtenidos pudieran servir como un modelo paralelo o *proxy* al estudio directo de la patología en el cerebro y la respuesta a los tratamientos.<sup>32,33</sup>

## **Epidemiología**

Tanto los trastornos por uso de sustancias por un lado, como los trastornos afectivos por otro constituyen de forma individual importantes problemas de salud pública, con importantes costos que incluyen su tratamiento, los problemas de salud asociados, el ausentismo laboral, la pérdida de la productividad, y en el caso de aquellos con potencial farmacológico adictivo la transgresión de normas y encarcelamiento, así como las intervenciones en educación y prevención. Más aun la coexistencia de los trastornos del estado de ánimo y por uso de alcohol es una situación clínica frecuente que hace más difícil su tratamiento.<sup>10,59</sup>

Según las encuestas epidemiológicas denominadas *Epidemiological Catchment Area Study* (ECA) y la *National Comorbidity Survey* (NCS) realizadas en los Estados Unidos, los pacientes con un diagnóstico psiquiátrico mayor y un trastorno por uso de sustancias presentes de forma concomitante constituyen del 30 al 50% de la población psiquiátrica general y en más del 80% de la población consumidora de sustancias existe algún trastorno psiquiátrico. En términos generales, la Organización Mundial de la Salud, estima que dos tercios de la población consumidora de sustancias cursa con algún grado de psicopatología y un tercio de la población psiquiátrica consume sustancias psicoactivas, y para el año 2025 será de dos tercios.<sup>9,57</sup>

Los hallazgos reportados por el Consorcio Internacional en Epidemiología Psiquiátrica mostraron que el riesgo (OR's) de presentar la comorbilidad entre un trastorno por uso de alcohol y cualquier trastorno afectivo fue de 1.2 para el uso, 2.5 para el abuso y 2.4 para la dependencia. Datos que fueron semejantes entre México y otros países, a pesar de las diferencias culturales, políticas y económicas.<sup>71</sup>

En México, los datos de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica señalan que la coexistencia de los dos trastornos mentales en una tercera parte de las personas con abuso o dependencia de sustancias. Más aún en ésta misma encuesta se destaca a la depresión y a la dependencia al alcohol como dos de las tres enfermedades mentales más prevalentes en nuestro país; sin embargo, no hay datos más específicos de ésta comorbilidad.<sup>2</sup>

### **Antecedentes**

Los mecanismos responsables del reforzamiento positivo y negativo inducido por la administración crónica de una sustancia y los mecanismos causantes de la depresión pueden tener puntos semejantes, ya que en ambos se presenta una base neuroadaptativa común importante. Definir el proceso concreto responsable de las alteraciones sintomatológicas motivacionales no resulta fácil, ni a nivel clínico ni a nivel experimental; sin embargo, el intentar explorar los elementos neurobiológicos comunes de la

dependencia al alcohol y la depresión puede resultar de interés inicial para, en un futuro, llegar a delimitar la fisiopatología del diagnóstico dual.<sup>10</sup>

### **a) Neurobiología de la depresión**

A lo largo del tiempo se han descrito múltiples alteraciones biológicas asociadas a la presentación de la depresión. Hasta hace poco, los neurotransmisores monoaminérgicos (e.g. la noradrenalina, la dopamina, la serotonina o la histamina) y el sistema de regulación hormonal asociado al estrés crónico (el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal) eran los principales centros de atención en investigación sobre la etiología de estos trastornos, sin embargo, se ha ido haciendo un desplazamiento progresivo desde las alteraciones de cada uno de los sistemas por separado hacia el estudio de sistemas neuroconductuales, circuitos neurales y mecanismos neuroreguladores más complejos.<sup>17</sup> (FIGURA 1)

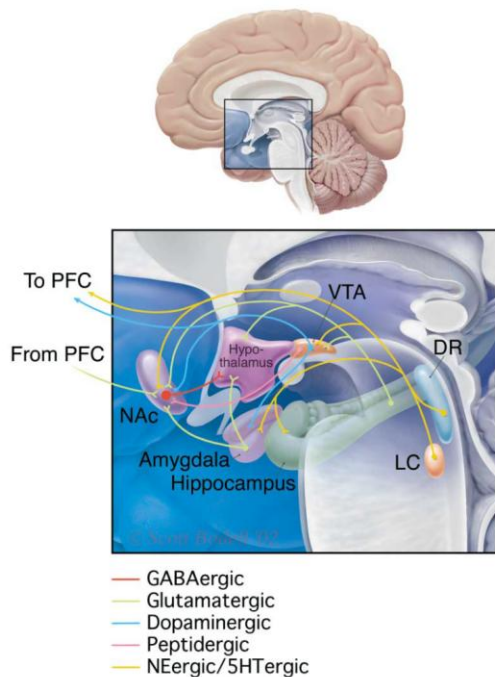


FIGURA 1. La figura muestra un resumen altamente simplificado de las series de circuitos neuronales en el cerebro que podrían contribuir con los síntomas depresivos. Mientras mucha de la investigación en el campo de la depresión se ha centrado en el hipocampo (HP) y corteza frontal (corteza pre-frontal, CPF), hay un aumento en estudios relacionados con sitios de recompensa, miedo y motivación. Estos incluyen el núcleo accumbens (NAc), amígdala e hipotálamo. La figura muestra un subconjunto de las múltiples interconexiones entre estas regiones mencionadas. El área tegmental ventral (VTA) provee un estímulo dopaminérgico al NAc, amígdala, CPF y otras estructuras límbicas. La noradrenalina (desde el locus coeruleus, LC) y serotonina (desde el rafe dorsal, RD, y otros núcleos del rafe) inervan todas las regiones. En adición, existen fuertes conexiones entre el hipotálamo y la vía VTA-NAc. Tomado de Nestler (2002).

La actividad en la señalización intracelular ha sido una propuesta reciente como mecanismo relacionado a la fisiopatología de la depresión, que aún está en camino de ser mayormente explorada. La unión de un neurotransmisor a un receptor post-sináptico inicia la actividad de algunas cascadas de segundos mensajeros. Específicamente, esto se logra a través de receptores acoplados a proteínas G que cuentan

con efectores o enzimas intracelulares (e.g. la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C y la fosfodiesterasa) que regulan la utilización de energía y la formación de segundos mensajeros, como los nucleótidos cíclicos (e.g. el AMPc y GMPc), además de los fosfatidilinositoles (e.g. el trifosfato de inositol y el diacilglicerol) y la calcio-calmodulina. Entre otras múltiples actividades, éstos segundos mensajeros regulan la función de factores de transcripción (como el CREB) que posteriormente inducirán cambios en la expresión de genes blanco, como los factores neurotróficos (como el BDNF).<sup>17</sup>

Una formulación también reciente propone a los factores neurotróficos como una parte sustancial de la etiología de la depresión. Los factores neurotróficos fueron inicialmente descritos como factores reguladores del crecimiento y diferenciación durante el desarrollo, pero ahora se reconoce que son potentes reguladores de plasticidad y supervivencia de la glía y las neuronas adultas. En la '*hipótesis neurotrófica*' de la depresión un soporte neurotrófico inadecuado durante el desarrollo del cerebro podría originar una desorganización estructural con redes neuronales subóptimas, de forma tal que sobre este soporte neurotrófico inadecuado pudiera subyacer el mecanismo que lleve a la disminución de la capacidad del cerebro para adaptarse a cambios y aumente la vulnerabilidad al daño.<sup>66</sup>

En este sentido, cabe subrayar el papel del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) como el más prevalente de los miembros de la familia de neurotrofinas, y al cual se ha reconocido como un factor que regula un amplio repertorio de funciones incluyendo supervivencia neuronal, migración, diferenciación fenotípica, crecimiento axonal y dendrítico, y formación sináptica. El estrés agudo y crónico disminuye los niveles de expresión del BDNF en el giro dentado y la capa de células piramidales del hipocampo de roedores. Esta reducción parece estar mediada parcialmente por la vía de glucocorticoides inducidos por estrés y parcialmente por otros mecanismos como el aumento en transmisión serotoninérgica inducida por estrés. En sentido opuesto, la administración crónica (pero no la aguda) de todas las clases de antidepresivos aumenta la expresión del BDNF en estas regiones, y puede prevenir la disminución en los niveles de BDNF inducida por estrés.<sup>5</sup> La evidencia que los antidepresivos aumentan los niveles de BDNF en el hipocampo también existe en los humanos.<sup>14</sup> La inducción del BDNF por antidepresivos es mediada, al menos parcialmente, por la vía del factor de transcripción CREB (*CREB, cAMP-response element binding protein*). Estos hallazgos en conjunto elevan la posibilidad de que la regulación a la alza del BDNF inducida por antidepresivos podría ayudar a reparar alguno de los daños inducidos por estrés en las neuronas hipocámpales y proteger neuronas vulnerables de daño futuro.<sup>6</sup>

(FIGURA 2)

Por lo tanto, la hipótesis neurotrófica de la depresión postula que los niveles reducidos del BDNF pueden contribuir a la atrofia y a la pérdida celular en el hipocampo y en la corteza prefrontal, como se ha observado en sujetos deprimidos, mientras que los antidepresivos pueden ejercer su efecto terapéutico por aumento en la expresión del BDNF, originando de ese modo un efecto de reversa en la atrofia y en la muerte celular.<sup>4,5,6,7</sup>

En suma, existe una evidencia creciente que muestra que los niveles séricos de BDNF se encuentran disminuidos en los sujetos con trastorno depresivo, y también, existe evidencia fuerte y consistente que estos niveles aumentan después del tratamiento con antidepresivos. (TABLA 1) Estos hallazgos son de gran interés si los relacionamos con la contraparte de evidencia que ha asociado al BDNF en la fisiopatología de la depresión y como un posible mecanismo de acción de los antidepresivos.<sup>28</sup>

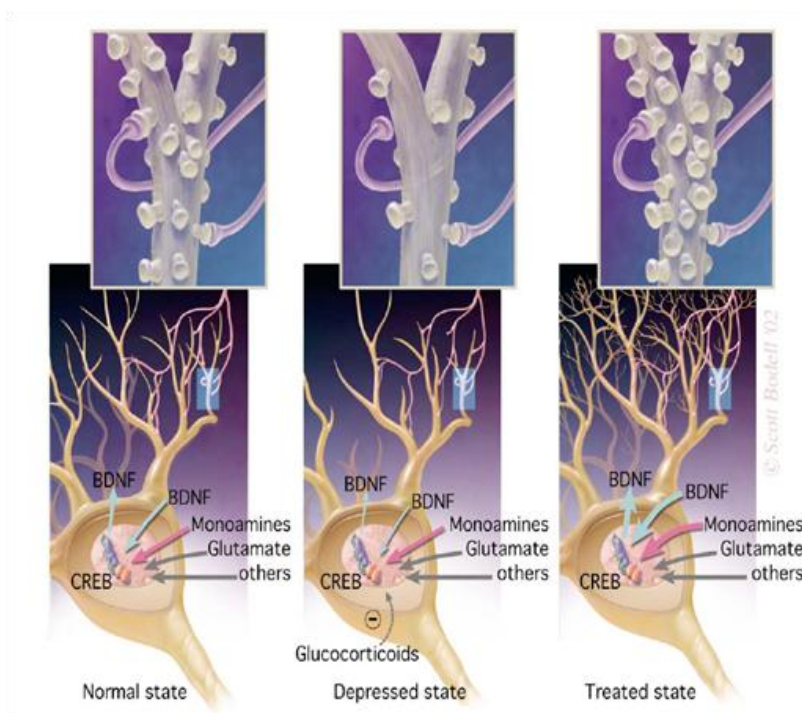


FIGURA 2. A la izquierda se muestra una neurona piramidal de hipocampo normal y su innervación por neuronas monoaminérgicas, glutamatergicas y otras. También se muestra su regulación por BDNF. En medio, el estrés severo origina varios cambios, incluyendo una reducción en la arborización dendrítica y una reducción en la expresión del BDNF. La reducción del BDNF es parcialmente mediada por el exceso de glucocorticoides que puede interferir con los mecanismos de transcripción normales (p.ej: CREB) que controla en parte a la expresión del BDNF. A la derecha, se muestra como los antidepresivos producen el efecto opuesto al aumentar la arborización dendrítica y expresión del BDNF hipocampal. El efecto final parecería ser mediado parcialmente por activación de CREB. Tomado de Nestler et al. (2002).



**TABLA 1. Niveles séricos de BDNF ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) antes y después del tratamiento AD**

		Pre-tratamiento		Post-tratamiento	
		n	BDNF	n	BDNF
Huang (2007)	ISRS y venlafaxina	79	10.7	79	12
Piccinni (2008)	ISRS y ATC	15	19.3	7	18.8
Yoshimura (2007)	<b>Paroxetina</b> y milnacipran	42	9.5	42	17.7
Aydemir (2007)	<b>Escitalopram</b>	20	27.7	20	38.6
Gervasoni (2005)	<b>Paroxetina</b> , venlafaxina, clomipramina y litio	26	22.6	26	24.4
Gonul (2005)	ISRS y venlafaxina	28	20.8	28	33.3
Aydemir (2006)	Venlafaxina	10	17.9	10	34.6
Hellweg (2008)	Amitriptilina y <b>paroxetina</b>	40	13.1	40	13.6

### **b) Neurobiología de la dependencia al alcohol**

Las bases neurobiológicas para el efecto motivacional de la dependencia al alcohol incluye eventos de adaptación neuroquímica en el sistema cerebral normalmente usado para la homeostasis emocional. La clave de esta hipótesis es la observación de que durante la abstinencia aguda al alcohol, existe un compromiso en el sistema de recompensa cerebral, como se refleja en un aumento de los umbrales de recompensa, y que está en sentido opuesto a la acción de disminución del umbral del efecto agudo del alcohol.

Los cambios en la neurotransmisión (e.g. en los sistemas GABAérgico, opioide, dopaminérgico, serotoninérgico y en el glutamatérgico) relacionados al efecto de reforzamiento de una sustancia podrían representar algunas de estas adaptaciones neuroquímicas con significancia en los estados motivacionales para el desarrollo de la dependencia. Por sí mismo, el alcohol también es un fuerte modulador del sistema de estrés, y la disregulación inducida por este ha sido sugerida como otra alteración relacionada al desarrollo de la dependencia y la posibilidad de presentar recaídas.<sup>16,68</sup>

Igual que en la depresión, se ha ido detallando gradualmente más en el estudio de otras alteraciones en mecanismos neuro-reguladores más complejos. Recientemente se ha señalado un mecanismo en el que el alcohol induce cambios funcionales a través modificar la expresión de genes blanco relevantes por medio

de varios sistemas en los que interviene la proteína CREB. Por ejemplo, Koob y Le Moal (2006) describieron que el alcohol bloquea la recaptura de adenosina por inhibición del ENT-1 (*equilibrative nucleoside transporter-1*), con un aumento subsecuente de la adenosina extracelular y la promoción de la activación del receptor de adenosina A2. La activación de éste receptor activa el sistema de CREB (*CREB, cAMP-response element binding protein*) por múltiples cascadas de los sistema de segundos mensajeros cAMP-PKA. Al final, esta activación puede generar cambios en la expresión de genes por estimulación de la transcripción por la proteína CREB. En la FIGURA 3 se muestran otras cascadas de segundos mensajeros involucradas en la respuesta celular al alcohol y en la activación final del CREB por fosforilación.<sup>11</sup>

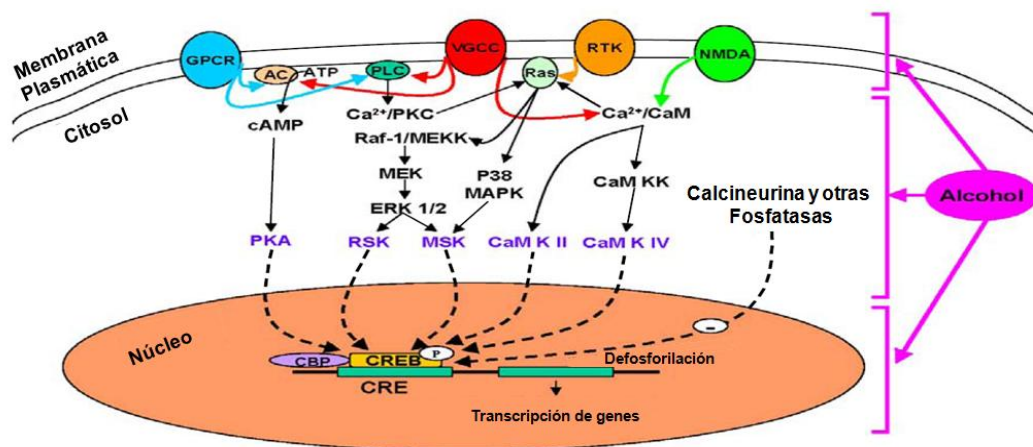


FIGURA 3. Regulación de la función del CREB por varias vías de señalización. Modulación por receptores acoplados a proteínas G (GPCR), canales de voltaje dependientes de Ca<sup>+</sup> (VGCC), receptores de tirosin kinasa (rTk) y N-metil-D-aspartato (NMDA) que origina alteración en la función de las cinasas; la proteína cinasa A (PKA), la cinasa de regulación extracelular (ERK 1/2), MAPK y calmodulin cinasas (CaM K). Todas estas cinasas activan al CREB por fosforilación. Tomado de Pandey SC (2004).

Koob y Le Moal (2006) refieren que a largo plazo, la administración repetida de alcohol aumenta la actividad de la protein cinasa A y traslada la subunidad catalítica de la PKA al núcleo celular, sugiriendo un mecanismo por el cual el alcohol puede prolongar la fosforilación de CREB y promover los cambios inducidos por alcohol en la expresión génica. Se ha pensado que una expresión génica persistente, incluso después de la degradación del cAMP, puede explicar como una simple exposición al alcohol cambia la función sináptica de GABA durante varios días. Debido a que también hay sinergia a nivel de segundos mensajeros entre la activación del receptor A2 por el alcohol y el bloqueo de la captación de adenosina, y por un agonismo dopaminérgico relacionado a la activación del receptor de dopamina D2, se ha

hipotetizado que las neuronas en el NAc pueden llegar a volverse hipersensibles al alcohol con la activación simultánea de señalización dopaminérgica.

Moonat y cols (2010) adicionalmente, presentan un modelo molecular donde se muestra como los cambios en algunos de los segundos mensajeros mencionados (PKA, Erk1/2 y CaMK-IV) y de la actividad de CREB observadas en el núcleo central de la Amígdala y en el NAc contribuirían con la respuesta parecida a ansiedad durante la exposición aguda y crónica, y la abstinencia al alcohol. (FIGURA 4)

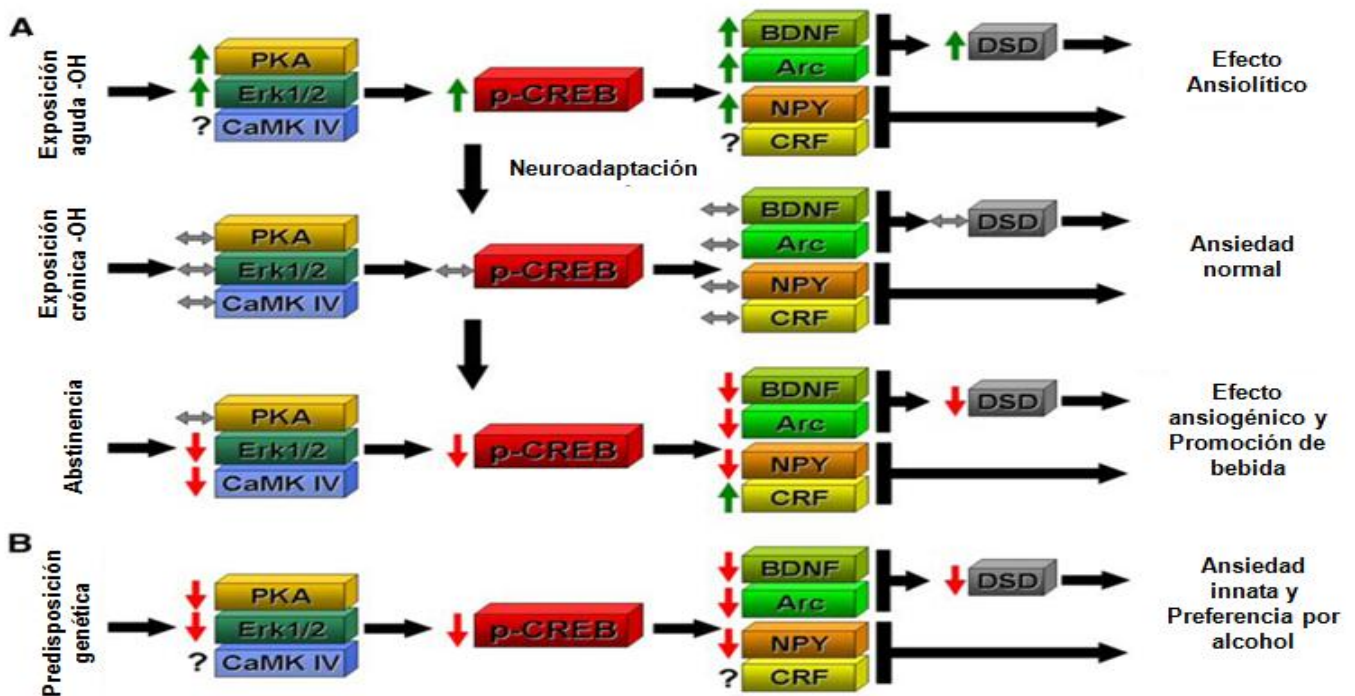


FIGURA 4. A) Modelo molecular hipotético para la acción del alcohol en la proteína cinasa A, CREB y genes blanco de CREB en amígdala (específicamente núcleo central de la amígdala [CeA]), relacionado a la regulación de la ansiedad y conducta de consumo. El efecto agudo del alcohol aumenta los niveles del CREB fosforilado (p-CREB) por aumento en la función de la proteína cinasa A, mismo que origina un aumento en la expresión de genes blanco. El aumento en la expresión de BDNF y la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) resulta en incremento de la densidad dendrítica (DSD) la cual podría mediar los efectos ansiolíticos del alcohol. Los efectos ansiolíticos agudos del alcohol podrían también estar relacionados con aumento en la expresión del neuropéptido Y (NPY) en CeA. La neuroadaptación debida a la exposición crónica al alcohol normaliza los niveles de la proteína cinasa A, los niveles de p-CREB y expresión de genes blanco de CREB. La abstinencia a la exposición crónica al alcohol revierte los efectos observados en la exposición aguda, originando un aumento en la ansiedad y promoción del consumo. El factor liberador de corticotropina (CRF) es también regulado por CREB y la hipofunción de NPY, y la hiperfunción de CRF en el CeA podría también estar relacionada con la regulación de la ansiedad y conductas de consumo. B) Los niveles innatamente bajos de la función de CREB en CeA podrían originar una disminución en los niveles del BDNF, Arc, NPY y DSD, que contribuiría a la predisposición genética a la ansiedad y preferencia del consumo. Efecto: ↑ Aumentado, ↓ Disminuido, ↔ Igual, ? Desconocido o no claro. Tomado de Moonat et al. (2010).

### **c) Neurobiología de la comorbilidad Dependencia al Alcohol-Depresión**

Los estudios preclínicos han contribuido ampliamente al entendimiento de las vías neuroquímicas asociadas con el desarrollo y el mantenimiento de las conductas de búsqueda al alcohol. Estos estudios han demostrado el importante rol de las vías serotoninérgicas, particularmente aquellas relacionadas con la función dopaminérgica, que media la recompensa inducida por alcohol asociada con el riesgo de abuso y de dependencia. Naturalmente, esto ha estimulado el estudio de agentes serotoninérgicos como tratamiento del alcoholismo.<sup>25</sup>

Existen al menos tres mecanismos propuesto para explicar la relación entre la serotonina y alcoholismo; el control de inhibición, la disregulación de ansiedad y la respuesta alterada al alcohol.

Cómo se mencionó arriba, las vías dopaminérgicas meso-cortico-límbicas no median por si solas los efectos de recompensa del alcohol. Existe evidencia sólida que el cerebro medio dopaminérgico es, en sí mismo, modulado por varios neurotransmisores, incluyendo la serotonina. De hecho, estas fibras dopaminérgicas están bajo la inhibición tónica de control por la serotonina. De los nueve núcleos serotoninérgicos cerebrales; el rafe medio, dorsal y central posterior poseen la mayor densidad de inervación serotoninérgica de las regiones corticales y del cerebro medio. Las fibras gruesas del rafe medio inervan el hipocampo y regiones septales. Las proyecciones finas del rafe dorsal típicamente inervan regiones límbicas (incluyendo al *núcleo accumbens, NAc*), estriado y corteza.<sup>26</sup>

La serotonina es un importante modulador en el sistema inhibitor conductual y se ha observado que una disminución en su funcionamiento origina una desinhibición conductual, impulsividad-agresividad y otros, como el inicio temprano de consumo de alcohol. Esta idea es también sostenida por estudios de farmacología conductual en roedores, en los que se relaciona a la serotonina con irritabilidad-agresividad e ingesta excesiva de alcohol. La disfunción serotoninérgica, también parece causar estados de ánimo negativos, como ansiedad y depresión.<sup>27</sup>

Los estudios de imagen cerebral de alcohólicos en abstinencia apoyan la hipótesis de la disfunción serotoninérgica asociada con los estados de ánimo negativos mencionados previamente. Entre sujetos masculinos alcohólicos en abstinencia por más de cuatro semanas, los transportadores de serotonina en los núcleos del rafe se encontraron disminuidos comparados con sujetos controles sanos.<sup>27</sup> Esta reducción se relacionó con el aumento de la ingesta de alcohol a lo largo de la vida, sugiriendo que la reducción en la disponibilidad de los transportadores de serotonina podría ser consecuencia de la

intoxicación crónica por alcohol. Clínicamente, la reducción en la cantidad de transportadores de serotonina fue relacionada con la severidad de los estados de ánimo depresivos, e interesantemente, ha sido observada una reducción semejante en pacientes con depresión mayor.<sup>27</sup>

Debido a que los estados de ánimo negativos interactúan a largo plazo con el riesgo de recaída en alcohólicos en abstinencia, una pérdida en los transportadores de serotonina podría contribuir al mantenimiento de la dependencia a alcohol.

Finalmente, la integración de la 'teoría neurotrófica' de la depresión y de los modelos moleculares del efecto del alcohol en las cascadas de señalización intracelular puede tener relevancia para explorar un área común en la fisiopatología de la comorbilidad de la depresión y el alcoholismo. A diferencia de la cantidad creciente de estudios que señalan la participación de los genes del factor de transcripción CREB y del factor neurotrófico BDNF en la neurobiología de la depresión y la dependencia al alcohol por separado, aún se han realizado muy pocos estudios que exploren su participación en la fisiopatología de la comorbilidad de ambos trastornos.<sup>8,11,46</sup>

#### **d) El Tratamiento con antidepresivos en los pacientes alcohólicos-deprimidos**

Aunque los antidepresivos (AD) son efectivos para la depresión en general, no ayudan a todos los sujetos afectados. De hecho, sólo dos de cada tres pacientes con depresión responderán a cualquier AD.<sup>35,49</sup> (FIGURA 5)

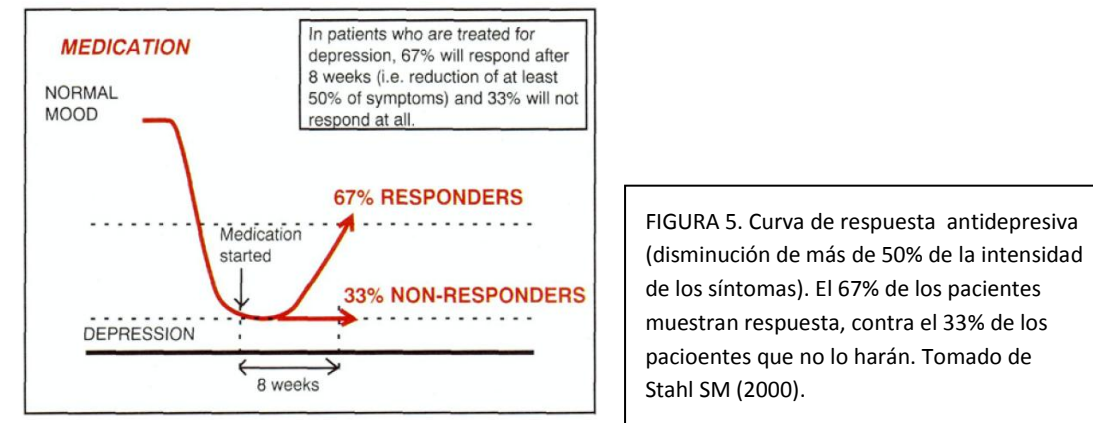


FIGURA 5. Curva de respuesta antidepresiva (disminución de más de 50% de la intensidad de los síntomas). El 67% de los pacientes muestran respuesta, contra el 33% de los pacientes que no lo harán. Tomado de Stahl SM (2000).

Actualmente no es posible predecir qué pacientes responderán a los AD, algunos abordajes que han fallado en la predicción incluyen la conceptualización de depresión como biológica *versus* no-biológica, neurótica *versus* melancólica, endógena *versus* reactiva, aguda *versus* crónica y familiar *versus* no-familiar.

Sin embargo, es bien establecido que es más apropiado elegir un AD de acuerdo a las características de los pacientes y no sólo de acuerdo a la sola presencia de depresión unipolar, por ejemplo, en sujetos deprimidos con síntomas melancólicos, o en nuestro caso, sujetos con depresión en comorbilidad de dependencia a alcohol.<sup>49,67</sup>

Debido a su participación como reguladores del estado de ánimo bajo, de la ansiedad y del control inhibitorio, los antidepresivos con actividad serotoninérgica continúan siendo un área de estudio farmacológico intensa como tratamiento para el alcoholismo. Los inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS) no parecen ser tratamientos efectivos para los sujetos con dependencia al alcohol, puesto que representan a una población muy heterogénea. Sin embargo, han mostrado ser útiles como tratamiento en pacientes alcohólicos de inicio tardío y en alcohólicos con comorbilidad de depresión.<sup>48,69,70</sup>

En una revisión sistemática de Pettinati HM (2004) se observó que en los ensayos clínicos entre 1970 y 1980 para la evaluación de la eficacia de los antidepresivos no se encontraron resultados a favor de su uso en los pacientes alcohólicos-deprimidos. Estos estudios fueron criticados por varias razones (e.g. fallaron en hacer un diagnóstico apropiado de depresión, no fue monitoreado el cumplimiento de toma del medicamento y no se otorgó por el tiempo necesario), pero la mayor crítica fue que los pacientes probablemente fueron sub-dosificados. Esto ocurrió debido a que los propios pacientes no tomaron adecuadamente el tratamiento, ya sea porque deliberadamente se eligieron dosis más bajas del antidepresivo asumiendo que los sujetos podrían tomar alcohol y así presentar interacciones, o que podrían ser hipersensibles a los efectos del medicamento.

Independientemente a la razón de la dosificación sub-umbral, se ha visto desde entonces que se debe hacer lo opuesto y aumentar la dosis diaria del medicamento hasta llegar a un máximo tolerado. Ciraulo (1988) observó que en los bebedores crónicos hubo un aclaramiento acelerado del antidepresivo tricíclico y potencialmente otras clases de fármacos, esto es probable que se haya debido a un aumento en la actividad de las enzimas microsomales hepáticas, mismo que pareció continuar después de varias semanas de abstinencia. A su vez, Mason (1996) demostró en un ensayo clínico que los alcohólicos deprimidos en abstinencia reciente tuvieron una mayor actividad de las enzimas hepáticas y menores niveles de desipramina en plasma comparado con pacientes deprimidos no-alcohólicos tratados con el mismo medicamento.

Este conocimiento indica que cuando nosotros tratamos farmacológicamente la depresión en alcohólicos, los pacientes podrían necesitar dosis más altas que las típicamente prescritas para la depresión sola.<sup>29</sup>  
(TABLA 2)

Estudios que evalúan AD en el tratamiento Depresión-Alcoholismo					
Estudios doble-ciego		Medicamento (dosificación)	Dosis/semanas (dosis promedio)	Depresión	Bebida
Mason (1996)	n=28 (17% <i>m</i> )	Desipramina (100-200mg/día)	200mg/24sem (200mg/día)	Med>Plac	Med>Plac
McGrath (1996)	n=69 (52% <i>m</i> )	Imipramina (150-300mg/día)	300mg/12sem (260mg/día)	Med>Plac	Med=Plac
Cornellius (1997)	n=51 (49% <i>m</i> )	Fluoxetina (20-80mg/día)	20-40mg/12sem	Med>Plac	Med>Plac
Roy (1998)	n=36 (8% <i>m</i> )	Sertralina (50-200mg/día)	100mg/6sem (100mg/día)	Med>Plac	Med=Plac
Roy-Byrne (2000)	n=64 (55% <i>m</i> )	Nefazodona (300-600mg/día)	500mg/12sem (460mg/día)	Med>Plac	Med=Plac
Pettinati (2001)	n=29 (51% <i>m</i> )	Sertralina (50-200mg/día)	200mg/14sem 170mg/día	Med=Plac	Med=Plac
Moak (2003)	n=82 (37% <i>m</i> )	Sertralina (50-200mg/día)	200mg/12sem (186mg/día)	Med>Plac	Med=Plac
Hernandez-Ávila (2004)	n=41 (52% <i>m</i> )	Nefazodona (300-600mg/día)	600mg/10sem (413mg/día)	Med=Plac	Med>Plac

En la TABLA 2 se indican: la *n* total, el porcentaje de mujeres (%*m*), el rango de dosificación habitual del medicamento<sup>35</sup>, la dosis usada en el ensayo (dosis/semana) y la dosis promedio diaria (mg/día).  
Simbología. Med>Plac: Indica una ventaja significativa para Med, Grupo de tratamiento médico; Plac, Grupo con placebo.

Finalmente, la búsqueda de marcadores biológicos para la comorbilidad de depresión con alcoholismo, y de marcadores de respuesta al tratamiento con antidepresivos en éstos pacientes ha sido muy limitada. En el futuro, una clasificación más exacta de los subtipos de alcoholismo que emplee marcadores moleculares, y que incluya otras determinantes epidemiológicas y psicosociales adicionales podría ser más predictiva de los desenlaces de depresión y de control de consumo de alcohol.<sup>48</sup>

#### **e) Células sanguíneas mononucleares periféricas como marcador biológico**

A diferencia de múltiples enfermedades en otras áreas de la medicina, en las cuales los investigadores y los clínicos son capaces de evaluar el tejido enfermo mientras los pacientes afectados aún se encuentran

vivos, la psiquiatría se encuentra limitada por la inaccesibilidad del órgano de interés. Por lo tanto, a lo largo del tiempo se han realizado múltiples esfuerzos para intentar encontrar marcadores periféricos capaces de reflejar la patología dentro del cerebro.<sup>33</sup>

Los linfocitos y sus productos celulares juegan un papel importante en los estudios que han apuntado hacia la integración entre las funciones del sistema nervioso central y el sistema inmunológico. La actividad de regulación génica de éstas células periféricas ha sido considerada particularmente útil para su exploración como un modelo aproximado de la regulación génica en las neuronas.<sup>33</sup>

Específicamente, éstas células muestran cambios en la estructura de la cromatina y en la metilación del DNA en relación al impacto del medioambiente o experiencias de vida. Algunos hallazgos en estudios de gemelos jóvenes *versus* gemelos mayores, indican que la cromatina de los linfocitos puede representar una 'huella digital molecular' que refleje ambientes individuales, experiencias de vida y otros factores que podrían no ser revelados por otros estudios genéticos. Además, el análisis de la regulación de genes en las células sanguíneas de los pacientes durante la evolución de sus enfermedades puede representar un enfoque más cercano para la investigación clínica, debido a que las células sanguíneas mononucleares periféricas comparten muchos de los ambientes bioquímicos no sinápticos de las neuronas; como la exposición a neurohormonas, neuropéptidos, quimiocinas o citocinas, y los medicamentos o sus metabolitos. Finalmente, estas células contienen el complemento completo de enzimas y la maquinaria encontrada en la mayoría de los tejidos, incluyendo a las neuronas.<sup>32</sup>

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que el estudio de la expresión de los genes en los linfocitos y de los productos proteicos de los genes, podría delimitarlos más adelante como marcadores de la presencia de varios trastornos y para predecir la respuesta a los tratamientos. Estos parámetros podrían ayudar a identificar a los genes vinculados con los procesos que subyacen a las enfermedades, además, pueden servir como un modelo de fácil acceso para investigar las alteraciones inmunoneuroendocrinas observados en los trastornos.<sup>33</sup>

Por tanto, hemos considerado proponer que la exploración de los cambios en la expresión de los genes CREB y BDNF en linfocitos, y de los cambios en el nivel sérico de la proteína BDNF podría ser útil como un sensor periférico de los cambios que se presentan en la fisiopatología del diagnóstico dual en el cerebro, así como de la respuesta al tratamiento.

### **Justificación**



Los estudios epidemiológicos y clínicos han indicado consistentemente que los trastornos por uso de alcohol tienen fuerte asociación con los trastornos del estado de ánimo.

Existe una relación recíproca entre la dependencia a alcohol y depresión, cada una tiene mayor prevalencia cuando la otra se encuentra presente de base. Los pacientes deprimidos con dependencia al alcohol tienen mayor gravedad de los síntomas depresivos, mayor suicidalidad y peores resultados en manejo a corto y largo plazo. Además, los individuos alcohólicos con depresión comórbida tienen más probabilidad de experimentar recaídas en el uso del alcohol.

Los mecanismos moleculares relacionados al desarrollo de la adicción al alcohol y a la depresión mayor son muy complejos y se encuentran posiblemente imbricados. El sistema de CREB parece ser un importante mediador molecular en los cambios de neuroadaptación durante la exposición al alcohol. La evidencia disponible sobre sus genes 'blanco' ha identificado una asociación de la actividad del BDNF con la dependencia al alcohol. Así mismo, existe amplia evidencia de la relación en disfunción del BDNF y vías de señalización en áreas de interés como el NAc y corteza prefrontal relacionadas a la vulnerabilidad para depresión mayor, considerada como 'la hipótesis neurotrófica de la depresión'.

En estudios de pacientes con dependencia a alcohol y depresión se ha reportado el beneficio por disminución en uso del alcohol con desipramina, imipramina, sertralina y fluoxetina, cuyo efecto a largo plazo podría implicar el aumento en los niveles de expresión de los genes de CREB y consecuentemente de BDNF, así como el aumento en los niveles séricos de la proteína del BDNF.

### **Planteamiento del problema**

Algunos ensayos en modelos animales han mostrado cambios en el nivel sérico y de expresión de algunos genes en relación con la exposición al alcohol. Para el gen CREB, Uddin et al. (2007) encontró que una inyección intraperitoneal de alcohol aumentaba la expresión de mRNA de múltiples genes, entre ellos CREB y otros factores de transcripción. Misra et al. (2001) observaron que la ingestión voluntaria de alcohol a concentraciones graduales hasta 11% disminuyó los niveles séricos de p-CREB en corteza del NAc. En el caso del gen BDNF, Tapia-Arancibia et al. (2001) también observaron que en ratas expuestas a vapor alcoholado durante 4 semanas tuvieron disminución en el mRNA del BDNF en áreas CA1 y giro dentado de hipocampo, además, en un subgrupo de ratas sometidas a abstinencia durante un día, se observó un aumento del mRNA del gen. McGough et al. (2004) observaron que en ratas expuestas a la autoadministración de alcohol en concentración al 10% durante 4 semanas, la administración

intraventricular de la proteína del BDNF redujo los comportamientos asociados al efecto del alcohol. Logrip et al. (2009) encontró que en ratas expuestas a alcohol durante 4 horas al día por 6 semanas, hubo un aumento en la expresión del gen BDNF en la corteza cerebral y el cuerpo estriado de sus cerebros. Finalmente, Jeanblanc et al. (2009) encontraron que en ratas que autoadministraron una solución de alcohol al 10% durante 3 semanas, aumentó la expresión del mRNA de BDNF en el estriado dorsal.

En humanos, pocos estudios han asociado el uso crónico de alcohol con cambios en la expresión génica y de niveles séricos de CREB o BDNF. Joe et al. (2007) observó que en sujetos con diagnóstico de dependencia a etanol que tenían al menos 30 días internados en un centro de desintoxicación sin tratamiento con medicamentos psicoactivos, hubieron niveles plasmáticos reducidos de BDNF en comparación con controles sanos. Chul et al. (2009) encontró que tras el primer día de ingreso a una unidad de desintoxicación, habían niveles más aumentados de BDNF y NGF en plasma de sujetos con dependencia al alcohol sin tratamiento farmacológico, comparado con sujetos control. Huang et al. (2011) observaron menor cantidad de BDNF en suero de sujetos con dependencia a alcohol comparado con controles, además, en un subgrupo de sujetos que presentó delirium tremens hubo niveles todavía menores, asimismo, la abstinencia durante la primera semana aumentó los niveles del BDNF en los pacientes con dependencia, sin embargo, en caso de haber ameritado se otorgó tratamiento con antidepresivos, antipsicóticos, estabilizadores del ánimo, o tratamiento para convulsiones y enfermedad cerebral vascular.

A su vez, algunos estudios en modelos animales y en humanos han intentado evaluar estos cambios en asociación con la fisiopatología de la depresión y los tratamientos antidepresivos. Conti et al. (2002) mostraron que en ratones *knock-out* del gen CREB sometidos a una prueba de estrés, y que fueron tratados con fluoxetina, había un aumento en la expresión del mRNA del gen BDNF, sugiriendo que la activación del CREB tiene un lugar previo al BDNF en la respuesta terapéutica antidepresiva, pero que las respuestas conductuales y endócrinas antidepresivas pueden ocurrir por mecanismos independientes de CREB. Abumaria et al. (2007) también mostró que el efecto crónico del citalopram en ratas sometidas a estrés aumentaba la expresión de CREB en los núcleos dorsales del rafe. En esta misma línea, Schmidt y Duman (2010) mostraron que la administración de BDNF por un dispositivo periférico aumenta la neurogénesis y expresión de mRNA del CREB, además de BDNF y ERK en hipocampo y estriado de las ratas, además de mostrar un efecto antidepresivo en pruebas de nado forzado y de estrés no predecible. En humanos, Chen et al. (2001) observó que hubo un aumento en la expresión del gen BDNF medido en

tejido de hipocampo de sujetos que en vida tuvieron el diagnóstico de depresión y que fueron tratados con fármacos antidepresivos antes de morir, comparados con sujetos sin tratamiento antidepresivo. Iga et al. (2007) observó que el tratamiento con paroxetina se asoció a un aumento en la expresión del mRNA de CREB en leucocitos de sujetos con depresión. Chang et al. (2010) mostró que en cultivos de células troncales humanas, la exposición a fluoxetina indujo diferenciación y proliferación neuronal, así como aumento en la expresión de factores neurotróficos como BDNF, GDNF y CREB. Finalmente, Ren et al. (2011) observaron disminución en la expresión del gen CREB en neutrófilos de sujetos deprimidos, comparados con sujetos sanos.

Los cambios asociados al efecto de los tratamientos antidepresivos sobre la expresión de los genes o niveles séricos se han estudiado muy poco en sujetos con dependencia al alcohol. Pettinati et al. (2000) encontró que sujetos con dependencia a alcohol tipo A (menos grave y con menor riesgo) tenían mejor respuesta a sertralina comparado con placebo y con sujetos con dependencia tipo B (más grave y con más riesgo), sin embargo, no se consideraron cambios moleculares. Asimismo, Janiri et al. (2009) observó que dosis de 20mg de fluoxetina en sujetos con dependencia a alcohol en etapa de desintoxicación temprana redujo las puntuaciones clinimétricas de ansiedad, disminución en apetencia y recaídas.

Finalmente, hasta donde tenemos conocimiento sólo un estudio (Umene-Nakano et al, 2009) ha explorado el cambio en los niveles séricos del BDNF en pacientes con el diagnóstico dual. En él se encontró que los niveles de BDNF estaban disminuidos en los pacientes con la comorbilidad comparado con los sujetos control, y que la administración de antidepresivos aumentó los niveles séricos del BDNF en quienes respondieron clínicamente.

### **Pregunta de investigación**

¿Se puede establecer una relación entre los cambios en la expresión de los genes CREB y BDNF en leucocitos y del nivel sérico del BDNF de pacientes alcohólicos-deprimidos tratados con fluoxetina (8 semanas) con el *tipo de respuesta clínica*?

El *-tipo de respuesta clínica-* fue definido en términos de respuesta, remisión y cambio en la intensidad de los síntomas para la depresión, y de; control del consumo y cambio en la intensidad de los síntomas para la dependencia al alcohol.

### **Hipótesis**

Los cambios en la expresión de los genes CREB y BDNF en leucocitos, y en el nivel sérico del BDNF de los sujetos, se verán correlacionados con el *tipo de respuesta clínica* de pacientes alcohólicos-deprimidos tratados con fluoxetina.

## **Objetivos**

### **a) Principal**

Evaluar los cambios en la expresión de los genes CREB y BDNF en leucocitos y del nivel sérico de BDNF en pacientes alcohólicos-deprimidos, antes y después de 8 semanas de tratamiento con fluoxetina, y correlacionar estos cambios con el *tipo de respuesta clínica*.

De nueva cuenta, el *tipo de respuesta clínica* fue definido en términos de respuesta, remisión y cambio en la intensidad de los síntomas para la depresión, y de; control del consumo y cambio en la intensidad de los síntomas para la dependencia al alcohol.

### **b) Secundarios**

Evaluar el efecto de fluoxetina en el control de los síntomas depresivos y síntomas ansiosos de la abstinencia al alcohol tras 8 semanas de tratamiento.

## **Metodología general**

Según la clasificación de Alvan Feinstein (1985) se trata de un estudio de causa-efecto (impacto) por el propósito general, de maniobra por el tipo de agente, de inspección (no-experimental) por la asignación de la maniobra, longitudinal por la dirección en el tiempo y homodémico por los componentes del grupo.

<sup>34</sup> Asimismo, otra clasificación lo define como un diseño pre-experimental de un grupo, pre-test/post-test.

<sup>36</sup>

### **a) Criterios de inclusión y exclusión**

Se incluyeron hombres mayores de edad y menores de 60 años que cumplieran criterios del DSM-IV-TR para trastorno depresivo mayor con episodio actual moderado (intensidad valorada por la Escala Hamilton de Depresión mayor de 18 puntos) y dependencia a alcohol con consumo en el último año (valorada por la Escala de Dependencia a Alcohol mayor a 13 puntos), que no hubiesen recibido tratamiento farmacológico antidepresivo en el último mes, y que aceptaran participar en el estudio voluntariamente.

Se excluyó a sujetos con otro diagnóstico adicional en el eje I (excepto trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de angustia), con ideación de muerte, ideación suicida o intento suicida durante el episodio depresivo de estudio, con presencia de síntomas psicóticos durante el episodio depresivo de estudio y presencia de abuso o dependencia a otra sustancia diferente del alcohol en el último año (excepto a nicotina).

Se eliminó del análisis a pacientes que abandonaron el estudio por decisión propia y en un caso, a quien se detectó la presencia de enfermedad hepática. Todos los pacientes pudieron continuar su tratamiento en la institución de manera regular.

### **b) Conformación de grupo**

Se calculó la cantidad de sujetos en base a la fórmula para determinación de tamaño muestral por comparación de medias; con potencia del 80% ( $Z\beta$ , 0.842), con una significancia de 0.05 ( $Z\alpha$ , 1.960), varianza en la medición de la expresión de BDNF y CREB observada en un grupo de referencia medido en el laboratorio de genética del Instituto ( $S^2$ , 2) y un valor mínimo de diferencia que se desea detectar ( $\delta^2$ , 1.5).<sup>1</sup>

Fórmula:

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 * S^2}{d^2}$$

Sustitución:

$$n = \frac{2(1.960 + 0.842)^2 * 2^2}{1.5^2} = \frac{15.70 * 4}{2.25} = 27.91$$

### **c) Evaluación de los sujetos**

Se incluyeron los siguientes instrumentos de evaluación (TABLA 3):

La MINI-Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional Plus (MINI) se trata de un instrumento diagnóstico altamente estructurado acorde a los sistemas DSM y CIE, empleada en la práctica clínica cotidiana y en investigación. Es relativamente breve y de fácil utilización, está dividida en 14 secciones diagnósticas, entre las que se encuentra una sección correspondiente a dependencia a alcohol actual y a lo largo de la

vida (sección L). Cuenta con valores de confiabilidad buenos-muy buenos (consistencia interna 0.50-0.84 y *test-retest* 0.88-1.00).<sup>24</sup>

La Escala de Dependencia del Alcohol (EDA) considera a la dependencia como un continuum, con diferentes niveles, en función del grado de afectación en cada una de las áreas de funcionamiento del individuo. Estudios previos reportan la validez de la EDA como un instrumento de diagnóstico y de tamizaje. Ha mostrado tener valores de sensibilidad de 0.77-0.83, especificidad de 0.69. La validación en México mostró resultados de consistencia interna global de 0.96.<sup>50</sup>

La Escala de Depresión de Hamilton (HAM-D) es una escala hetero-aplicada, diseñada para ser utilizada en pacientes diagnosticados previamente de depresión, con el objetivo de evaluar cuantitativamente la gravedad de los síntomas y valorar los cambios del paciente deprimido. Se valora de acuerdo con la información obtenida en la entrevista clínica y acepta información complementaria de otras fuentes secundarias. Cuenta con valores de confiabilidad buenos-muy buenos (consistencia interna 0.84 y *test-retest* 0.93).<sup>18,55</sup>

La Escala Montgomery-Asberg de Depresión (MADRS) fue diseñada específicamente para evaluar el cambio en la intensidad de la sintomatología depresiva relacionada con una intervención terapéutica. Cuenta con valores de confiabilidad buenos-muy buenos (consistencia interna 0.76-0.95 y *test-retest* 0.80-0.95).<sup>19,20</sup>

El Inventario de Depresión de Beck (IDB) es una escala auto-aplicada donde se sistematizan 4 alternativas de respuesta para cada ítem, que evalúan la gravedad de los síntomas. Ayuda a dar una connotación objetiva de los síntomas cognitivos, afectivos y somáticos subjetivos de la depresión. Cuenta con valores de confiabilidad buenos-muy buenos (consistencia interna 0.76-0.95 y *test-retest* 0.80).<sup>21</sup>

La Escala de Ansiedad de Hamilton (HAM-A) es una escala hetero-aplicada que evalúa síntomas y signos ansiosos referidos por el paciente. Es uno de los instrumentos más utilizados en estudios farmacológicos sobre ansiedad, para valorar la gravedad de la ansiedad de una forma global y para monitorizar la respuesta al tratamiento. Cuenta con valores de confiabilidad buenos-muy buenos (consistencia interna 0.79-0.86 y *test-retest* 0.64-0.96).<sup>22,55</sup>

La Escala sobre los Componentes Obsesivo-Compulsivos de la Bebida (OCDS) es una escala auto-aplicada, desarrollada para reflejar la *obsesionalidad* y *compulsividad* de las conductas relacionadas al consumo, es

decir, la preocupación por bebida y el consumo por sí mismo. Cuenta con valores de confiabilidad muy buenos (consistencia interna 0.86 y *test-retest* 0.80-0.85).<sup>51,52</sup>

La Escala de Impresión Clínica Global (CGI) es una escala auto- y hetero-aplicada, descriptiva de la gravedad del cuadro y cambios experimentados en relación a una maniobra. Ofrece Información cualitativa de cambio respecto a un estado basal y cuenta con valores de medición de concordancia muy buenos (índice kappa de 0.90).<sup>53,54</sup>

TABLA 3. Uso de los instrumentos de escrutinio y de evaluación semanal									
Instrumento	B	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8
MINI-Plus	X								
EDA	X								
HAM-D	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MADRS	X	X	X	X	X	X	X	X	X
IDB	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HAM-A	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OCDS	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CGI	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Nota.</b> Instrumentos de evaluación de los sujetos y su uso inicial (Basal, B), y semanal (W1, W2,...W8).									

#### **d) Variables del estudio**

En la siguiente tabla se especifican las variables del estudio.

Variables				
	TRASTORNO DEPRESIVO	Definición	DEPENDENCIA ALCOHOL	Definición
B A S A L E S	Socio-demográficas (Edad, Edo. Civil, Escolaridad, Ocupación, AHF-Dependencia/Depresión)			
	Edad de inicio TDM	Años	Edad de inicio del consumo	Años
	Número de EDM previos	Continua	Edad de inicio de la dependencia	Años
	Tiempo de evolución EDM actual	Semanas	Número de episodios de abstinencia	Continua
	Respuesta a AD previos	Categorica	Gravedad de la dependencia	EDA
			Frecuencia consumo <sup>65</sup> (30 días previos)	a) Días de consumo b) Días de CF (CF>5 copas por día)
		Intensidad del consumo <sup>65</sup> (30 días previos)	Número de bebidas por día de consumo	
D E C A M B I O	Cambio en intensidad síntomas	MADRS e IBD	Cambio en intensidad síntomas	OCDS y HAM-A
	Respuesta EDM	Reducción en HAM-D <sub>21</sub> >50% respecto al basal	Abstinencia total <sup>65</sup>	Ausencia de consumo durante el estudio
	Remisión EDM	HAM-D <sub>21</sub> <8 puntos al final del estudio	Abstinencia parcial <sup>65</sup>	Ausencia de CF durante el estudio
			Tiempo para recaída <sup>65</sup>	Número de días antes de CF
			Tiempo de recaída parcial <sup>65</sup>	Número de días antes de cualquier consumo
		Cambios en la expresión de los genes BDNF y CREB Cambios en los niveles séricos de BDNF		

### e) Esquema farmacológico

Los pacientes recibieron fluoxetina como tratamiento único, en un esquema de dosis con titulación progresiva hasta 40mg al día, que en caso de mostrar efectos adversos medicamentosos (EAM) con intensidad que generara interferencia en el funcionamiento diario del paciente se reduciría a 20mg al día (TABLA 4).

Fluoxetina	B	W1	W2	W4	W5	W6	W8
Sin EAM (dosis mg/día)	20	40	40	40	40	40	40
Con EAM (dosis mg/día)	20	40	40	20	20	20	20

**Nota.** Uso de Fluoxetina en los sujetos; inicial (Basal, B) y semanal (W1, W2,...W8). En caso de presentar Efectos Adversos Medicamentosos (EAM) se reducirá la dosis.

### f) Obtención y procesamiento de las muestras sanguíneas

#### i. Obtención de la muestra sanguínea



Posterior al consentimiento de los participantes, se tomaron muestras de sangre periférica por punción endovenosa empleando tubos BD Vacutainer® Lavender con anticoagulante (K<sub>3</sub>EDTA) para el aislamiento de leucocitos, y tubos BD Vacutainer® Red con activador de coagulación para el aislamiento del suero.

Las muestras se obtuvieron antes de comenzar con el tratamiento farmacológico (basal) y al final del estudio (semana 8). Una parte del material sanguíneo se empleó para aislar el mRNA total a partir de los leucocitos y con ello cuantificar la expresión de los genes, y con la otra parte del material sanguíneo se cuantificaron de los niveles de la proteína BDNF a partir del suero aislado. Los procedimientos se describen a continuación.

### **ii. Análisis de la expresión de los genes candidatos**

Una vez aislada la placa de leucocitos de cada muestra sanguínea, ésta fue colectada en tubos que contienen reactivos que estabilizan la estructura de los RNA haciéndolos más resistentes a la degradación por RNAsas y que además minimizan los cambios en la expresión génica *ex vivo* ocasionados por la flebotomía y el almacenaje. Se usó un paquete de Qiagen® (PAXgene Blood RNA kit™ kit) que asegura la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Posterior al aislamiento y estabilización del *pool* de RNA, este se purificó mediante el uso del kit, de tal suerte que la colección de productos del RNA total se emplearon como templados para llevar a cabo la síntesis de los cDNA específicos del gen CREB.

En resumen, este proceso requirió el empleo de una transcriptasa reversa (DNA polimerasa dependiente de RNA) y el empleo de oligonucleótidos pequeños (e.g. 10-12 nucleótidos) con secuencias al azar (*random primer oligonucleotides*) ± oligo dTs y la acción de una endonucleasa como la RNAasa H para eliminar las hebras de RNA que sirven como templado original. Dada la extrema sensibilidad de la reacción a los diversos parámetros empleados (e.g. pipeteo, diferencias en los lotes de reactivos, etc.), se empleó un kit comercial para minimizar o limitar la variabilidad intra- e interensayos (MessageSensor™ RT de Ambion o el High capacity cDNA archive kit™) de Applied Biosystems.

### **iii. Amplificación por RT-PCR**

La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo en un aparato AB 7500 (Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System). La cuantificación de los transcritos específicos del gen CREB se realizó por duplicado empleando primers y sondas de hibridación Taqman™ específicas diseñadas en límites intrónexón (TaqMan® gene expresión assays™, de Applied Biosystems).

#### **iv. Medición de los niveles séricos de BDNF**

Esta medición se llevó a cabo mediante la técnica de *ELISA-sandwich* montada en el laboratorio de genética del INPRF. Se trató de un ensayo en el que se recubre un pocillo con un primer anticuerpo anti-BDNF, después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra en la que se encuentra el antígeno, que es retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno se une a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. La luz generada por este fenómeno constituye una alternativa conveniente y muy sensible para las mediciones de absorbancia.

#### **g) Análisis estadístico**

La recolección de datos se hizo en una base de datos de Excel® para luego hacer su análisis en el paquete estadístico STATA® versión 11.1. La descripción de las características socio-demográficas y clínicas basales se realizó con frecuencias y porcentajes para las variables categóricas, y con promedios y desviaciones estándar (DE) para las variables continuas.

Para las variables dependientes de depresión (seguimiento clínico semanal con MADRS e IDB) y de alcoholismo (seguimiento clínico semanal con HAM-A y OCDS) se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas •8.

Para analizar los cambios en los niveles séricos del BDNF entre la medición basal y de la semana 8 (Basal *versus* Week 8) se utilizó una prueba t de Student para medias relacionadas. Para la expresión del gen CREB se usó una prueba de Wilcoxon para distribución de medias debido a que la medición de expresión solo representa un valor diferencial entre la medición basal y de la semana 8 ( $\Delta\Delta\text{ct CREB B/W8}$ ).

Finalmente, se usaron las pruebas de Pearson y Spearman para la correlación de las variables clínicas basales de depresión (duración del trastorno depresivo, número de episodios depresivos y semanas de duración del episodio depresivos) y del alcoholismo (duración de la dependencia, número de episodios de abstinencia previos, consumo y consumo fuerte [CF] en el mes previo al inicio del estudio) con el nivel sérico basal de BDNF. Y de la misma forma para la correlación de las variables de cambio de depresión (porcentaje de reducción de HAM-D<sub>21</sub> a la semanas 2, 4 y 8, número de pacientes con respuesta, gradiente de respuesta y remisión del episodio depresivo) y del alcoholismo (abstinencia total del

consumo, abstinencia parcial del consumo y reducción mayor a 50% en el puntaje de la OCDS respecto al puntaje basal) con el valor de la expresión del gen CREB Basal/W8, y con el valor del nivel sérico de BDNF Basal/W8.<sup>31</sup>

#### **h) Consideraciones éticas**

Este trabajo consideró las normas éticas internacionales de investigación en humanos. Se obtuvo la aceptación voluntaria de los pacientes para participar, para esto se proporcionó información completa por escrito y se firmó la carta de consentimiento informado. Asimismo, se garantizó la confidencialidad en la información obtenida y de la identidad del paciente. No existió coerción para la participación de los sujetos, y se garantizó que las personas que no aceptaran ingresar al estudio siguieran siendo atendidas en la Institución como se hace de manera regular.

El proyecto de investigación fue sometido a la revisión del Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría y fue aprobado para su realización en marzo del 2011.

#### **Resultados**

##### **a) Características socio-demográficas y clínicas basales**

Se incluyeron 24 sujetos, mismos que representan casi el 90% de la muestra total sugerida. Otros ocho sujetos no pudieron ser incluidos para el análisis de los resultados (dos abandonaron en la semana 7, tres abandonaron en la semana 3, dos en la semana 1 y un sujeto más fue excluido por detección de una posible enfermedad hepática previa al inicio de la investigación).

La información general de los 24 pacientes nos muestra una media de edad de 39 años (DE 12), el 58% se encontraba con pareja al momento de la inclusión y tuvieron 11 años de escolaridad en promedio (DE 3). (Cuadro 1)

Dentro de los principales datos clínicos basales del trastorno depresivo se observa que los sujetos tuvieron una edad promedio de 31 años (DE 15) cuando inició el trastorno, con un tiempo de evolución del episodio actual de 60 semanas (DE 85). Sólo 6 sujetos habían tenido antecedente de uso de tratamiento antidepresivo, sin embargo, ninguno de ellos lo había tomado en tiempo y forma para ser considerados como resistentes. Por su parte, la edad de inicio de consumo de alcohol fue de 15 años (DE 3), con un promedio de 12 años (DE 7) para el desarrollo de la dependencia. La gravedad de la

dependencia evaluada por la EDA, mostró un puntaje promedio entre moderada y grave (EDA 23 pts, DE 10). En los 13 pacientes que tuvieron consumo en el mes previo a su inclusión en el estudio, hubo un promedio de consumo y consumo fuerte, de 10 y 8 días respectivamente. (Cuadro 2)

### **b) Cambio en la intensidad de los síntomas y el tipo respuesta clínica al tratamiento**

Cómo se mencionó previamente, el cambio en la intensidad de los síntomas depresivos fue evaluado con las escalas MADRS e IDB. A través de éstos instrumentos se pudo observar una gran variabilidad individual con diferencias estadísticamente significativas (MADRS: ANOVA•8 5500.5, DF 23, F 42.1,  $p<.0001$ ; e IDB: ANOVA•8 16066.7, DF 23, F 25.2,  $p<.0001$ ). Los promedios en los puntajes iniciales fueron 30.1 y 32.7, y al final fueron de 10.7 y 13, para la MADRS e IDB respectivamente, como puede verse en el Cuadro 3, hubo una correlación alta en ambas escalas para la evaluación de la tendencia de reducción de los síntomas. (Figuras A y B)

Una vez que concluyó el seguimiento del tratamiento en la semana 8, se observó que 18 de los pacientes (75%) cumplieron con el criterio de respuesta del episodio depresivo, con un promedio de disminución de 81% en sus puntajes. En concordancia, 15 de los pacientes (63%) cumplieron el criterio de remisión del episodio. (Cuadro 4)

Con respecto al alcoholismo, también se observó una alta variabilidad de cambio en los síntomas *obsesivo-compulsivos* relacionados al consumo del alcohol (OCDS: ANOVA•8 7885.6, DF 23, F 13.7,  $p<.0001$ ) y en la intensidad de los síntomas de ansiedad (HAM-A: ANOVA•8 4939.3, DF 23, F 30.2,  $p<.0001$ ), con diferencias estadísticamente significativas. Como en el caso de los síntomas depresivos, en ambas escalas para evaluación de los síntomas de ansiedad hubo una tendencia hacia la reducción de los síntomas, con valores de correlación moderados entre ellas. (Cuadro 3, Figuras C y D)

En el mismo sentido, 8 pacientes (33%) se mantuvieron sin ningún consumo durante el periodo completo, sin embargo, 15 (63%) aún a pesar de haber consumido alcohol, no lo hizo como consumo fuerte (más de 5 copas estándar por ocasión). En el caso de los sujetos que recayeron en la ingesta de alcohol, estos tuvieron una latencia promedio de 36 días (DE 22) para tener cualquier consumo, y de 46 días (DE 21) para presentar una recaída con consumo fuerte. (Cuadro 5)

Finalmente, la escala de impresión clínica global de gravedad presentó un cambio durante el seguimiento desde moderada y marcadamente enfermo hacia leve y dudosamente enfermo (CGI-G: ANOVA•8 89.5, DF 23, F 48.02,  $p<.0001$ ). En cuanto a la evaluación de mejoría, desde la primera semana se observó un

cambio de leve y moderadamente mejor hacia el estado de mucho mejor al final del estudio (CGI-M: ANOVA.8 163.3, DF 23, F 29.6,  $p < .0001$ ). (Figura E)

### **c) Cambios en los niveles séricos del BDNF y de la expresión del gen CREB**

En el promedio global del nivel sérico de BDNF hubo una reducción no significativa entre el Basal y la Semana 8 (BDNF B/W8=-2.1 ng/mL ;  $t=1.45$ , DF 23,  $p=0.159$ ), en un sub-análisis entre respondedores y no-respondedores de los síntomas depresivos, tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos. (Cuadros 4) Sin embargo, al realizar otro sub-análisis dividiendo a los pacientes en quienes presentaron o no, una reducción de más de 50% en la OCDS a la Semana 8 respecto a la Basal, se observó que hubieron niveles séricos más bajos de la proteína al final del tratamiento en el grupo de pacientes que no tuvieron la reducción de más de 50% en la escala (BDNF B/W8=-4.3 ng/mL ;  $t=1.26$ , DF 7,  $p=0.02$ ). (Cuadros 5)

Con respecto a la expresión del gen CREB, solo se realizó la cuantificación con la técnica de  $\Delta\Delta Ct$  en 8 de los 24 pacientes. Se encontró un promedio de aumento global de 20.7 veces, sin embargo, al haber sido un número reducido de muestras evaluadas no se observó una distribución normal de los valores (S-wilk 1.692,  $p=0.042$ ). En el sub-análisis del grupo de pacientes con respuesta antidepresiva si encontró que hubo un aumento en la expresión del gen, con 24.3 veces más a la semana 8 (S-wilk 1.025,  $p=0.152$ ). Asimismo, en el sub-análisis de los sujetos con reducción mayor al 50% en el puntaje de la OCDS también se observó un aumento de 16 veces más en la expresión del gen (S-wilk 0.368,  $p=0.356$ ) a la semana 8. (Cuadros 6 y 7, Figura F)

Los resultados completos de expresión de los genes de BDNF y CREB tuvieron que ser aplazados debido a contratiempos ajenos al equipo de investigación para la obtención de los reactivos necesarios, situación que retrasó el montaje de la técnica óptima para los experimentos de cuantificación. Sin embargo, como se mostrará a continuación, los resultados de las 8 cuantificaciones de expresión del gen CREB sí permitieron realizar las pruebas de correlación propuestas. No descartamos que con los resultados completos de expresión de los genes se puedan obtener valores de correlación que modifiquen las tendencias que se presentaran en seguida.

### **d) Correlaciones de las variables de depresión y alcoholismo con los NS de BDNF y la expresión del gen CREB**

En el Cuadro 4 se muestra el análisis de correlación entre las variables clínicas basales y de cambio de la depresión, con los niveles séricos del BDNF. Se encontró una correlación negativa entre la cantidad de sujetos con disminución mayor al 50% en la escala HAM-D<sub>21</sub> a la semana 4 y la disminución en el nivel sérico al final del tratamiento ( $r_s=-0.390$ ;  $p=0.03$ ), sin embargo, a pesar de la significancia estadística no se consideró relevante por tener valor de correlación superior a -0.4.

Por su parte, en el Cuadro 5 se muestran las correlaciones entre las variables clínicas basales y de cambio del alcoholismo, con los niveles séricos de la proteína BDNF. Se encontró una correlación positiva entre haber tenido cualquier consumo y haber tenido consumo fuerte en el mes previo al estudio, con el nivel sérico basal del BDNF ( $r_s=0.763$ ;  $p=0.02$  y  $r_s=0.845$ ;  $p=0.008$ ) en grupo de sujetos que no presentaron una reducción mayor al 50% en la OCDS. Se consideró entonces, una relación directa entre mayores niveles séricos del BDNF Basales y el consumo activo de alcohol.

Finalmente, en los Cuadros 6 y 7 se muestran los valores de correlación entre las variables de cambio de depresión y del alcoholismo, con los valores de expresión ( $\Delta\Delta ct$ ) del gen CREB. Se encontraron valores de correlación positiva entre el nivel de expresión de CREB y los porcentajes de reducción de la escala de depresión de Hamilton a la semana 2 ( $r_s=0.646$ ,  $p>0.05$ ), a la semana 4 ( $r_s=0.532$ ,  $p>0.05$ ) y a la semana 8 ( $r_s=0.735$ ,  $p>0.05$ ) en los pacientes respondedores al episodio depresivo, aunque no fueron estadísticamente significativas; y se observó una correlación estadística entre el porcentaje de reducción en la OCDS con el aumento en la expresión de CREB ( $r_s=0.992$ ,  $p=0.03$ ) en el grupo de pacientes que presentaron una reducción mayor al 50% en la escala. Se consideró entonces, la presencia de una relación directa entre una mayor reducción de los síntomas obsesivo-compulsivos de la bebida y una mayor expresión del gen.

## **Discusión**

El alcoholismo es una enfermedad muy compleja, en la que frecuentemente coexisten otros trastornos mentales. Esta característica de comorbilidad señala la posible presencia de factores etiológicos compartidos relacionados a la predisposición biológica para la dependencia al alcohol y los otros trastornos asociados.<sup>60</sup>

El diagnóstico dual de alcoholismo y depresión es una entidad clínica muy prevalente y ampliamente relacionada con el aumento en la frecuencia de los episodios depresivos, el aumento de la gravedad de

los síntomas, un menor funcionamiento general de los sujetos y una mayor tasa de suicidios. La depresión, tratada o no, puede predecir fuertemente las recaídas en el consumo del alcohol en los pacientes con dependencia; sin embargo, el manejo de ésta comorbilidad ha sido una fuente considerable de confusión y controversia.<sup>61</sup>

Por otra parte, aunque es claramente reconocido que los factores biológicos juegan un papel importante en el desarrollo del alcoholismo, de la depresión y de la respuesta a los tratamientos, la identificación de dichos factores ha sido un reto que frecuentemente se ha abordado, pero que aun no ha sido resuelto. Es en este punto en donde se sitúa la presente investigación.

Uno de los objetivos de este estudio fue el de evaluar posibles cambios en los niveles séricos de la proteína BDNF en pacientes alcohólicos-deprimidos tratados con fluoxetina durante 8 semanas, y evaluar si existía una correlación entre estos cambios y la respuesta clínica.

Es importante volver a recalcar que el abordaje molecular a través de los genes CREB y BDNF, y de la proteína de BDNF, si bien es interesante, aún es un campo poco explorado y ha mostrado inconsistencias en los resultados de los estudios en humanos donde se ha intentado buscar su posible uso como biomarcadores de la fisiopatología de la depresión, del alcoholismo y/o de la respuesta al tratamiento farmacológico. Incluso se puede afirmar que el estudio de éstos marcadores en pacientes que han expresado de manera simultánea los dos diagnósticos ha sido prácticamente nulo.

Respecto al trastorno depresivo, en nuestro estudio no se observaron cambios estadísticamente significativos en el nivel sérico del BDNF entre el estado basal y al final del tratamiento, incluso en los sub-análisis de los pacientes con respuesta y remisión del episodio depresivo. Este resultado no muestra consistencia con otros estudios reportados en la literatura donde se ha identificado una asociación del empleo de tratamientos con antidepresivos con un aumento de las concentraciones de la proteína. Por ejemplo, un meta-análisis relativamente reciente (Sen et al., 2008) de estudios que evaluaron los cambios en el nivel sérico de BDNF en pacientes con trastorno depresivo mayor sin comorbilidad demostró incrementos discretos pero estadísticamente significativos del nivel sérico de la proteína después de un periodo de tratamiento con antidepresivos.

En relación a los pacientes con la comorbilidad, el único estudio semejante que hasta nuestro conocimiento se encuentra publicado (Umene-Nakano et al., 2009) mostró que después de 8 semanas de tratamiento con antidepresivos hubo un aumento en los niveles séricos del BDNF en aquellos sujetos que

respondieron en los síntomas depresivos, sin embargo, no se aclaró si los pacientes alcanzaron otros desenlaces favorables, es decir, en los síntomas de ansiedad relacionados al consumo del alcohol y para el control parcial o total del consumo de la sustancia.

El hallazgo más relevante de nuestro esfuerzo experimental fue el de documentar que los pacientes que presentaron menor reducción en los puntajes de la escala de componente obsesivo-compulsivo de la bebida (OCDS) al final de las 8 semanas de tratamiento tuvieron niveles séricos de BDNF más bajos, y que hubo una relación directa entre haber tenido consumos de alcohol en el mes previo al reclutamiento con niveles séricos de BDNF más altos en el estado basal.

La relación entre el diagnóstico de dependencia al alcohol con los niveles en suero de esta neurotrofina son todavía confusos, ya que por ejemplo dos estudios reportaron niveles de BDNF más bajos en los sujetos afectados comparados con sujetos controles (Joe et al., 2007; Huang et al., 2011); en tanto que un estudio adicional identificó un efecto en el sentido opuesto (Chul et al., 2009). Cabe destacar que en ninguno de estos estudios se consideró el efecto longitudinal de algún tratamiento farmacológico ni de los desenlaces clínicos posteriores.

Resulta indispensable recordar que nuestro estudio tuvo un diseño pretest-postest en un grupo de pacientes, por lo que no se hacía necesario la presencia de un grupo control; sin embargo, consideramos que hubiera sido útil el haber podido contar con datos sobre los niveles séricos de BDNF en sujetos sanos (o aún de pacientes alcohólicos sin comorbilidad), ya que esto hubiera permitido establecer el punto de referencia sobre el cual comparar el nivel basal de la proteína (i.e. tiempo cero) o los cambios posteriores al tratamiento antidepresivo.

Por otro lado, otro de los objetivos del estudio fue establecer posibles correlaciones de los cambios en la expresión de los genes CREB y BDNF con los tipos respuesta clínica en la depresión y el alcoholismo de los pacientes. Esta idea nació en consonancia a un trabajo experimental previo en el laboratorio de genética, en donde se observó que la remisión clínica del episodio depresivo en un grupo de adolescentes por el uso de fluoxetina se asoció a cambios a la alza en la expresión de los genes CREB y 5HTT (Cruz et al., en preparación).

En este documento solo se muestran los datos de la cuantificación en 8 de 24 pacientes del nivel de expresión del gen CREB. Si bien este se debe considerar como un resultado preliminar, resulta interesante



que al igual que en el ensayo clínico antes mencionado también aquí se pudo documentar un cambio a la alza en la expresión del gen CREB en éste grupo de pacientes con diagnóstico dual después de las 8 semanas de tratamiento. Este dato va en el mismo sentido que el trabajo de Iga et al. (2007), quienes mostraron que el tratamiento con paroxetina se asoció a un aumento en la expresión del mRNA de CREB en leucocitos de sujetos deprimidos (sin comorbilidad con trastornos por uso de alcohol). Por otra parte y al igual que en el caso discutido anteriormente en relación a la determinación de los niveles séricos de BDNF, no se pudo contar con datos normativos de los niveles basales de CREB (i.e. en sujetos sanos) que pudieran establecer el punto de referencia para los resultados en nuestros pacientes alcohólicos-deprimidos. Esto es relevante ya que por ejemplo Ren et al. (2011), mostraron una reducción de los niveles de expresión del gen CREB en neutrófilos de pacientes con diagnóstico único de depresión, comparados con sujetos sanos.

Más aún se hizo notorio que el aumento en la expresión de CREB se conservó solo en el sub-grupo de pacientes respondedores a tratamiento antidepresivo. Asimismo, se observó una relación estadística entre una mayor reducción en el puntaje de la OCDS y el aumento en la expresión de éste marcador. Estos datos resultan novedosos debido a que hasta nuestro conocimiento no existen otros reportes publicados en los que se haya evaluado la expresión del gen CREB en pacientes con la comorbilidad de alcoholismo y depresión.

Esperamos que el reporte final con los datos completos de la expresión de los genes de CREB y BDNF de nuestro estudio, ofrezca una conclusión más sólida de los hallazgos iniciales que estamos reportando y que adicione nueva información sobre los cambios de éstas moléculas en relación al uso de antidepresivos en pacientes con diagnóstico dual.

Una fortaleza del estudio fue la evaluación de los desenlaces clínicos con el uso de la fluoxetina, donde se mostró que el 75% de los sujetos tuvieron respuesta antidepresiva, y en ellos, el promedio de reducción de los síntomas fue de 81% evaluado por la escala de depresión de Hamilton. Por su parte, aunque sólo el 33% de los pacientes se mantuvieron sin ningún consumo de alcohol, el 63% de la muestra completa no tuvo consumos fuertes. Asimismo, pudo observarse una alta concordancia en la reducción de los puntajes en los instrumentos clínicos para la evaluación continua de los síntomas depresivos (MADRS e IBD) y de los síntomas de ansiedad asociados a la dependencia al alcohol (HAM-A y OCDS).

Esta información clínica es claramente consistente con los múltiples estudios que han evaluado la eficacia de los antidepresivos en pacientes portadores de trastorno depresivo mayor como diagnóstico único.<sup>64</sup> Sin embargo, aporta nueva información sobre la eficacia clínica de los antidepresivos en pacientes con esta comorbilidad, donde los desenlaces han sido menos favorables en relación al alcoholismo.<sup>29,62,63</sup>

En particular resulta interesante la reducción detectada en los puntajes de la escala OCDS, la cual ha sido considerada como un instrumento que permite documentar alguna(s) de las múltiples facetas que constituyen el denominado constructo de *craving*, mismo que parece ser determinante para establecer el indeseable riesgo a las recaídas.<sup>51</sup>

Esto toma relevancia si consideramos que no ha sido posible todavía establecer de forma contundente si en este tipo de pacientes con comorbilidad de depresión y alcoholismo, la apetencia (*craving*) de consumo de alcohol se da por el efecto puramente de recompensa de la sustancia o como una forma de automedicación para tratar de aliviar los síntomas de abstinencia o del estado de ánimo. En este sentido un reporte del estudio PREDICT mostró que la apetencia en pacientes con dependencia al alcohol, favoreció el mantenimiento del consumo o la presencia de recaídas, tanto por el reforzamiento positivo del efecto del alcohol como por el alivio de síntomas del estado de ánimo.<sup>69</sup>

Finalmente, nuestro trabajo está en concordancia con la conclusión obtenida en el meta-análisis de Nunes y Levin (2008) en el que se concluye que los antidepresivos pueden ser útiles en pacientes cuyo diagnóstico está bien establecido por una historia clínica y una entrevista de diagnóstico estructurada, y solo si se emplean dosis apropiadas del medicamento (e.g. 40-60 mg de fluoxetina) durante períodos adecuados de tiempo (por lo menos 6 semanas).

## **Conclusiones**

Aunque la evidencia disponible de ensayos clínicos para el tratamiento de la comorbilidad de depresión y alcoholismo con antidepresivos es limitada, el uso de estos medicamentos y la adhesión parecen mostrar un beneficio en los desenlaces clínicos de depresión, así como en la ansiedad relacionada al consumo del alcohol.

La exploración del cambio en la expresión de moléculas como el mRNA de los genes CREB y BDNF, y la proteína del BDNF, como posibles marcadores biológicos en la respuesta al tratamiento antidepresivo aportará información, no sólo en la respuesta, sino en el conocimiento de la fisiopatología del diagnóstico dual de depresión y alcoholismo.

Una limitación importante de éste reporte de investigación incluye al diseño del estudio, pues no se contó con un grupo control de sujetos sanos o pacientes sin comorbilidad, ni con una maniobra placebo para la comparación del efecto del tratamiento. Además, si bien se incluyó a un grupo de pacientes homogéneo, a través de dos centros especializados en el tratamiento del diagnóstico dual (el Centro de Ayuda al Alcohólico y sus Familiares y la Clínica de Trastornos Adictivos del Instituto Nacional de Psiquiatría), el número total de la muestra aún es reducido y se dificultará su generalización en otros escenarios de tratamiento.

Finalmente, el trabajo que se realiza por el equipo de investigación complementará éstos resultados, toda vez que otros brazos del proyecto se encuentran reclutando a pacientes alcohólicos y deprimidos sin comorbilidad, además de incluir otras áreas de estudio clínico, por ejemplo, por evaluaciones de desempeño en pruebas neuropsicológicas y evaluaciones de electrofisiología por potenciales evocados relacionados a estímulos.

**CUADROS Y GRÁFICAS:**

<b>Cuadro 1. Datos socio-demográficos</b>		
Variable	Categoría	Valor
<b>Edad</b> (M (DE))		39 (12)
<b>Estado Civil</b> (%)	Con pareja	14 (58)
	Sin pareja	10 (42)
<b>Escolaridad</b> (M (DE))		11 (3)
<b>Ocupación</b> (%)	Subempleo	16 (67)
	Desempleo	5 (20)
	Estudia	3 (13)
<b>AHF Psiquiátricos</b> (%)	Depresión	4 (17)
	Dep. DH	15 (63)

<b>Cuadro 2. Datos clínicos basales</b>	
	M (DE)
<b>Variables Depresión</b>	
Edad de inicio DM	31 (15)
Número de EDM previos	2 (1)
Tiempo de evolución EDM actual (semanas)	60 (85)
Uso previo AD	Sin dosis/tpo
<b>Variables Alcoholismo</b>	
Edad de inicio de consumo	15 (3)
Edad de inicio de dependencia	27 (8)
Gravedad de la dependencia (EDA)	23 (10)
Número de periodos de abstinencia	5 (5)
Cualquier consumo (días/mes)	10 (10)
Consumo fuerte (días/mes)	8 (11)
Intensidad de consumo (núm. copas)	11 (10)

**Cuadro 3. Cambio en Intensidad de Síntomas Depresivos y de Ansiedad Relacionados al Alcoholismo**

	W1		W2		W3		W4		W5		W6		W7		W8	
	M	R <sup>2</sup> (%)	M	R <sup>2</sup> (%)	M	R <sup>2</sup> (%)	M	R <sup>2</sup> (%)	M	R <sup>2</sup> (%)	M	R <sup>2</sup> (%)	M	R <sup>2</sup> (%)	M	R <sup>2</sup> (%)
<b>MADRS*</b>	30.1	-26	17.9	-41	14.3	-52	11.5	-62	11.6	-62	10.7	-65	8.4	-72	10.7	-64
<b>BECK**</b>	32.7	-39	18.2	-44	16.8	-48	15.3	-53	15.2	-53	12.4	-62	11.6	-65	13.0	-60
<b>rp</b>	0.574 <sup>§</sup>	0.848 <sup>§</sup>	0.851 <sup>§</sup>	0.781 <sup>§</sup>	0.847 <sup>§</sup>	0.778 <sup>§</sup>	0.744 <sup>§</sup>	0.740 <sup>§</sup>	0.878 <sup>§</sup>							
<b>HAM-A<sup>†</sup></b>	17.2	-26	11.3	-35	8.8	-49	7.5	-56	7.2	-58	7.5	-56	5.7	-67	6.8	-60
<b>OCDS<sup>‡</sup></b>	21.7	-46	10.3	-53	11.4	-47	9.9	-54	10.8	-50	6.4	-71	6.5	-70	8.7	-60
<b>rp</b>	0.231	0.223	0.373 <sup>§</sup>	0.540 <sup>§</sup>	0.675 <sup>§</sup>	0.642 <sup>§</sup>	0.231	0.227	0.419 <sup>§</sup>							

**Nota.** Se muestran los valores promedio de los puntajes semanales de cada escala y el porcentaje de reducción acumulada (Ra%) de la semana en curso respecto de la medición basal. Se observan cambios estadísticamente significativos: <sup>†</sup>ANOVA-8 p<.0001; <sup>‡</sup>ANOVA-8 p<.0001; <sup>§</sup>ANOVA-8 p<.0001; <sup>¶</sup>ANOVA-8 p<.0001). También se observan valores de correlación altos entre las escalas para la evaluación de depresión y más discretos para los síntomas de ansiedad relacionados con el consumo de alcohol (p<0.05).

**Cuadro 4. Correlaciones de las Variables de Depresión con los Niveles de BDNF**

	Variables Basales			Variables de Cambio								Niveles Séricos BDNF		
	Dur. TDM	Número EDM	Dur. EDM actual	Resp W2		Resp W4		Resp W8		Grad. Resp	Remisión	Basal	W8	B/W8
	M	M	M	%	n	%	n	%	n	M	n	M	M	M
<b>No Resp.</b> n=6	12.3	1.2	48.7	-17.8	0	-26.3	1	-14.0	0	4.5	0	17.5	16.2	-1.3
	rp=0.184	rp=-0.64	rp=0.591	rp=0.012	s/v	rp=-0.237	rs=-0.654	rp=0.402	s/v	rp=0.109	s/v	t=-0.35 (IC -10.93:8.30), DF 5, p=0.739		
<b>Resp.</b> n=18	6.7	2.1	64.3	-49.6	10	-73.3	16	-80.8	18	6.7	15	21.4	18.8	-2.6
	rp=-0.029	rp=0.056	rp=-0.238	rp=0.085	rs=-0.150	rp=-0.060	rs=-0.306	rp=0.217	rs=-0.150	rp=0.528	rs=0.215	t=-1.48 (IC -6.36:1.09), DF 17, p=0.154		
<b>Total</b> n=24	8.1	1.8	60.4	-41.7	10	-61.5	17	-64.1	18	6.1	15	20.4	18.1	-2.3
	rp=-0.007	rp=0.085	rp=-0.169	rp=-0.013	rs=-0.146	rp=-0.150	rs=-0.390*	rp=0.034	rs=-0.146	rp=0.239	rs=0.056	t=1.45 (IC -0.97:5.58), DF 23, p=0.159		

**Nota.** Se realizó un sub-análisis dividiendo a los pacientes en No Respondedores y Respondedores (por reducción de HAM-D<sub>21</sub>>50% a la semana, respecto de la basal). Aunque se observa reducción en el BDNF basal y a la semana (W8) en el total y los sub-grupos, no hay diferencias estadísticas. Se observa una correlación negativa entre el número de respondedores a la semana y el BDNF post-tratamiento (B/W8), (p=0.03).

**Cuadro 5. Correlaciones de las Variables de Alcoholismo con los Niveles de BDNF**

	Variables Basales				Variables de Cambio				Niveles Séricos de BDNF		
	Dur. Depend.	Episodios Abst.	Consumo previo	CF previo	Abst. Total	Abst. Parcial	OCDS	Basal	W8	B/W8	
	M	M	n	n	n	n	%	M	M	M	
<b>OCDS&lt;50%</b> B/W8 n=8	14.8	7.3	4	3	0	2	7.8	26.6	22.2	-4.3	
	rp=-0.523	rp=-0.106	rs=0.763**	rs=0.845**	s/v	rs=-0.370	rp=0.449	t=1.26 (IC 3.7:12.4), DF 7, p=0.024*			
<b>OCDS&gt;50%</b> B/W8 n=16	10.2	4.0	9	9	8	13	-81.5	17.4	16.1	-1.3	
	rp=0.044	rp=-0.195	rs=0.314	rs=0.314	rs=0.162	rs=-0.364	rp=0.318	t=0.77 (IC 2.28:4.88), DF 15, p=0.452			
<b>Total</b> n=24	11.7	5.1	13	12	8	15	-51.7	20.4	18.1	-2.3	
	rp=-0.089	rp=0.004	rs=0.453	rs=0.397	rs=0.153	rs=-0.192	rp=0.420	t=1.45 (IC 0.97:5.58), DF 23, p=0.159			

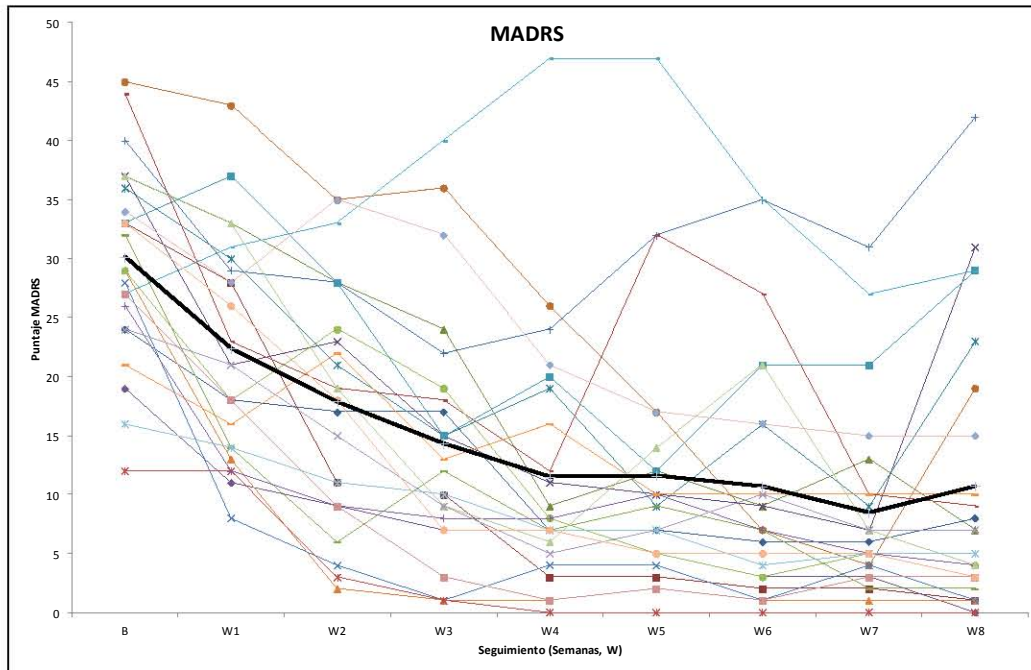
**Nota.** Se realizó un sub-análisis dividiendo a los pacientes en quienes presentaron o no una reducción de más del 50% en OCDS a la semana, respecto de la basal. Se observa una mayor disminución en el BDNF post-tratamiento en el grupo de pacientes que no tuvieron una reducción de más del 50% en OCDS. \* Asimismo, se observa una correlación positiva entre el consumo y el consumo fuerte en el mes previo al estudio con el BDNF más alto de BDNF basal (p=0.02 y p=0.008, respectivamente) en el grupo de pacientes que no tuvieron una reducción de más del 50% en OCDS.

Cuadro 6. Correlaciones de las Variables de Depresión con la Expresión de CREB										
	Variables de Cambio								DDct Expresión CREB	
	Resp W2		Resp W4		Resp W8		Grad. Resp	Remisión	B/W8	Dif. Pos.
	%	n	%	n	%	n	M	n	M	n
No Resp. (n=3)	-24.2	0	-47.8	1	-9.0	0	4.3	0	14.7	2
	rp=-0.999	s/v	rp=0.994	rs=0.999	rp=-0.793	s/v	rp=0-0.488	s/v	S-wilk 1.916, p=0.027	
Resp. (n=5)	-46.8	3	-72.2	5	-76.3	5	6.0	3	24.3	5
	rp=0.646	rs=0.642	rp=0.532	s/v	rp=0.735	s/v	rp=0.353	rs=0.272	S-wilk 1.025, p=0.152	
Total (n=8)	-38.3	3	-63.0	6	-51.1	5	5.4	3	20.7	7
	rp=0.485	rs=0.549	rp=0.594	rs=0.477	rp=0.239	rs=0.193	rp=0.236	rs=0.299	S-wilk 1.692, p=0.042	

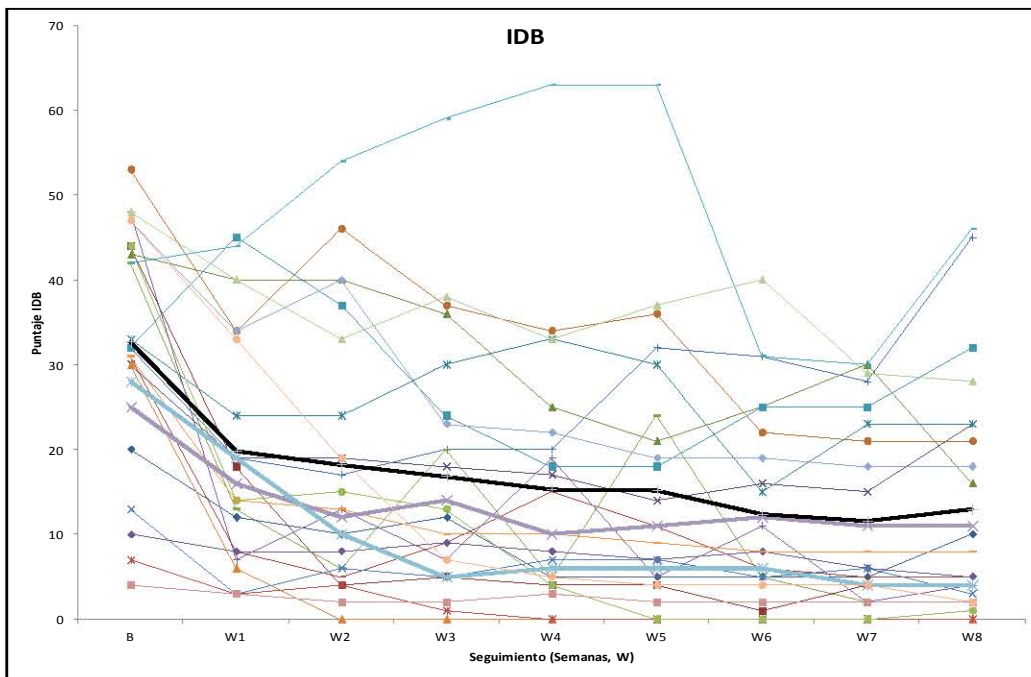
**Nota.** Se realizó un sub-análisis dividiendo a los pacientes en No Respondedores y Respondedores por reducción de HAM-D<sub>21</sub> >50% a la semana, respecto al basal). Aunque se observan algunos valores de correlación importantes entre las variables y el cambio en la expresión del gen CREB, al no tener distribución normal de las medias, no se consideran estadísticamente significativas.

Cuadro 7. Correlaciones de las Variables de Alcoholismo con la Expresión de CREB					
	Variables de Cambio			DDct Expresión CREB	
	Abst. Total	Abst. Parcial	OCDS	B/W8	Dif. Pos.
	n	n	%	M	n
OCDS < 50% B/W8 (n=5)	0	2	22.3	23.5	4
	s/v	rs=-0.046	rp=0.358	S-wilk 1.581, p=0.056	
OCDS > 50% B/W8 (n=3)	1	3	-71.3	16.0	3
	rs=-0.651	s/v	rp=0.992*	S-wilk 0.368, p=0.356	
Total (n=8)	1	5	-12.8	20.7	7
	rs=-0.218	rs=-0.125	rp=0.241	S-wilk 1.692, p=0.042	

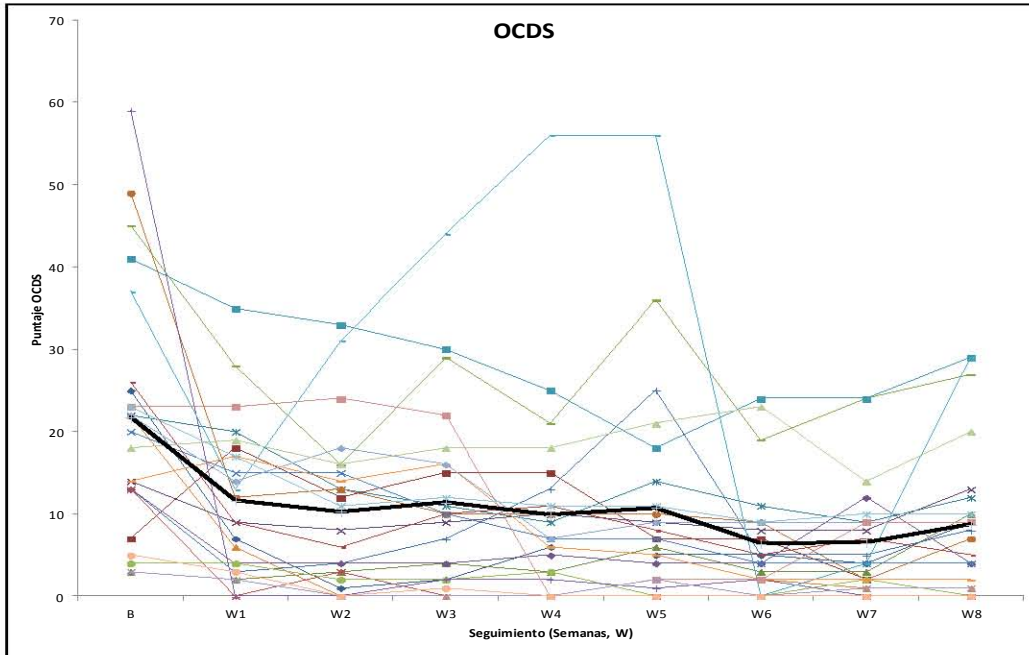
**Nota.** Se realizó un sub-análisis dividiendo a los pacientes en quienes presentaron o no, una reducción de más de 50% en OCDS a la semana, respecto al basal. Se observa una correlación positiva entre la respuesta en OCDS a la semana con el cambio en expresión de CREB (p=0.03).



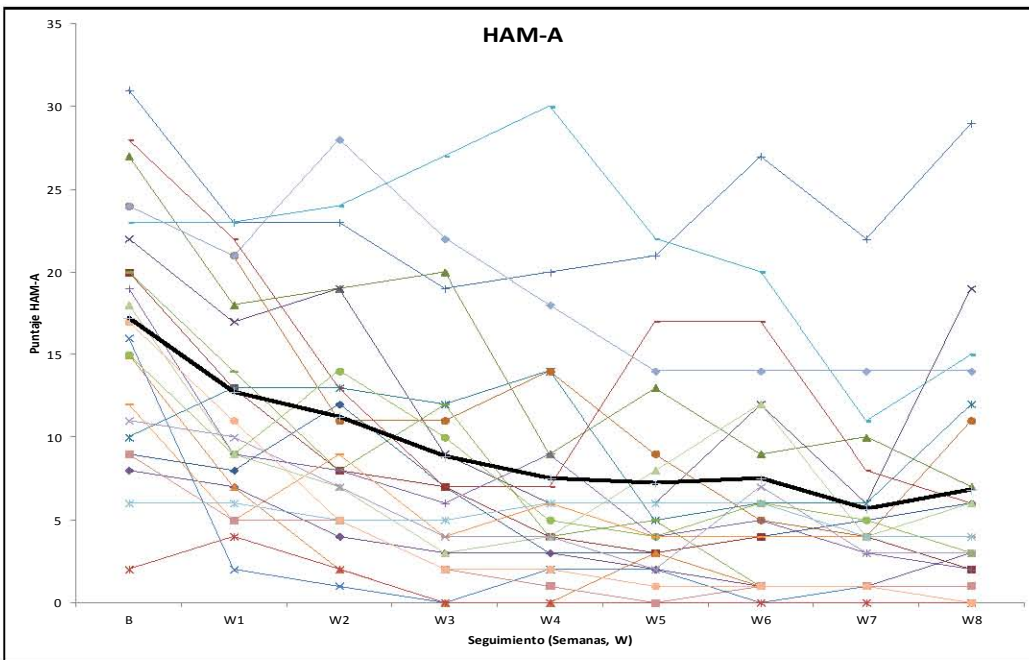
**Figura A.** Cambio en la intensidad de los síntomas depresivos medido por la escala MADRS. Se observa una alta variabilidad individual, y la línea negra se destaca el promedio de las evaluaciones individuales.



**Figura B.** Cambio en la intensidad de los síntomas depresivos medido por la escala IDB. Se observa una alta variabilidad individual, y la línea negra se destaca el promedio de las evaluaciones individuales.



**Figura C.** Cambio en la intensidad de los síntomas obsesivo-compulsivos relacionado a la bebida medido por la escala OCDS. Se observa menor variabilidad individual, y la línea negra se destaca el promedio de las evaluaciones individuales.



**Figura D.** Cambio en la intensidad de los síntomas ansiosos relacionado a la bebida medidos por la escala HAM-A. Se observa nuevamente una alta variabilidad individual, y la línea negra se destaca el promedio de las evaluaciones individuales.



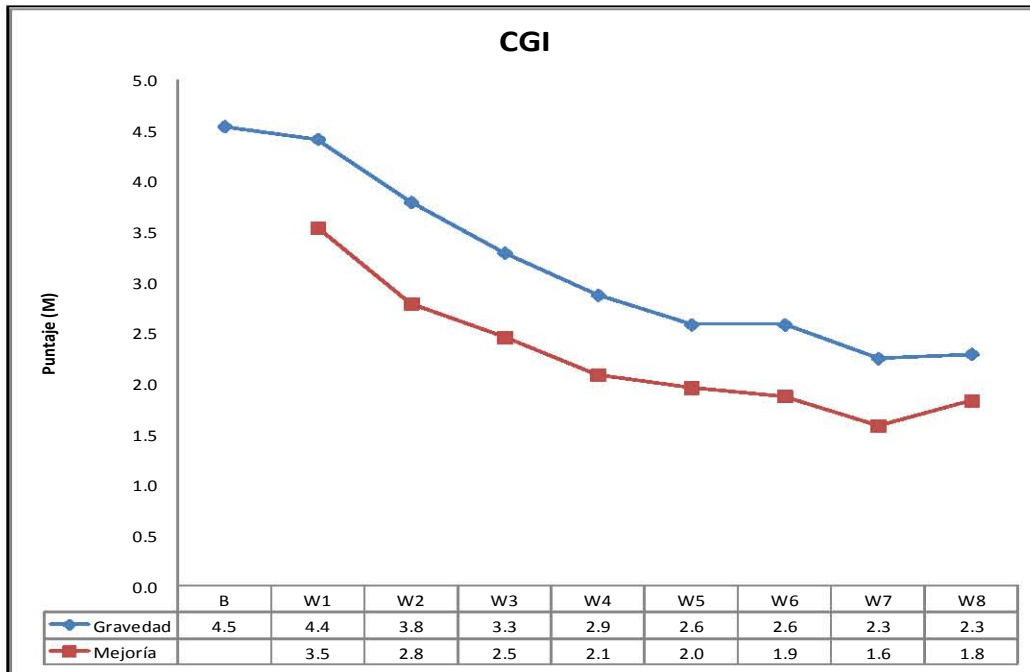


Figura E. Cambio en la gravedad clínica global medido por CGI-G (línea azul) y de mejoría medida por el CGI-M (línea roja).

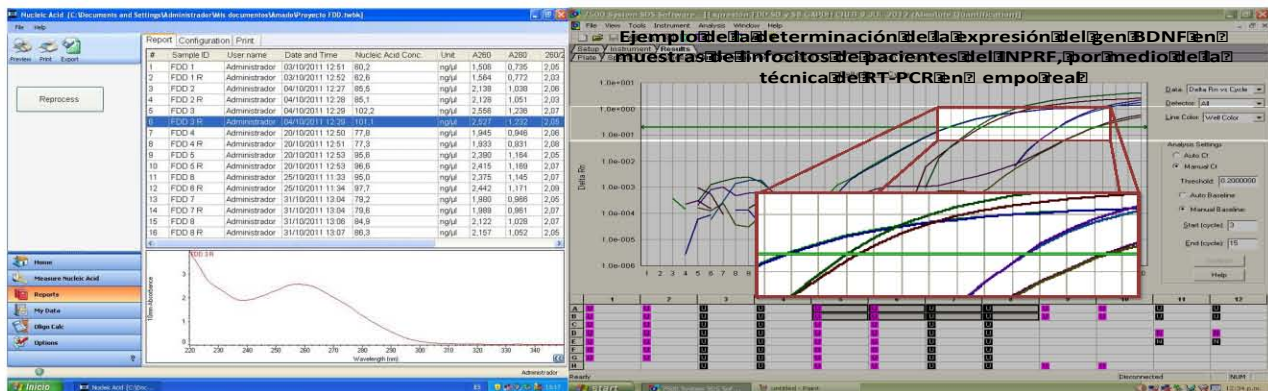


Figura F. Curva de expresión ( $\Delta\Delta Ct$ ) CREB por PCR en Tiempo Real.

## **Bibliografía**

1. Deslandes PN, Pache DM & Sewell DE. Drug dependence: Neuropharmacology and management. *J of Pharmacy and Pharmacology* 2002; 54: 885-895.
2. Medina-Mora ME, et.al. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental* 2003; 26: 1-16.
3. Nestler EJ, et.al. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002; 34: 13-25.
4. Angelucci F, Brene S & Mathé AA. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Molecular Psychiatry* 2005; 10: 345-352.
5. Martinowich K, Manji H & Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature Neuroscience* 2007; 10: 1089-1093.
6. Martinowich K & Lu B. Interaction between BDNF and serotonin: Role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology REVIEWS* 2008; 33: 73-83.
7. Licino J & Wong ML. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in stress and affective disorders. *Molecular Psychiatry* 2002; 7: 519.
8. Moonat S, et.al. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 73-88.
9. World Health Organization. Neuroscience of psychoactive substance use and dependence. Geneva, Switzerland. 2004.
10. Nanni RI. Trastornos del afecto en patología dual. En: Nanni RI. Tratado de Patología Dual. México Ed. Difusión & Tecnología. 2009: 137-153.
11. Pandey SC. The gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. *Pharmacology & Therapeutics* 2004; 104: 47-58.
12. McGough NN, et.al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci* 2004; 24: 10542-10552.

13. Joe KH, et.al. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2007; 31: 1833-1838.
14. Chen B, et.al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 260-265.
15. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision (DSM-IV-TR)*. 2004 Barcelona: Masson.
16. Alcohol Neurobiological mechanisms – Molecular. En: Koob GF & Moal ML. *Neurobiology of addiction*. Ed. Elsevier Inc. 2006: 211-220.
17. Trastornos del estado de ánimo. En: Sadock BJ & Sadock VA. *Sinopsis de psiquiatría*. 10ª ed. Ed. Wolters Kluwer. 2008: 390-406, 527-562.
18. Hamilton M. A rating scale for depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1960; 23: 56-62.
19. Montgomery SA, Asberg M. A new depression rating scale designed to be sensitive to change. *British Journal of Psychiatry* 1979; 134: 382-289.
20. Martínez R, Bourgeois M, Peyre F. Estudio de la validación de la escala de depresión de Montgomery y Asberg. *Revista Asociación Española de Neuropsiquiatría* 1991; 11: 9-14.
21. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch of Gen Psychiatry* 1961; 4: 561-571.
22. Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. *British Journal of Medical Psychology* 1959; 32: 50-55.
23. Rubio G, Urosa B & Domingo S. Assessment of alcohol withdrawal: the revised Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol Scale (CIWA-Ar). *British J Add* 1989; 84: 1353-1357.
24. Sheehan DV, et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *Journal of Clinical Psychiatry* 1998; 59(Supl. 20): 22-23, 34-57.

25. Stoltenberg SF. Serotonergic agents and alcoholism treatment: A simulation. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 12: 1853-1859.
26. Jonhson BA. Role of the serotonergic system in the the neurobiology of alcoholism. *CNS Drugs* 2004; 18: 1105-1118.
27. Heinz A, et.al. Serotonergic dysfunction, negative mood states and response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 4: 487-495.
28. Sen S, Duman R & Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression and antidepressant medications: Meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 527-532.
29. Pettinati HM. Antidepressant treatment of co-occurring depression and alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 2004; 56; 785-792.
30. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Ed. Lawrence Erlbaum. 2a ed. New Jersey.
31. López E y Juárez F. *Apuntes de Estadística Descriptiva*. INPRF. México D.F.
32. Gavin DP & Sharma RP. Chromatin from peripheral blood mononuclear cells as biomarkers for epigenetic abnormalities in schizophrenia. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* 2009; 13; 1-4.
33. Gladkevich A, Kauffman HF & Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2004; 28: 559– 576.
34. Feinstein AR. *Clinical Epidemiology*. Ed. W. B. Saunders Company. 1985. 12-24.
35. Stahl SM. *Essential Psychopharmacology. The prescriber's guide*. (2005) Cambridge University Press.
36. Yount R. *Research Design and Statistical Analysis*. (2006) 4<sup>th</sup> ed. Research Methods.
37. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Dingeon P, Arancibia S, Beaugé F. Effects of alcohol on Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA expression in discrete regions on the rat hippocampus and hypothalamus. *J of Neuroscience Research* 2001; 63: 200-208.
38. Logrip ML, Janak PH, Ron D. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. *Journal of Neurochemistry* 2009; 109: 1459-1468.

39. Jeanblanc J, He DY, Carnicella S, Kharazia V, Janak PH, Ron D. Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking. *J of Neuroscience* 2009; 29(43): 13494-13502.
40. Chul BJ, Choi IG, Kim YK, Ham BJ, Yang BH, Roh S, Choi J, Lee JS, Oh DY, Chai YG. Relation between plasma brain-derived neurotrophic factor and nerve grow factor in male patients with alcohol dependence. *Alcohol* 2009; 43: 265-269.
41. Huang MCh, Chen ChH, L HCh, Chen ChCh, Ho ChCh, Leu SJ. Differential patterns of serum brain-derived neurotrophic factor levels in alcoholic patients with and without delirium tremens during acute withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35(1): 126-131.
42. Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Numata S, Kinouchi S, Tayoshi-Shibuya S, Song H, Ohmori T. Altered HDAC5 and CREB mRNA expression in the peripheral leukocytes of major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2007; 31: 628-632.
43. Chang EA, Beyhan Z, Yoo MS, Siripattarapavat K, Ko T, Lookingland KJ, Madhukar BV, Cibelli JB. Increased cellular turnover in response to fluoxetine in neuronal precursors derived from human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 707-715.
44. Ren X, Dwivedi Y, Mondal AC, Pandey GN. Cyclic-AMP response element binding protein (CREB) in the neurophils of depressed patients. *Psychiatry Research* 2011; 185: 108-112.
45. Pettinati H, Volpicelli J, Kranzler H, Luck G, Rukstalis M, Cnaan A. Sertraline treatment for alcohol dependence: Interactive effects of medication and alcoholic subtypes. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24(7): 1041-1049.
46. Umene-Nakano W, Yoshimura R, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Hayashi K, Ueda N, Nakamura J. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in Comorbidity of depression and alcohol dependence. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2009; 24: 409-413.
47. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP): Encuesta Nacional de Adicciones 2008.
48. Johnson BA. Medication treatment of different types of alcoholism. *Am J Psychiatry* 2010; 167: 630-639.
49. Stahl SM. *Essential Psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications.* (2000) Cambridge University Press.

50. Solis L, Cordero M, Cordero R, Martínez M. Caracterización del nivel de dependencia al alcohol entre habitantes de la Ciudad de México. *Salud Mental* 2007; 30(6): 62-68.
51. Cordero M, Solis L, Cordero R, Torruco M, Cruz C. Factor structure and concurrent validity of the Obsessive-Compulsive Drinking Scale in a group of alcohol-dependent subjects of Mexico City. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(7): 1145-1150.
52. Bohn MJ, Barton BA, Barron KE. Psychometric properties and validity of the Obsessive-Compulsive Drinking Scale. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20(5): 817-823.
53. Guy W, editor. *ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology*. 1976. Rockville, MD, U.S. Department of Health, Education, and Welfare.
54. Berk M, Ng F, Dodd S, Callaly T, Campbell S, Bernardo M, Trauer T. The validity of the CGI severity and improvement scales as measures of clinical effectiveness suitable for routine clinical use. *J of Evaluation on Clin Practice* 2008; 14: 979-983.
55. Bech P. Fifty years with the Hamilton scales for anxiety and depression. *Psychother Psychosom* 2009; 78: 202-211.
56. Alcohol alert. *National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions*. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism 2006; 70: 1-5.
57. Regier DA, Farmer ME, Rae DS, et al. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse: Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA* 1990; 264(19):2511-2518.
58. World Health Organization. *Lexicon of alcohol and drug terms*. Geneva, Switzerland. 1994.
59. Kessler RC. Impact of substance abuse on the diagnosis, course, and treatment of mood disorders: The epidemiology of dual diagnosis. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 730-737.
60. Ducci F & Goldman D. Genetic approaches to addiction: Genes and alcohol. *Addiction* 2008; 103(9): 1414-1428.
61. Ostacher MJ. Comorbid Alcohol and Substance Abuse Dependence in Depression: Impact on the Outcome of Antidepressant Treatment. *Psychiatr Clin N Am* 2007; 30: 69–76.

62. Nunes EV & Levin FR. Treatment of Co-occurring Depression and Substance Dependence: Using Meta-analysis to Guide Clinical Recommendations. *Psychiatr Ann* 2008; 1(38): 1-14.
63. Iovieno N, Tedeschini E, Bentley KH, Evins AE and Papakostas GI. Antidepressant for major depressive disorder and dysthymic disorder in patients with comorbid alcohol use disorders: A meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *J Clin Psychiatry* 2011; 72(8): 1144-1151.
64. Undurraga J & Baldessarini RJ. Randomized, Placebo-Controlled Trials of Antidepressants for Acute Major Depression: Thirty-Year Meta-Analytic Review. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 851–864.
65. Pettinati HM, Oslin DW, Kampman KM, Dundon WD, Xie H, Gallis TL, Dackis CA, O'Brien CP. A double-blind, placebo-controlled trial combining sertraline and naltrexone for treating co-occurring depression and alcohol dependence. *Am J Psychiatry* 2010; 167: 668-675.
66. Nair A & Vaidya A. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: Molecules that modulate our mood? *J Biosci* 2006; 31(3): 423–434.
67. Amsterdam JD. Depresión resistente al tratamiento: Una breve revisión. En: *Patologías resistentes en psiquiatría*. 2ª ed. Ed. Ars Medica. 2006: 79-92.
68. Koob GF. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Research* 2010; 1314: 3–14
69. Mann K & Hermann D. Individualised treatment in alcohol-dependent patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2010; 260 (Suppl 2): S116–S120.
70. Mann K. Pharmacotherapy of Alcohol Dependence. A Review of the Clinical Data. *CNS Drugs* 2004; 18 (8): 485-504.
71. Caraveo-Anduaga J y Colmenares Bermudez E. Los trastornos psiquiátricos y el abuso de sustancias en México: Un panorama epidemiológico. *Salud Mental* 2002; 25 (2): 9-15.